***ANGÈLICA ANTEQUERA PARRA**

DIFERÈNCIES EN LA MICROBIOTA RESIDENT DELS ALIMENTS CÀRNICS AMB I SENSE CONSERVANTS

TREBALL FI DE GRAU

Dirigit per la Dra. Ana Fernández Bravo i Dr. Alberto Miguel Stchigel Glikman

Grau de Nutrició i Dietètica Humana



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2026

***Treball grupal realitzat amb: IMAN EL BOUSAKSSAKI**

ÍNDEX

1. Resum..... 3
2. Introducció..... 4
2.1 Autorització i comercialització dels additius..... 5
2.2 Avaluació dels riscos dels additius alimentaris per la salut..... 6
2.3 Origen i procedència dels additius..... 6
2.4 Tipus d'additius alimentaris..... 7
2.4.1 Agents aromatitzants..... 7
2.4.2 Preparats enzimàtics..... 7
2.4.3 Edulcorants..... 7
2.4.4 Colorants..... 7
2.4.5 Conservants..... 8
2.4.6 Antioxidants..... 8
2.4.7 Estabilitzants..... 8
2.5 Reglament sobre els additius alimentaris..... 8
2.6 Sulfit de sodi com a conservant de preparats càrnics..... 9
2.7 Factors que afecten al creixement microbià..... 10
2.8 Morfologia de la carn picada..... 11
2.9 Microbiologia de la carn..... 12
2. 10 Microbiota patògena de la carn picada..... 12
2.11 Efecte dels additius a la carn..... 14
3. Hipòtesi principal..... 15
4. Objectius..... 15
4.1 Objectiu general..... 15
4.2 Objectius específics..... 16
5. Material i mètodes:..... 16
5.2 Medis de cultius..... 18
5.3 Aïllament microbiològic..... 21
5.4 Identificació preliminar de colònies..... 22
5.5 Anàlisi estadística..... 22
6. Resultats..... 23
6.1 Recompte dels diferents medis de cultiu..... 23
6.2 Abundància de microorganismes..... 26
6.3 Creixement o decreixement dels microorganismes durant l'emmagatzematge..... 28
6.3 Abundància dels microorganismes..... 31
7. Discussió..... 38
8. Conclusió..... 40
9. Bibliografia..... 42

1. Resum

Aquest estudi s'emmarca en el context de la creixent preocupació per la seguretat alimentària dels productes càrnics, especialment davant l'augment del consum d'aliments ecològics. Tot i que aquests productes sovint són percebuts com a més saludables i segurs, és necessari avaluar-ne objectivament les seves característiques microbiològiques en comparació amb els productes convencionals.

La carn picada i els preparats càrnics constitueixen matrius especialment sensibles des del punt de vista microbiològic, ja que presenten una elevada activitat d'aigua, un pH proper a la neutralitat i una gran disponibilitat de nutrients. A més, el procés de picat augmenta la superfície exposada i facilita la distribució dels microorganismes presents a la superfície de la carn cap a l'interior del producte. En aquest context, els conservants autoritzats s'utilitzen per millorar l'estabilitat i la seguretat dels aliments, però la seva eficàcia pot dependre de la contaminació inicial, de la formulació, del tipus d'envasament i de les condicions de conservació.

L'objectiu d'aquest treball és realitzar un estudi comparatiu de la càrrega bacteriana total i detectar-ne la presència de potencials microorganismes patògens presents en hamburgueses elaborades a partir de carn de vedella ecològica i no ecològica, així com avaluar-ne l'evolució durant l'emmagatzematge refrigerat. Es van analitzar tres unitats de cada tipus de producte (carn ecològica i no ecològica) en tres temps de conservació (0, 3 i 7 dies), emprant medis de cultiu no selectius (*Tryptic Soy Agar*, TSA) i selectius/diferencials (agar de Chapman; medi selectiu per a *Listeria*; medi selectiu per a *Yersinia*; *Ampicillin Dextrin Agar*, ADA; *Violet Red Bile Glucose Agar*, VRBG). Les colònies obtingudes es van interpretar com a indicadors presumptius dels grups microbians diana.

Els resultats van mostrar una elevada càrrega microbiana total en TSA en tots els temps analitzats. Les hamburgueses amb carn no ecològica amb additius van presentar, en general, recomptes inicials més elevats en VRBG i ADA que les ecològiques, fet compatible amb una major càrrega inicial d'enterobacteris i bacteris cultivables en medi ADA. Durant la refrigeració es va observar una disminució marcada dels recomptes en VRBG i ADA, mentre que altres grups, com els microorganismes compatibles amb *Staphylococcus* o *Yersinia*, van mostrar dinàmiques més variables. En conjunt, les dades indiquen que la qualitat microbiològica del producte final no depèn exclusivament de la presència d'additius, sinó també de la qualitat de la matèria primera, la manipulació, l'envasament i el manteniment correcte de la cadena de fred.

2. Introducció

La carn i els productes alimentaris derivats constitueixen una part fonamental de la dieta occidental. Tanmateix, el fet que la carn es presenti picada augmenta notablement la seva superfície d'exposició i, en conseqüència, la seva vulnerabilitat davant el creixement de microorganismes alterants i els potencialment patògens **[1].** Per aquest motiu, les preparacions de carn esdevenen productes especialment sensibles des del punt de vista microbiològic i requereixen mesures que n'assegurin la qualitat i la seguretat al llarg de la seva vida útil **[1]**.

Al llarg del temps s'han emprat diferents additius alimentaris amb la finalitat de satisfer les necessitats de la indústria alimentària quant a la transformació d'aliments **[2].** Els additius s'afegeixen per garantir l'òptim estat i la innocuïtat dels aliments al llarg de tot el seu procés d'elaboració **[2].**

Segons el Codi Alimentari Espanyol, es consideren additius aquelles substàncies que s'afegeixen de manera intencionada als aliments i begudes sense el propòsit de canviar el seu valor nutritiu, simplement per millorar-ne les característiques, les tècniques d'elaboració o conservació, i per millorar l'adaptació d'ús a qui van destinats **[3].** Els additius alimentaris són substàncies alienes als aliments, que no formen part dels aliments de manera natural. S'afegeixen als aliments amb una finalitat tecnològica en les fases del seu procés d'elaboració. Com a conseqüència, aquestes substàncies acaben formant part del producte final **[4].** L'ús d'additius alimentaris ofereix nombrosos beneficis tant per als aliments com per als consumidors **[4].** Aquests beneficis estan relacionats amb la preservació de la qualitat nutricional dels aliments, així com amb la seva estabilitat, qualitat i conservació. També permeten millorar les propietats organolèptiques i faciliten processos com la fabricació, la transformació, preparació o tractament de l'aliment **[4].**

Segons l'Agència Espanyola de Seguretat Alimentària i Nutrició, els additius actuen com coadjuvants tecnològics i s'utilitzen pels efectes que proporcionen **[4].** Tot i que sovint passen desapercebuts, són imprescindibles; sense ells no seria possible la comercialització de molts dels aliments que avui en dia tenim a l'abast **[4].**

És obligatori que aquests additius formin part de l'etiquetatge alimentari per facilitar el seu ús i el reconeixement internacional **[4].** S'identifiquen mitjançant un codi format per la lletra "E" seguida d'un guionet i d'un número de tres xifres, el qual aporta orientació sobre la classe funcional al qual pertany l'additiu en qüestió, per exemple colorants, conservants, antioxidants i estabilitzants **[4].**

2.1 Autorització i comercialització dels additius

Perquè un additiu pugui ser comercialitzat i utilitzat en aliments, ha de complir tres condicions principals **[4].** En primer lloc, ha d'existir una necessitat tecnològica justificada que no pugui substituir-se per altres mètodes. En segon lloc, no ha d'induir a error al consumidor. Finalment, ha de ser segur per a la salut, avalat per evidència científica **[4]**.

La seguretat dels additius es garanteix mitjançant una avaluació prèvia a l'autorització. L'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) realitza l'avaluació científica, que és revisada posteriorment per la Comissió Europea abans de la seva aprovació **[4]**. A nivell internacional, el Comitè d'Experts en Additius Alimentaris (JECFA), conjunt de la FAO i l'OMS, és l'encarregat d'avaluar-ne la innocuïtat **[2].** A més, la Comissió del Codex Alimentarius estableix normes d'etiquetatge i regula la identificació dels additius amb el codi "E" **[2]**.

Els additius estan sotmesos a un control estricte per part d'organismes nacionals, europeus i internacionals com l'OMS i la FAO **[3]**. Aquestes entitats estableixen dosis d'ús, criteris de puresa i mètodes analítics de control, amb l'objectiu de protegir la salut dels consumidors i facilitar el comerç alimentari **[3]**.

Finalment, el JECFA avalua els additius a partir d'estudis toxicològics, químics i nutricionals realitzats en diferents espècies i generacions **[3].** Amb aquestes dades s'estableix la Ingesta Diària Admissible (IDA), que defineix la quantitat màxima segura d'un additiu que es pot consumir diàriament al llarg de la vida **[3].**

2.2 Avaluació dels riscos dels additius alimentaris per la salut

Només els additius alimentaris la innocuïtat dels quals ha estat avaluada i que no presenten cap risc per a la salut dels consumidors poden ser autoritzats per al seu ús a escala internacional **[2]**. Aquest criteri s'aplica tant als additius d'origen natural com als de síntesi**[2]**. En aquest context, els additius són sotmesos a avaluacions bioquímiques i toxicològiques exhaustives**[2]**. Així mateix, s'analitza la seva toxicitat aguda i crònica, amb l'objectiu de determinar aspectes com l'absorció, la distribució, el metabolisme i l'excreció de la substància, així com els possibles efectes adversos, tant de l'additiu en si com dels seus subproductes, en funció dels diferents nivells d'exposició**[2]**. El punt de partida per establir si un additiu alimentari pot utilitzar-se sense produir efectes perjudicials és la determinació de la Ingesta Diària Admissible (IDA), definida com la quantitat màxima d'una substància que pot ser consumida diàriament al llarg de la vida sense comportar riscos per a la salut**[2]**.

2.3 Origen i procedència dels additius

Es poden establir 4 categories segons l'acció que desenvolupen en un aliment **[3]**. Substàncies que impedeixen alteracions químiques i biològiques, substàncies estabilitzadores de les característiques físiques, substàncies correctes de qualitats plàstiques **[3]**. Substàncies modificadores de característiques organolèptiques (sabor, color, olor) **[3]**. En altres paraules, contribueixen a millorar la conservació, preservar les propietats inicials, evitant que els microorganismes i els processos d'oxidació deteriorin els aliments, mantenir el valor nutritiu evitant degradació de substàncies com vitamines, àcids grassos o proteïnes essencials o assegurar la textura i/o consistència dels aliments **[3]**.

En alguns casos son d'origen vegetal: extractes de llavors, algues o fruits que es fan servir com a espessidor **[3]**. Colorants aïllats de llavors, fruits o vegetals sencers **[3]**. En altres casos es produeixen substàncies naturals per la síntesi química com l'àcid ascòrbic. Colorants com els carotenoides **[3]**. També és possible atendre'ls com productes de transformació de substàncies naturals, per exemple, emulsionants derivats dels greixos, midons modificats com a agents de textura **[3]**.

2.4 Tipus d'additius alimentaris

Els additius alimentaris es poden obtenir a partir de plantes, animals, minerals o sintetitzar-se químicament**[2]**. En l'actualitat s'utilitzen cents d'additius alimentaris, tots ells dissenyats per complir una funció específica**[2]**.

2.4.1 Agents aromatitzants

Els agents aromatitzants són substàncies químiques que aporten sabors, olors i s'afegeixen als aliments amb l'objectiu de modificar el seu gust o aroma**[2]**. És l'additiu més comú i utilitzat en la indústria alimentària i en una gran varietat d'aliments, des de gominoles, refrescos fins cereals, pastissos i iogurts**[2]**. Els agents aromatitzants poden tenir origen natural (derivats de vegetals o animals) o origen sintètic**[2]**.

2.4.2 Preparats enzimàtics

Els preparats enzimàtics son un tipus d'additiu que es pot acabar o no en el producte final **[2]**. Els enzims són proteïnes naturals que catalitzen reaccions bioquímiques al descompondre grans molècules **[2]**. Aquests preparats, es poden obtenir per extracció de productes d'origen animal, vegetal o de microorganismes com els bacteris **[2]**. S'utilitzen com a alternativa a altres tècniques

químiques **[2]**. Els preparats enzimàtics es fan servir principalment en rebosteria, fabricació de sucs de fruites, elaboració de vins i cerveses i la producció de formatges **[2]**.

2.4.3 Edulcorants

Els edulcorants són substàncies que proporcionen sabor dolç als aliments o a les preparacions alimentàries **[2].** Existeixen edulcorants naturals, com el sucre de taula, i edulcorants artificials obtinguts mitjançant processos químics. Aquests darrers també es coneixen com a edulcorants no nutritius o substituts del sucre. Els edulcorants artificials s'utilitzen àmpliament en productes baixos en calories o sense sucres afegits, ja que permeten mantenir el sabor dolç reduint l'aportació energètica dels aliments **[2]**.

2.4.4 Colorants

Els colorants s'afegeixen als aliments amb la finalitat de potenciar o restaurar el color que es pot perdre durant els processos d'elaboració, conservació o emmagatzematge dels aliments. També s'utilitzen per millorar l'aspecte visual dels productes i augmentar-ne l'acceptació per part dels consumidors **[2]**.

2.4.5 Conservants

Els conservants es fan servir amb la finalitat d'alentir el deteriorament dels aliments causat per l'aire, floridures, bacteris i llevats **[2]**. A més a més de mantenir la qualitat dels aliments i ajudar a evitar contaminacions que poden provocar malalties transmeses pels aliments **[2]**. Per tant, els conservants són substàncies que inhibeixen o retarden el creixement de microorganismes alterants o patògens contribuint a millorar la seguretat i estabilitat microbiològica del producte **[2]**.

2.4.6 Antioxidants

Els antioxidants són substàncies que tenen com a objectiu perllongar la vida útil dels aliments protegint-los del deteriorament causat per processos d'oxidació com l'enranciment dels lípids o la pèrdua de color de la carn. Aquests additius contribueixen a preservar les característiques sensorials i nutricionals dels aliments, evitant alteracions en el sabor, l'olor i l'aspecte del producte **[5]**.

2.4.7 Estabilitzants

Són substàncies que possibiliten el manteniment de l'estat fisicoquímic d'un producte alimentari**[5]**. Inclouen aquelles que permeten conservar una dispersió homogènia de dues o més substàncies no

miscibles, les que estabilitzen, retenen o intensifiquen el color del producte, i les que incrementen la capacitat d'enllaç dels aliments, així permet unir trossos d'aliment per formar un producte reconstituït **[5].**

2.5 Reglament sobre els additius alimentaris

D'acord amb el Reglament (CE) núm. 853/2004, les hamburgueses s'inclouen dins la categoria de preparats càrnics, ja que es tracta de carn fresca sotmesa a processos físics, com el picat i el modelatge, a la qual es poden afegir ingredients i/o additius, sempre que no se'n modifiqui de manera irreversible l'estructura de la fibra muscular **[6].**

El Reglament (CE) núm. 1333/2008 del Parlament Europeu i del Consell estableix les normes relatives als additius alimentaris amb l'objectiu de garantir un alt nivell de protecció de la salut humana i dels interessos dels consumidors **[5]**. Aquest reglament inclou la llista comunitària d'additius autoritzats, les seves condicions d'ús i els requisits d'etiquetatge, tant per als additius utilitzats en aliments com per als comercialitzats com a tals **[5]**.

Així mateix, el Reglament (CE) núm. 1333/2008 defineix les funcions tecnològiques dels additius autoritzats. Entre els més habituals destaquen els antioxidants, els conservants i els estabilitzants, que contribueixen, respectivament, a retardar l'oxidació, limitar el creixement microbià i mantenir la integritat fisicoquímica dels aliments **[6].**

El Reglament també estableix normes específiques d'higiene per als aliments d'origen animal. En aquest reglament es defineixen conceptes com el de carn, entesa com les parts comestibles, inclosa la sang d'animals de les espècies bovina, porcina, ovina, caprina, aus de corral, conills i caça **[6]**.

També s'hi defineix el concepte de preparat carni, que fa referència a la carn fresca, inclosa la carn trossejada, a la qual s'han afegit altres productes alimentaris, condiments o additius, o que ha estat sotmesa a transformacions que no alteren l'estructura interna de la fibra muscular i que, per tant, manté les característiques pròpies de la carn fresca **[6]**. A més, s'estableix que la carn procedent d'espècies bovines, porcines i d'aus de corral ha de complir determinats criteris microbiològics, amb resultats conformes a la legislació comunitària vigent **[6]**.

Finalment, el Reglament (UE) núm. 1129/2011 recull tots els additius autoritzats per a la seva utilització en aliments, així com les seves condicions d'ús **[6]**.

2.6 Sulfit de sodi com a conservant de preparats càrnics

El sulfit de sodi (Na_2SO_3), identificat com a additiu E221, és un conservant sintètic derivat de compostos que contenen sofre **[7]**. S'utilitza principalment per prevenir el creixement microbià, inhibir processos enzimàtics i evitar la decoloració dels aliments **[7]**. Aquest additiu s'aplica en una àmplia varietat de productes alimentaris, incloent-hi els preparats càrnics **[7]**.

Segons la base de dades d'additius de la Comissió Europea, s'estableixen els següents criteris d'ús**[8]**:

- El límit màxim permès de sulfits en determinats aliments, com els preparats càrnics, és de 450 mg/kg. Aquest valor fa referència a la quantitat màxima autoritzada per garantir la seguretat del consumidor. No obstant això, els fabricants poden utilitzar quantitats inferiors en funció de les necessitats tecnològiques **[8]**.
- Els additius poden afegir-se de manera individual o combinada. Això implica que es pot utilitzar un sol additiu o diversos alhora, sempre respectant el límit màxim establert **[8]**.
- Els nivells màxims s'expressen en equivalent de diòxid de sofre (SO_2), independentment del tipus de sulfit utilitzat **[8]**. En cas d'emprar-se diversos sulfits, es considera la suma total de tots ells **[8]**.
- Es considera que un aliment conté sulfits quan la seva concentració supera els 10 mg/kg**[8]**. En aquest cas, és obligatori indicar-ne la presència a l'etiquetatge **[8]**. Per contra, si la concentració és inferior a aquest llindar, no es considera rellevant des del punt de vista normatiu i no és obligatori declarar-la **[8]**.

En conseqüència, els límits màxims dels sulfits en aliments s'expressen com a equivalents de diòxid de sofre i es calculen a partir de la suma total de totes les fonts presents en el producte, tot considerant el llindar de 10 mg/kg com a criteri per a la seva declaració obligatòria **[8]**.

2.7 Factors que afecten al creixement microbià

El creixement de microorganismes en la carn picada depèn de diversos factors intrínsecs i extrínsecs **[9] [10].** Entre els més importants destaca la temperatura d'emmagatzematge, ja que la refrigeració redueix la velocitat de creixement microbià, però no l'atura completament. Alguns patògens, com *Listeria monocytogenes* o *Yersinia enterocolitica*, poden multiplicar-se fins i tot en condicions de refrigeració **[11].**

El temps de conservació també és clau, ja que un emmagatzematge prolongat augmenta el risc de proliferació microbiana [9]. A més, la manipulació inadequada pot afavorir la contaminació creuada i

incrementar la càrrega microbiana **[12]**. El tipus de producte, com ara carn ecològica o convencional, pot influir en la càrrega inicial i en la seva evolució durant l'emmagatzematge **[9].**

La competència entre microorganismes i la disponibilitat de nutrients també condicionen la dinàmica del creixement, provocant variacions en els diferents grups bacterians segons les condicions i el temps [9]. A això s'hi afegeixen factors com el pH i l'activitat d'aigua (Aw), que en la carn picada solen afavorir el creixement microbià per la seva proximitat a la neutralitat i elevada Aw **[9][10]**.

Finalment, l'atmosfera d'envasament també és determinant, ja que les atmosferes modificades poden retardar el creixement microbià, tot i que alguns microorganismes poden adaptar-s'hi **[13]**. Per tot això, és essencial mantenir la cadena de fred i aplicar bones pràctiques d'higiene durant tota la producció i distribució per garantir la seguretat del producte **[14]**.

2.8 Morfologia de la carn picada

La carn picada presenta unes condicions especialment favorables per al creixement microbià, a causa de la seva elevada activitat d'aigua (Aw), un pH proper a la neutralitat i un alt contingut en nutrients**[10] [11]**. Aquestes característiques converteixen la carn picada en un medi òptim per al desenvolupament de microorganismes alterants i patògens **[10]**.

A més, el procés de trituració i manipulació incrementa considerablement la superfície exposada a l'oxigen i al contacte amb equips, superfícies i manipuladors, fet que augmenta el risc de contaminació creuada [10]. Durant el picat, els microorganismes presents a la superfície de la carn poden distribuir-se per tota la massa del producte, facilitant-ne la proliferació **[15][16]**. Diversos estudis han demostrat que la carn crua pot actuar com a reservori de diferents microorganismes patògens, entre els quals destaquen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i *Yersinia enterocolitica* **[17].** Aquests microorganismes tenen la capacitat de provocar malalties de transmissió alimentària si no es controlen adequadament les condicions higièniques i sanitàries durant la producció, manipulació i conservació del producte **[15].**

Així mateix, la composició de la carn picada pot variar en funció de l'espècie animal, el contingut en greix i el tipus de tall utilitzat, factors que també poden influir en la seva estabilitat microbiològica i en les seves propietats fisicoquímiques **[15].** Per aquest motiu, és essencial aplicar mesures estrictes de control de qualitat i conservació per garantir la seguretat alimentària i prolongar la vida útil del producte **[18].**

2.9 Microbiologia de la carn

La carn picada presenta unes condicions ideals per al creixement microbià a causa de la seva elevada activitat d'aigua, un pH proper a la neutralitat i un alt contingut en nutrients**.** A aquestes característiques s'hi afegeix el procés de manipulació i trituració, que incrementa el risc de contaminació creuada i facilita la proliferació de microorganismes**[18].**

Diferents estudis han demostrat que la carn crua pot actuar com a reservori de diversos microorganismes patògens, entre els quals destaquen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i *Yersinia enterocolitica***.** Aquests patògens tenen la capacitat de provocar malalties de transmissió alimentària si no es controlen adequadament les condicions higièniques i sanitàries durant la producció, manipulació i conservació dels aliments**[18].**

Tanmateix, no tots els microorganismes presents en la carn són perjudicials. Alguns bacteris, com els bacteris làctics, poden exercir un efecte beneficiós, ja que competeixen amb microorganismes patògens pels nutrients i l'espai disponible, contribuint així a limitar-ne el creixement**.** A més, determinats microorganismes poden participar en processos de conservació i en el desenvolupament de característiques sensorials específiques en alguns productes càrnics fermentats**[18].**

2. 10 Microbiota patògena de la carn picada

La carn constitueix una matriu rica en nutrients que afavoreix la proliferació de microorganismes deteriorants i patògens, fet que ha impulsat el desenvolupament de diverses estratègies de conservació, com l'ús d'additius, per garantir la seguretat alimentària **[19]**.

Durant el sacrifici i el processament dels animals, la carn pot contaminar-se a partir de fonts internes i externes, com la pell o el contingut intestinal. Les etapes de manipulació i processament incrementen el risc, especialment en carns processades, més susceptibles a la presència de patògens **[19]**.

La qualitat microbiològica es determina mitjançant microorganismes indicadors, que permeten avaluar la higiene del procés. Entre els principals patògens associats a la carn de vedella destaquen Enterobacteriaceae, Staphylococcus, Listeria, Yersinia i Aeromonas, relacionats amb brots de malalties alimentàries com Salmonella, Escherichia coli i Listeria monocytogenes, considerats especialment rellevants. Per això, les bones pràctiques d'higiene són essencials per limitar-ne la proliferació **[19]**.

En el cas d'Escherichia coli, es tracta d'un indicador de contaminació fecal, amb soques patògenes com E. coli O157:H7, associades a infeccions greus i amb el bestiar boví com a reservori. Salmonella és un altre patogen important, freqüent en carn picada per les seves condicions favorables de creixement. Listeria monocytogenes destaca per la seva capacitat de créixer a temperatures de refrigeració i persistir en instal·lacions, cosa que en fa un risc important en aliments refrigerats **[19]**.

Altres microorganismes rellevants inclouen Staphylococcus aureus, associat a la manipulació humana i productor d'enterotoxines termoestables que causen intoxicacions alimentàries **[20]**. Yersinia enterocolitica pot sobreviure a baixes temperatures i provocar infeccions gastrointestinals de diversa gravetat, especialment en carn crua o poc cuinada **[21]**. Finalment, Aeromonas hydrophila, present en ambients aquàtics, pot créixer en refrigeració i contaminar productes càrnics durant el processament o l'emmagatzematge **[17]**. En conjunt, aquests riscos evidencien la importància d'un control higiènic estricte al llarg de tota la cadena alimentària. **[20]**

2.11 Efecte dels additius a la carn

En els darrers anys, ha augmentat l'interès per desenvolupar productes càrnics reformulats amb una menor quantitat d'additius, especialment conservants i nitrats, amb l'objectiu d'oferir aliments percebuts com més naturals i saludables pels consumidors**.** Diversos estudis han analitzat l'impacte que aquesta reformulació pot tenir tant sobre les característiques dels productes com sobre la salut dels consumidors. En aquest sentit, s'ha observat que els productes càrnics cuits elaborats sense determinats additius ni al·lèrgens són valorats positivament pels consumidors i poden associar-se a millores en alguns biomarcadors relacionats amb l'estrès oxidatiu i la inflamació, així com a canvis beneficiosos en la microbiota intestinal **[21].**

Paral·lelament, diferents investigacions han estudiat l'efecte dels additius antimicrobians sobre els microorganismes presents a la microbiota intestinal humana **[22].** Alguns estudis indiquen que certes espècies bacterianes beneficioses poden ser especialment sensibles a compostos com el nitrit de sodi, fet que podria alterar l'equilibri microbià intestinal**.** Entre aquests bacteris destaquen alguns microorganismes amb funcions antiinflamatòries, com *Clostridium tyrobutyricum* i *Lactobacillus paracasei* **[22].**

Tot i que aquests estudis no se centren exclusivament en hamburgueses o carn picada, els resultats suggereixen que la presència o absència d'additius alimentaris podria influir tant en la qualitat microbiològica dels productes càrnics com en les seves possibles repercussions sobre la salut del consumidor **[21,22].** Per aquest motiu, l'estudi dels efectes dels additius en la carn i sobre la microbiota associada representa un àmbit d'interès creixent dins la seguretat alimentària i la indústria alimentària actual.

3. Hipòtesi principal

La microbiota cultivable de les hamburgueses de vedella pot variar segons la tipologia del producte, la presència de conservants com els sulfits i el temps d'emmagatzematge en refrigeració. En aquest context, les hamburgueses de producció convencional amb sulfits poden presentar diferències en la càrrega i composició dels principals grups bacterians cultivables respecte a les hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats, amb possibles implicacions en la qualitat microbiològica i la seguretat alimentària del producte.

4. Objectius

4.1 Objectiu general

Analitzar comparativament la microbiota cultivable de dues formulacions comercials d'hamburguesa de vedella, una elaborada amb carn ecològica sense additius declarats i una altra elaborada amb carn de producció convencional amb sulfits, per tal d'avaluar possibles diferències en la qualitat microbiològica del producte i en els grups bacterians d'interès higiènic-sanitari durant l'emmagatzematge en refrigeració.

4.2 Objectius específics

1. Comparar la càrrega microbiana cultivable entre hamburgueses de vedella ecològica sense additius declarats i hamburgueses de vedella de producció convencional amb sulfits, mitjançant el recompte en medis de cultiu selectius i no selectius.
2. Avaluar la presència i abundància relativa de diferents grups bacterians d'interès higiènic-sanitari, incloent-hi microorganismes cultivables (aerobis i facultatius) en TSA, enterobacteris en VRBG, bacteris compatibles amb *Staphylococcus* spp. en agar Chapman, bacteris compatibles amb *Listeria* spp., *Yersinia* spp. i *Aeromonas* spp. en els medis selectius corresponents.
3. Analitzar l'evolució temporal dels recomptes microbians durant l'emmagatzematge en refrigeració als 0, 3 i 7 dies, comparant la dinàmica observada en ambdós tipus d'hamburguesa.
4. Descriure de manera preliminar les diferències qualitatives de la microbiota cultivable entre els dos tipus de producte, a partir de la morfologia colonial i del creixement en medis selectius i diferencials.

5. Relacionar els resultats obtinguts amb la qualitat microbiològica i la seguretat alimentària del producte, considerant la presència de grups bacterians indicadors d'higiene, alteració o possible risc per al consumidor.

5. Material i mètodes:

5.1 Disseny i mostres

Per a l'estudi es van seleccionar dos preparats càrnics comercials de boví amb característiques diferenciades. D'una banda, es va utilitzar una hamburguesa comercial amb additius, que declarava la presència de sulfit de sodi com a conservant **[23]**. D'altra banda, es va emprar una hamburguesa de vedella ecològica sense conservants declarats a l'etiquetatge. Ambdós productes indicaven la necessitat de conservació en refrigeració entre 0 i 4 °C i de cocció completa abans del consum. Cal tenir en compte que els dos productes no només difereixen en la presència o absència de conservants, sinó també en altres aspectes composicionals, com el contingut de greix, sal, ingredients afegits, tipus de producció i condicions comercials d'envasament. Per aquest motiu, la comparació microbiològica s'ha d'interpretar com una comparació exploratòria entre dues formulacions comercials diferents, i no com una demostració directa i exclusiva de l'efecte del conservant sobre la microbiota resident **(Taula 1)**. **[24]**

Taula 1. Característiques principals dels dos productes càrnics utilitzats en l'estudi.

Característica	**Hamburguesa comercial amb additius**	**Hamburguesa ecològica sense conservants declarats**
Codi utilitzat en l'estudi	HMB / hamburguesa amb additius	ECO / hamburguesa ecològica
Marca comercial	BonÀrea	Bonpreu – de l'ERA
Denominació del producte	*Burger meat* de vacum/boví	Hamburguesa de vedella ecològica
Tipus de producte	Preparat carni de carn picada de boví	Preparat de carn de vedella ecològica
Nombre d'unitats	2 unitats	1 unitat/envasat individual
Pes net	0,336 kg	0,150 kg
Preu per kg	12,98 €/kg	21,33 €/kg
Preu total	4,36 €	3,20 €

Ingredients principals	Carn picada de vacum 90%, flocs de pèsol 4,4%, sal, espècies i conservant	Carn de vedella ecològica 97%, midó de tapioca ecològic, sal i pebre negre ecològic
Conservants declarats	Sí: sulfit de sodi	No s'hi declaren conservants
Additiu rellevant per a l'estudi	Sulfit de sodi	No consta cap additiu conservant a l'etiqueta
Possibles al·lèrgens indicats	Pot contenir traces de proteïnes de la llet i lactosa	Sense gluten declarat
Tipus d'envasament	Envasat en atmosfera protectora	Envasat en safata/format comercial refrigerat
Condicions de conservació	Mantenir entre 0 i 4 °C	Conservar entre 0 i 4 °C
Indicacions després d'obrir l'envàs	Consumir en 48 h un cop obert	No especificat clarament a l'etiqueta visible
Instruccions de consum	Cuinar abans del consum	Cuinar completament abans de consumir
Data de caducitat	05/06/2026	03/06/2026
Lot	5877 142 107 106 15:48 / 71	1426225
Valor energètic	759 kJ / 182 kcal per 100 g	507 kJ / 121 kcal per 100 g
Greixos totals	12 g/100 g	4,5 g/100 g
Greixos saturats	5,9 g/100 g	2,2 g/100 g
Hidrats de carboni	0,5 g/100 g	2,0 g/100 g
Sucres	0 g/100 g	<0,5 g/100 g
Proteïnes	18 g/100 g	18 g/100 g
Sal	2,2 g/100 g	0,78 g/100 g
Observacions rellevants per al treball	Producte amb conservant declarat i contingut de sal més elevat. La presència de sulfit de sodi justifica la seva inclusió com a mostra amb additius/conservants.	Producte ecològic, amb menor contingut de greix i sal, i sense conservants declarats. És adequat com a comparador, tot i que no és equivalent al producte comercial en composició ni en origen.

El disseny experimental va incloure tres rèpliques independents per a cadascuna de les dues tipologies d'hamburguesa estudiades: hamburgueses de vedella ecològica sense additius declarats i hamburgueses de vedella de producció convencional amb sulfits. Per a cada tipologia, les mostres es van conservar en refrigeració a 4 °C i es van analitzar microbiològicament en tres temps d'emmagatzematge: dia 0, dia 3 i dia 7 **[25]**. D'aquesta manera, es va obtenir un total de 18 mostres analitzades, corresponents a la combinació de tres rèpliques independents, dues formulacions comercials i tres temps de conservació (3 × 2 × 3). Aquesta aproximació va permetre comparar tant la càrrega microbiana inicial com l'evolució dels diferents grups bacterians cultivables durant l'emmagatzematge refrigerat**[26].**

5.2 Medis de cultius

Per a l'aïllament i recompte de la microbiota cultivable present en les hamburgueses de vedella, es van utilitzar diferents medis de cultiu amb finalitats complementàries. El TSA es va emprar com a medi no selectiu per estimar la càrrega microbiana total cultivable. L'agar Chapman es va utilitzar per al recompte presumptiu de bacteris compatibles amb *Staphylococcus* spp., atesa la seva elevada concentració de clorur sòdic i la presència de mannitol i vermell de fenol com a sistema diferencial. El VRBG es va emprar per a l'aïllament i quantificació d'Enterobacteriaceae, grup utilitzat com a indicador de qualitat higiènica i possible contaminació fecal o ambiental. A més, es van incloure medis selectius per detectar colònies compatibles amb *Listeria* spp., *Yersinia* spp. i *Aeromonas* spp. **(Taula 2).[27]**

Taula 2. Medis de cultiu emprats i interpretació microbiològica.

Medi	**Composició orientativa per litre**	**Fonament i interpretació**	**Referència**
TSA (Tryptic Soy Agar)	Peptona de caseïna, 15,0 g; peptona de soja, 5,0 g; clorur sòdic, 5,0 g; agar, 15,0 g.	Medi no selectiu d'ús general que permet el creixement d'un ampli espectre de microorganismes no exigents i moderadament exigents. En aquest treball es va utilitzar per estimar la microbiota total cultivable.	Fitxa tècnica TSA; recomanat com a medi general segons estàndards ISO/farmacopees.

Agar Chapman / MSA (Mannitol Salt Agar)	Extracte de carn, 1,0 g; peptona, 10,0 g; NaCl, 75,0 g; mannitol, 10,0 g; vermell de fenol, 0,025 g; agar, 15,0 g; aigua destil·lada, 1.000 mL; pH aproximat 7,4.	Medi selectiu i diferencial. L'elevada concentració de NaCl inhibeix bona part de la microbiota acompanyant i afavoreix el creixement d'estafilococs halotolerants. La fermentació del mannitol acidifica el medi i produeix viratge groc; en canvi, les colònies no fermentadores mantenen el medi rosat o vermellós. Les colònies s'han d'interpretar com a presumptives de Staphylococcus spp.	Protocol de l'American Society for Microbiology per a MSA.
Medi selectiu cromogènic per a Listeria, tipus ALOA/Ottaviani & Agosti	Peptona de carn, 18,0 g; digest de caseïna, 6,0 g; extracte de llevat, 10,0 g; piruvat sòdic, 2,0 g; glucosa, 2,0 g; glicerofosfat magnèsic, 1,0 g; sulfat magnèsic, 0,5 g; NaCl, 5,0 g; clorur de liti, 10,0 g; hidrogenfosfat disòdic, 2,5 g; substrat cromogènic BCI-glucopiranòsid, 0,05 g; àcid nalidíxic, 0,02 g; ceftazidima, 0,02 g; polimixina B, 76,7 UI; cicloheximida, 0,05 g; fosfatidil-inositol, 2,0 g; agar, 12,0 g.	Medi selectiu per a l'aïllament de Listeria spp. i la identificació presumptiva de L. monocytogenes. La selectivitat depèn sobretot del clorur de liti i dels antimicrobians. El substrat cromogènic permet detectar activitat β-glucosidasa present en Listeria spp.; el fosfatidil-inositol ajuda a diferenciar presumptivament L. monocytogenes i algunes soques de L. ivanovii.	Medi cromogènic per a Listeria segons ISO 11290-1.

Medi selectiu per a Yersinia, tipus CIN agar / YSA	Peptona especial, 20,0 g; extracte de llevat, 2,0 g; mannitol, 20,0 g; piruvat sòdic, 2,0 g; NaCl, 1,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g aproximadament; agar, 12,0 g; aigua destil·lada. S'hi afegeixen components selectius/diferencials com desoxicolat sòdic, vermell neutre, cristall violeta, cefsulodina, Irgasan i novobiocina.	Medi selectiu i diferencial per a l'aïllament presumptiu de Yersinia spp., especialment Y. enterocolitica. Els agents selectius inhibeixen part de la microbiota acompanyant, mentre que el mannitol i el vermell neutre permeten observar colònies compatibles. En aquest treball, els resultats s'han d'expressar com a creixement compatible amb Yersinia spp., no com a identificació definitiva si no hi ha confirmació molecular o bioquímica.	FDA-BAM, medi CIN/YSA per a Yersinia.
ADA / ADA-V (Ampicillin-Dextrin Agar amb vancomicina)	Triptosa, 5,0 g; dextrina, 11,4 g; extracte de llevat, 2,0 g; NaCl, 3,0 g; KCl, 2,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,06 g; blau de bromotimol, 0,08 g; desoxicolat sòdic; ampicil·lina i vancomicina com a agents selectius.	Medi selectiu/orientatiu per al recompte presumptiu d'Aeromonas spp. La fermentació de la dextrina genera acidificació i colònies grogues. L'EPA indica que les colònies grogues en ADA-V són presumptivament positives i que cal confirmar-les mitjançant oxidasa, fermentació de trehalosa i producció d'indol. Per tant, en el TFG és millor parlar de "colònies	Mètode EPA 1605; basat en Havelaar et al. per a l'enumeració d'Aeromonas.

		compatibles amb Aeromonas spp.”.	
VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar)	Peptona de gelatina, 7,0 g; extracte de llevat, 3,0 g; NaCl, 5,0 g; sals biliars, 1,5 g; glucosa, 10,0 g; vermell neutre, 0,03 g; cristall violeta, 0,002 g; agar, 13,0 g; pH final 7,4 ± 0,2.	Medi selectiu i diferencial per a l’aïllament i enumeració d’Enterobacteriaceae. Les sals biliars i el cristall violeta inhibeixen bona part dels bacteris grampositius. Les enterobacteriàcies formen habitualment colònies de color porpra fosc amb halo vermellós de precipitació. En aliments, és un indicador útil de qualitat higiènica i contaminació ambiental o fecal.	Fitxa tècnica VRBG i normes ISO 21528-1/21528-2 per a detecció i recompte d’Enterobacteriacea e.

En aquests casos, els resultats es van interpretar de manera presumptiva, ja que el creixement en medis selectius no permet, per si sol, confirmar la identificació a nivell de gènere o espècie. Per aquest motiu, les colònies representatives obtingudes en aquests medis es van considerar candidates per a una posterior confirmació mitjançant proves bioquímiques o identificació molecular basada en la seqüenciació del gen 16S rRNA**.[28]**

5.3 Aïllament microbiològic

De cada mostra es va prendre una porció representativa de 10 g de forma asèptica, amb ganivet i pinces metàl·liques estèrils. Aquesta porció es va transferir a una bossa estèril i es va homogeneïtzar amb 90 mL d’aigua peptonada tamponada estèril mitjançant un *stomacher* durant 1–2 minuts al màxim de rpm, amb l’objectiu d’obtenir una dilució inicial 10^{-1} i assegurar una dispersió adequada dels microorganismes presents en la matriu alimentària**[29].** A partir d’aquesta suspensió inicial, es van preparar dilucions seriades decimals fins a 10^{-6} mitjançant la transferència d’un mL de mostra, amb micropipeta amb puntes blaves d’un sol ús, a 9 mL de solució fisiològica dins de tubs d’assaig de 20 mL estèrils, homogeneïtzant les dilucions amb vòrtex. De les dilucions seleccionades, es van sembrar 100 µL sobre els diferents medis de cultiu emprant micropipeta amb puntes grogues d’un

sol ús. L'inòcul es va distribuir homogèniament amb una espàtula Drigalsky estèril, amb la finalitat d'aïllar i quantificar la microbiota bacteriana cultivable present en les hamburgueses.**[29]**

Les plaques es van incubar en les condicions de temperatura i temps establertes per a cada medi de cultiu, generalment entre 30 i 37 °C durant 24–48 hores. Un cop finalitzada la incubació, es va realitzar el recompte de les colònies i es van seleccionar colònies representatives segons la seva morfologia colonial —forma, mida, color, textura, relleu i aspecte superficial— per a la seva posterior identificació preliminar i, si escau, confirmació molecular. Els resultats es van expressar com a unitats formadores de colònia per gram de mostra (UFC/g), considerant el factor de dilució corresponent i el volum sembrat en cada placa. **[30]**

5.4 Identificació preliminar de colònies

Per a la identificació preliminar dels bacteris presents a les mostres analitzades, es van seleccionar vuit colònies representatives de cada medi de cultiu selectiu després del període d'incubació. La selecció es va dur a terme en funció de les característiques macroscòpiques de les colònies, incloent-hi la forma, la mida, el color, la textura, el relleu, el marge i l'aspecte superficial, amb l'objectiu d'obtenir una representació tan àmplia com fos possible de la diversitat microbiana cultivable detectada en cada mostra. **[31]**

L'observació de la morfologia colonial es va considerar una primera aproximació a la identificació microbiològica, especialment en medis selectius i diferencials, en els quals determinats grups bacterians poden presentar patrons de creixement característics. No obstant això, aquesta identificació es va interpretar com a presumptiva, ja que la morfologia colonial i el creixement en medis selectius no permeten confirmar de manera definitiva la identitat taxonòmica dels microorganismes.**[32]**

5.5 Anàlisi estadística

Els recomptes microbiològics obtinguts en els diferents medis de cultiu es van expressar com a unitats formadores de colònia per gram de mostra (UFC/g). Per a cada combinació de medi de cultiu, tipologia d'hamburguesa i temps d'emmagatzematge, es van calcular la mitjana i la desviació estàndard a partir de les tres rèpliques independents. Les comparacions entre les hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) i les hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) es van realitzar de manera independent per a cada medi de cultiu i per a cada temps d'emmagatzematge —dies 0, 3 i 7—. L'objectiu d'aquesta anàlisi va ser determinar si les diferències observades en els recomptes microbians entre ambdues tipologies de producte eren estadísticament significatives. Abans de la comparació entre grups, els recomptes microbians es van

revisar per detectar possibles valors extrems i per valorar-ne la distribució. Quan va ser necessari, els valors es van transformar a escala logarítmica decimal per facilitar la interpretació microbiològica i reduir l'efecte de les diferències d'ordre de magnitud entre recomptes. L'anàlisi estadística es va dur a terme mitjançant Microsoft Excel, utilitzant una prova *t* de Student per a dues mostres independents, amb contrast bilateral. Les diferències entre grups es van considerar estadísticament significatives quan el valor de *p* va ser inferior a 0,05.**[32]** Els valors de *p* obtinguts es van incorporar a la interpretació dels resultats per diferenciar entre canvis descriptius i diferències estadísticament significatives. Les gràfiques es van elaborar a partir dels valors mitjans de les tres rèpliques de cada tipologia d'hamburguesa. En aquestes figures es va representar l'evolució dels recomptes microbians als dies 0, 3 i 7 per als principals grups bacterians analitzats: colònies compatibles amb *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp. o microbiota relacionada, i Enterobacteriaceae. Les línies horitzontals incloses en algunes gràfiques indiquen les comparacions efectuades entre els grups representats; quan escau, la significació estadística es va interpretar d'acord amb el valor de p obtingut. Cal remarcar que, a causa del nombre reduït de rèpliques analitzades, els resultats estadístics s'han d'interpretar amb prudència. En els casos en què no es van detectar diferències estadísticament significatives, els canvis observats es van descriure com a tendències descriptives. Així mateix, el creixement en medis selectius i diferencials es va considerar una identificació presumptiva, per la qual cosa els resultats es van expressar com a colònies compatibles amb els grups bacterians diana i no com una identificació definitiva a nivell de gènere o espècie. **[33]**

6. Resultats

6.1 Recompte dels diferents medis de cultiu

n les hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats es va analitzar l'evolució de la microbiota cultivable durant l'emmagatzematge en refrigeració als dies 0, 3 i 7, utilitzant diferents medis de cultiu selectius i no selectius.

En el medi TSA es va observar un creixement incomptable en totes les rèpliques i en tots els temps analitzats, fet que indica una elevada càrrega microbiana total cultivable des de l'inici de l'estudi. Pel que fa a l'agar de Chapman, els recomptes es van mantenir, en general, al voltant de 10^2 UFC/g, amb una lleugera disminució al dia 3 i certa variabilitat entre rèpliques al dia 7.

En el medi selectiu per a Listeria, els valors van ser inferiors al límit de detecció en totes les mostres i temps analitzats, sense observar-se creixement compatible amb Listeria spp. en les condicions

assajades. En el medi selectiu per a Yersinia, els recomptes es van mantenir pròxims a 10^2 UFC/g durant els primers dies d'emmagatzematge, amb un lleuger increment al dia 7.

En el medi ADA, utilitzat per a la detecció presumptiva *d'Aeromonas spp*. o microbiota relacionada, els valors es van situar al voltant de 10^2–10^3 UFC/g als dies 0 i 3, mentre que al dia 7 es va observar una disminució clara dels recomptes. Finalment, en el medi VRBG, emprat per al recompte *d'Enterobacteriaceae,* es van detectar valors inicials de l'ordre de 10^3 UFC/g, que van disminuir de manera progressiva durant l'emmagatzematge fins a valors propers a 10^1 UFC/g al dia 7. Aquesta tendència suggereix una reducció dels bacteris cultivables compatibles amb Enterobacteriaceae durant la conservació refrigerada de les hamburgueses ecològiques **(Taula 3).**

Taula 3. Recompte de microorganismes cultivables en hamburgueses fetes amb carn ecològica. Els valors corresponen a UFC/g.

Dia	Medi	H1	H2	H3	Mitjana ± DE
0	TSA	Incomptable	Incomptable	Incomptable	No quantificable
0	Chapman	100	80	120	100,0 ± 20,0
0	*Listeria*	<10	<10	<10	<10
0	*Yersinia*	100	90	110	100,0 ± 10,0
0	ADA	500	400	600	500,0 ± 100,0
0	VRBG	5000	3000	7000	5.000 ± 2.000
3	TSA	Incomptable	Incomptable	Incomptable	No quantificable
3	Chapman	80	60	70	70,0 ± 10,0
3	*Listeria*	<10	<10	<10	<10
3	*Yersinia*	100	90	110	100,0 ± 10,0
3	ADA	500	400	600	500,0 ± 100,0
3	VRBG	100	80	110	96,7 ± 15,3
7	TSA	Incomptable	Incomptable	Incomptable	No quantificable
7	Chapman	500	40	60	200,0 ± 260,0
7	*Listeria*	<10	<10	<10	<10
7	*Yersinia*	200	150	250	200,0 ± 50,0
7	ADA	50	47	67	54,7 ± 10,8
7	VRBG	43	40	50	44,3 ± 5,1

En les hamburgueses de producció convencional amb sulfits es va analitzar l'evolució de la microbiota cultivable durant l'emmagatzematge en refrigeració als dies 0, 3 i 7. En el medi TSA es va observar creixement incomptable en totes les rèpliques i en tots els temps analitzats, fet que indica una càrrega microbiana total cultivable elevada i persistent al llarg del període d'estudi. En l'agar de Chapman, els recomptes inicials es van situar al voltant de 10^2 UFC/g i van mostrar una lleugera tendència descendent durant l'emmagatzematge, amb valors propers a 2×10^2 UFC/g al dia 7. Aquest resultat indica la presència de bacteris compatibles amb *Staphylococcus* spp., tot i que la seva identificació s'ha de considerar presumptiva en absència de confirmació molecular. En el medi selectiu per a *Listeria*, els recomptes van ser de l'ordre de 10^2 UFC/g al dia 0, van disminuir fins a valors propers al límit de detecció al dia 3 i van augmentar lleugerament al dia 7, amb valors de l'ordre de 10^1 UFC/g. Aquest patró suggereix una presència baixa i variable de colònies compatibles amb *Listeria* spp. en les mostres amb additius. En el medi selectiu per a *Yersinia*, els recomptes van augmentar entre el dia 0 i el dia 3, passant de valors de l'ordre de 10^2 UFC/g a aproximadament 10^3 UFC/g. Posteriorment, al dia 7, es va observar una disminució parcial, tot i que els valors es van mantenir superiors als inicials. Aquesta evolució indica un increment transitori de colònies compatibles amb Yersinia spp. durant els primers dies d'emmagatzematge refrigerat. En el medi ADA, utilitzat per a la detecció presumptiva d'Aeromonas spp. o microbiota relacionada, es va observar una disminució marcada dels recomptes entre el dia 0 i el dia 3, passant de valors de l'ordre de 10^3 UFC/g a valors de l'ordre de 10^2 UFC/g. Al dia 7, els recomptes es van mantenir dins d'aquest mateix ordre de magnitud, amb certa variabilitat entre rèpliques. Finalment, en el medi VRBG, emprat per al recompte d'Enterobacteriaceae, les hamburgueses amb additius van presentar els recomptes inicials més elevats, de l'ordre de 10^4 UFC/g. Aquests valors van disminuir clarament al dia 3 fins a l'ordre de 10^2 UFC/g i es van mantenir baixos al dia 7, tot i la variabilitat observada entre rèpliques. Aquesta tendència indica una reducció important dels bacteris cultivables compatibles amb Enterobacteriaceae durant l'emmagatzematge, malgrat l'elevada càrrega inicial detectada en aquest grup. **(Taula 4)**.

Taula 4. Recompte de microorganismes cultivables en hamburgueses fetes amb carn de vedella no ecològica. Els valors corresponen a UFC/g.

Dia	Medi	H1	H2	H3	Mitjana ± DE
0	TSA	Incomptable	Incomptable	Incomptable	No quantificable
0	Chapman	300	280	320	300,0 ± 20,0
0	*Listeria*	100	90	110	100,0 ± 10,0
0	*Yersinia*	400	350	450	400,0 ± 50,0

0	ADA	3000	2500	3500	3.000 ± 500
0	VRBG	15000	13000	17000	15.000 ± 2.000
3	TSA	Incomptable	Incomptable	Incomptable	No quantificable
3	Chapman	300	250	280	276,7 ± 25,2
3	*Listeria*	9	8	10	9,0 ± 1,0
3	*Yersinia*	1500	1200	1700	1.467 ± 252
3	ADA	200	180	220	200,0 ± 20,0
3	VRBG	300	150	250	233,3 ± 76,4
7	TSA	Incomptable	Incomptable	Incomptable	No quantificable
7	Chapman	200	180	220	200,0 ± 20,0
7	*Listeria*	50	40	36	42,0 ± 7,2
7	*Yersinia*	800	700	900	800,0 ± 100,0
7	ADA	250	90	120	153,3 ± 85,0
7	VRBG	10	80	170	86,7 ± 80,2

En conjunt, els resultats mostren una càrrega microbiana inicial molt elevada, amb estabilitat en la flora total (TSA), variacions importants segons el medi de cultiu i canvis en la dinàmica de diferents grups bacterians al llarg del temps d'emmagatzematge.

6.2 Abundància de microorganismes

Al dia 0, les hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) van presentar una càrrega microbiana inicial més elevada que les hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) en la majoria dels medis de cultiu analitzats.

Els recomptes més alts en les mostres HMB es van observar en el medi VRBG, corresponent a bacteris compatibles amb Enterobacteriaceae. També es van detectar valors elevats en el medi ADA i en el medi selectiu per a *Yersinia*, fet que suggereix una major presència inicial de microbiota compatible amb *Aeromonas* spp. o microbiota relacionada, així com de colònies compatibles amb *Yersinia* spp. En canvi, les hamburgueses ECO van mostrar recomptes inferiors en aquests mateixos grups bacterians. Els recomptes obtinguts en agar Chapman i en el medi selectiu per a *Listeria* van ser més baixos en comparació amb VRBG, ADA i el medi per a *Yersinia*. Per tant, al moment inicial de l'estudi, les diferències més marcades entre ambdues tipologies d'hamburguesa es van observar principalment en els grups bacterians indicadors d'higiene i contaminació ambiental o intestinal, especialment Enterobacteriaceae **(Figura 1)**.

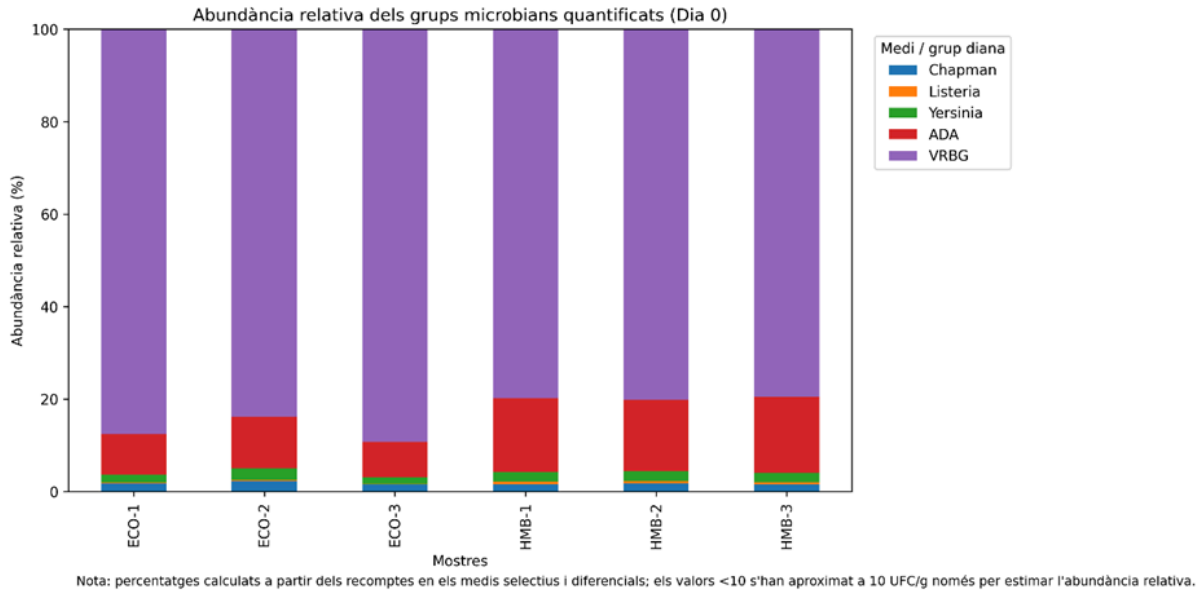


Figura 1. Abundància relativa al dia 0 dels diferents grups de microorganismes.

Al dia 3 d'emmagatzematge es van observar canvis en els recomptes microbians respecte al moment inicial, especialment en les HMB. En les ECO, els valors es van mantenir, en general, baixos i relativament estables en la majoria dels medis de cultiu, sense increments marcats respecte al dia 0. En les mostres HMB es va detectar una disminució clara dels recomptes en VRBG respecte al dia 0, fet que indica una reducció de bacteris compatibles amb Enterobacteriaceae durant els primers dies d'emmagatzematge refrigerat. En canvi, els recomptes obtinguts en el medi selectiu per a *Yersinia* van augmentar respecte al moment inicial, suggerint un increment transitori de colònies compatibles amb *Yersinia* spp. en aquestes mostres. Els recomptes en agar Chapman es van mantenir en valors moderats en ambdues tipologies d'hamburguesa, mentre que el creixement en el medi selectiu per a *Listeria* va continuar sent baix o proper al límit de detecció. En conjunt, els resultats del dia 3 indiquen una reducció dels enterobacteris en les hamburgueses HMB, però també una modificació de la composició relativa de la microbiota cultivable, amb una major contribució de colònies compatibles amb *Yersinia* spp. en comparació amb el dia 0 **(Figura 2)**.

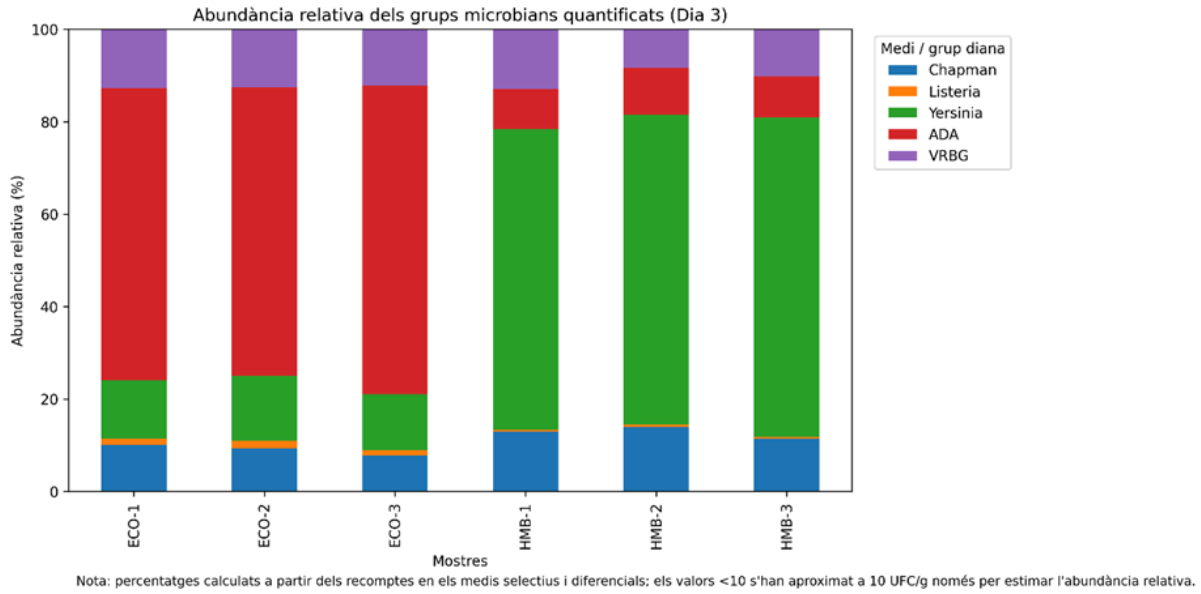


Figura 2. Abundància relativa al dia 3 dels diferents grups de microorganismes.

El dia 7 d'emmagatzematge es va observar una nova modificació dels recomptes microbians en ambdues tipologies d'hamburguesa. En les ECO, els valors globals es van mantenir baixos en la majoria dels medis de cultiu, tot i que es va detectar una presència moderada de colònies compatibles amb Enterobacteriaceae i amb *Staphylococcus* spp. en algunes rèpliques. En les HMB es va observar una major variabilitat entre els diferents grups bacterians analitzats. Els recomptes en el medi selectiu per a *Yersinia* es van mantenir superiors als observats al dia 0, encara que inferiors als del dia 3, fet que suggereix una persistència de colònies compatibles amb *Yersinia* spp. durant l'emmagatzematge refrigerat. També es va detectar un increment moderat del creixement en el medi selectiu per a *Listeria* en algunes mostres respecte al dia 3, tot i que els valors es van mantenir baixos. Els recomptes en agar Chapman van mostrar una presència més visible de colònies compatibles amb *Staphylococcus* spp. en comparació amb els primers dies d'emmagatzematge, especialment en algunes rèpliques. En canvi, els recomptes en VRBG van mantenir una tendència general descendent respecte al dia 0, indicant una reducció progressiva dels bacteris compatibles amb Enterobacteriaceae. Malgrat aquesta disminució, les mostres HMB van conservar en alguns casos valors superiors als observats en les hamburgueses ECO **(Figura 3)**.

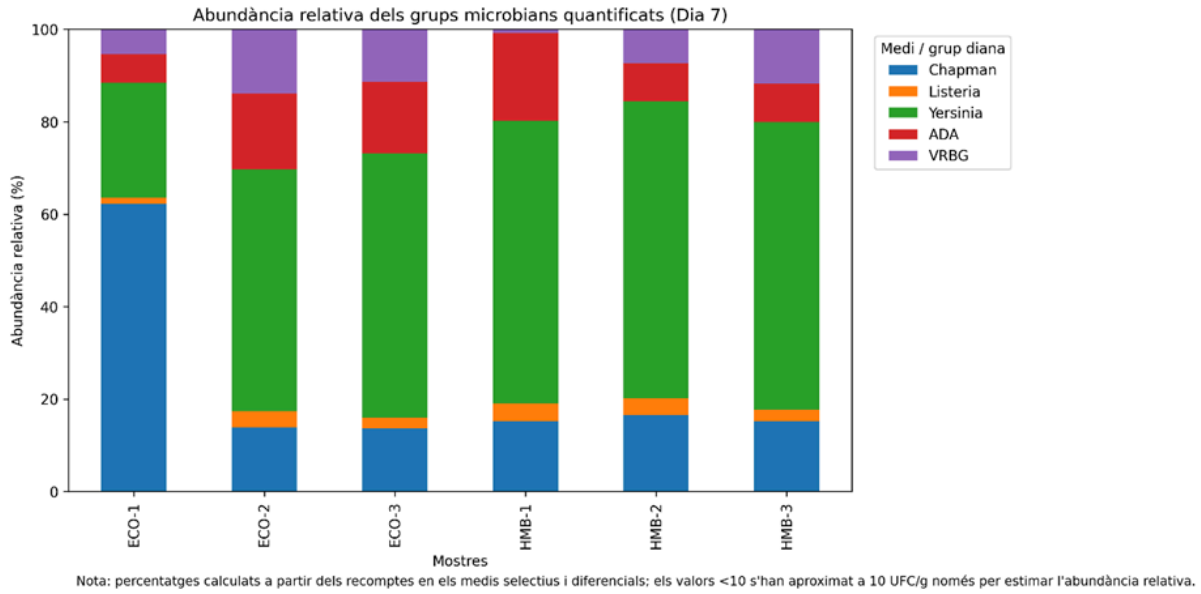


Figura 3. Abundància relativa al dia 7 dels diferents grups de microorganismes.

En conjunt, els resultats del dia 7 indiquen que, tot i la disminució d'alguns grups bacterians indicadors d'higiene, les hamburgueses amb sulfits van mostrar una microbiota cultivable més variable que les hamburgueses ecològiques, amb persistència de colònies compatibles amb alguns grups d'interès higiènic-sanitari.

6.3 Creixement o decreixement dels microorganismes durant l'emmagatzematge

Les hamburgueses ECO van mostrar valors inferiors al límit de detecció o molt baixos en el medi selectiu per a *Listeria* durant tot el període d'emmagatzematge en refrigeració, als dies 0, 3 i 7. En canvi, les hamburgueses HMB van presentar recomptes inicials de l'ordre de 10^2 UFC/g en aquest medi, una disminució clara al dia 3 i un lleuger increment al dia 7, amb valors de l'ordre de 10^1 UFC/g (Figura 4). Aquests resultats indiquen una presència més elevada de colònies compatibles amb *Listeria* spp. en les mostres HMB respecte a les ECO, especialment al moment inicial de l'estudi. Tot i això, aquesta interpretació s'ha de considerar presumptiva, ja que el creixement en medi selectiu no confirma per si sol la identificació definitiva del gènere o de l'espècie. A més, en absència d'una anàlisi estadística específica, les diferències observades s'han d'interpretar com una tendència descriptiva i no com a diferències estadísticament significatives.

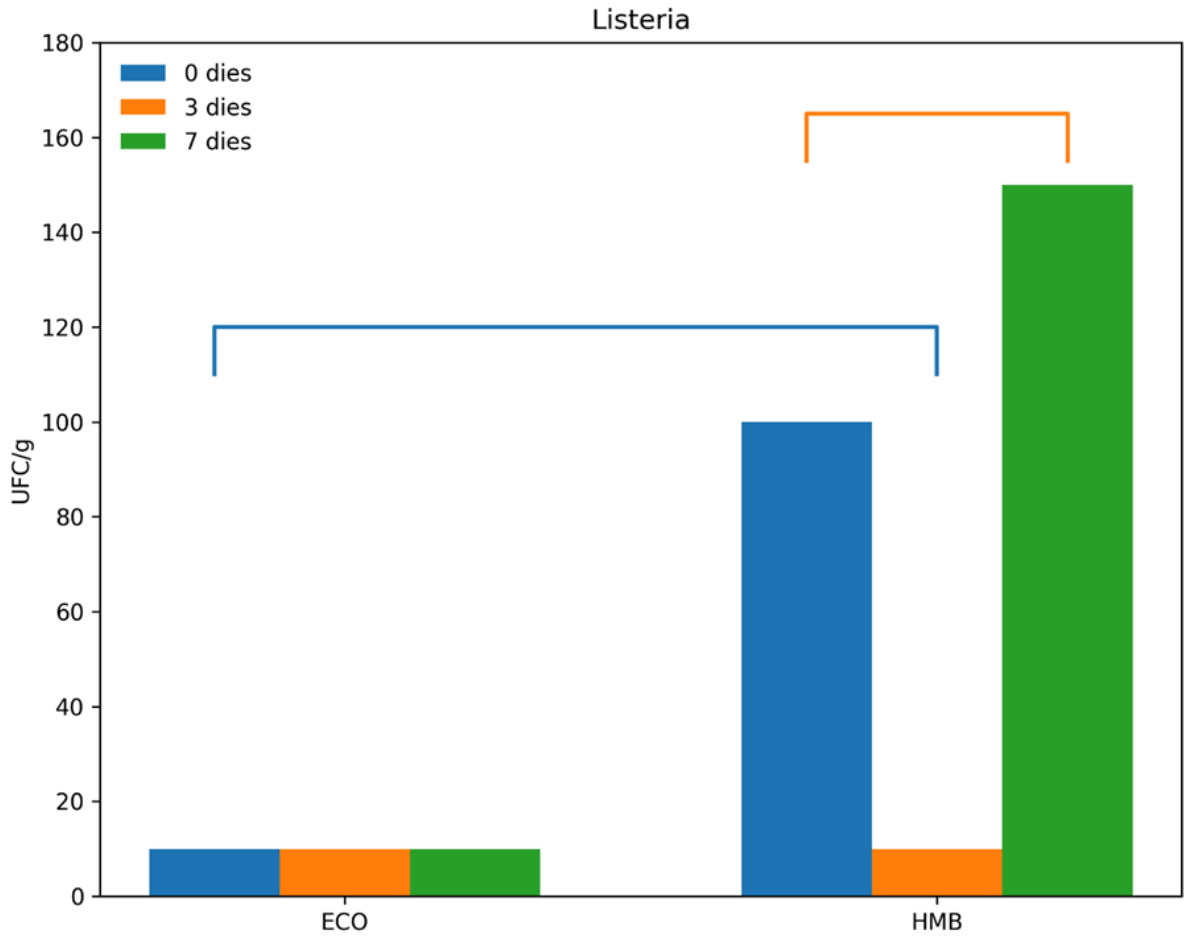


Figura 4. Recompte de colònies compatibles amb Listeria spp. en hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) i en hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) als dies 0, 3 i 7 d'emmagatzematge en refrigeració.

Les hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) van mostrar recomptes baixos o moderats en agar Chapman durant l'emmagatzematge en refrigeració. Els valors es van situar al voltant de 10^2 UFC/g al dia 0, van disminuir lleugerament al dia 3 i van presentar un augment moderat al dia 7 en algunes rèpliques. En les hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB), els recomptes en agar Chapman van ser més elevats al moment inicial, amb valors propers a 3×10^2 UFC/g. Durant l'emmagatzematge, es va observar una lleugera disminució progressiva, fins a valors pròxims a 2×10^2 UFC/g al dia 7 (Figura 5). Aquests resultats indiquen que les mostres HMB van presentar, en general, una major presència de colònies compatibles amb *Staphylococcus* spp. en comparació amb les mostres ECO, especialment als dies 0 i 3. No obstant això, aquesta identificació s'ha de considerar presumptiva, ja que el creixement en agar Chapman no permet confirmar de manera definitiva el gènere ni l'espècie bacteriana. Així mateix, en absència d'una anàlisi estadística específica, les diferències observades s'han d'interpretar com una tendència descriptiva.

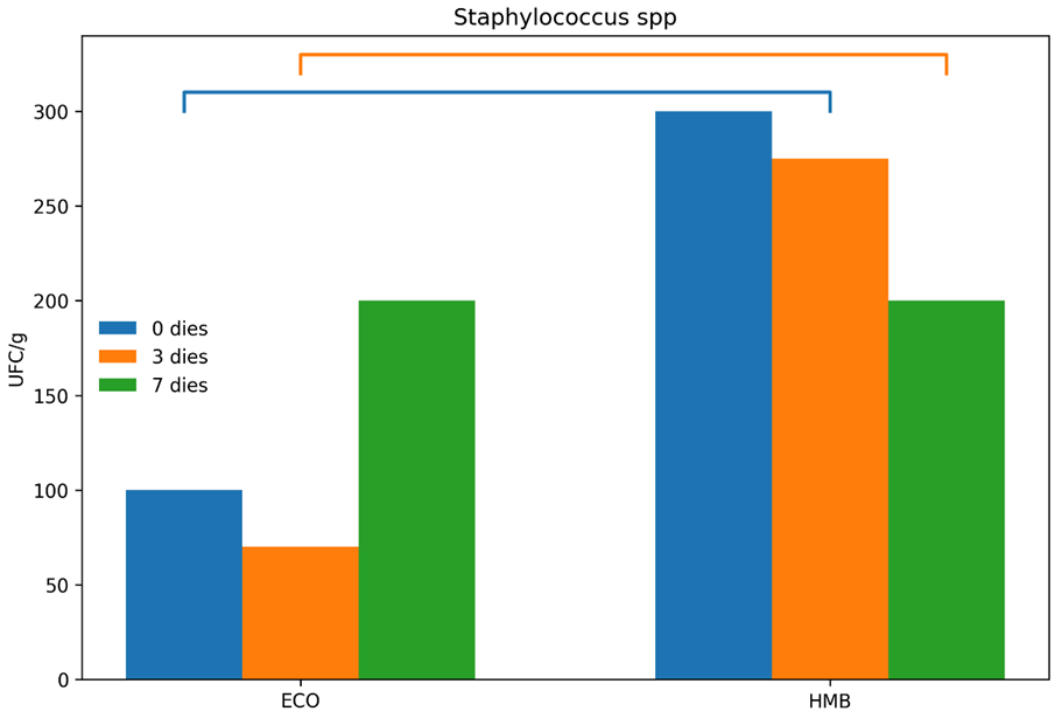


Figura 5. Recompte de colònies compatibles amb Staphylococcus spp. en hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) i en hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) als dies 0, 3 i 7 d'emmagatzematge en refrigeració.

Les hamburgueses ECO van presentar recomptes baixos de colònies compatibles amb *Yersinia* spp. durant tot el període d'emmagatzematge en refrigeració. Els valors es van situar al voltant de 10^2 UFC/g al dia 0 i es van mantenir dins del mateix ordre de magnitud al dia 3, amb un lleuger increment al dia 7 en algunes rèpliques. En canvi, les hamburgueses HMB van mostrar un augment clar dels recomptes en el medi selectiu per a *Yersinia* al dia 3, assolint valors de l'ordre de 10^3 UFC/g. Posteriorment, al dia 7 es va observar una disminució parcial, tot i que els recomptes es van mantenir per sobre dels valors inicials (Figura 6). Aquests resultats suggereixen una major presència de colònies compatibles amb *Yersinia* spp. en les mostres HMB, especialment al dia 3 d'emmagatzematge. No obstant això, aquesta interpretació s'ha de considerar presumptiva, ja que el creixement en medi selectiu no confirma per si sol la identitat del microorganisme. Així mateix, en absència d'una anàlisi estadística específica, les diferències observades s'han d'interpretar com una tendència descriptiva i no com a diferències estadísticament significatives.

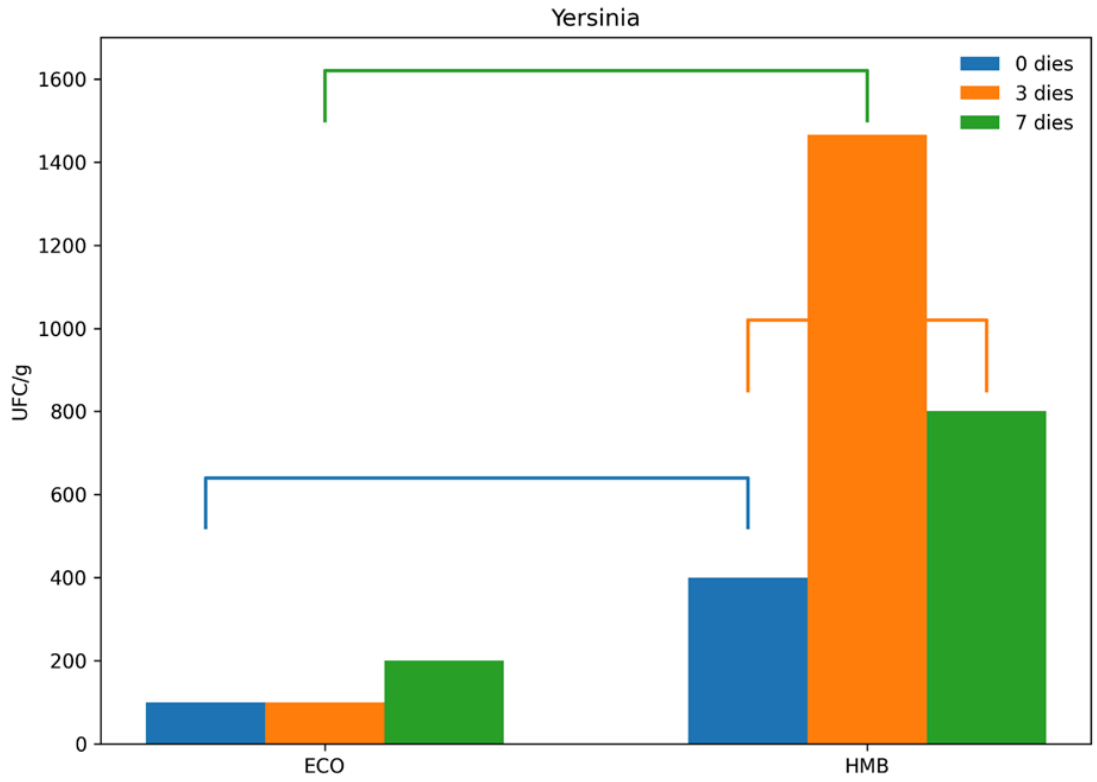


Figura 6. Recompte de colònies compatibles amb Yersinia spp. en hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) i en hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) als dies 0, 3 i 7 d'emmagatzematge en refrigeració.

En el medi ADA, utilitzat per a la detecció presumptiva de colònies compatibles amb *Aeromonas* spp. o microbiota relacionada, les hamburgueses ECO van mostrar recomptes moderats als dies 0 i 3, amb valors de l'ordre de 10^2 UFC/g. Al dia 7 es va observar una disminució marcada dels recomptes. Per contra, les hamburgueses HMB van presentar una càrrega inicial clarament superior en aquest medi, amb valors de l'ordre de 10^3 UFC/g al dia 0. Posteriorment, es va detectar una reducció important dels recomptes als dies 3 i 7, situant-se en valors propers a 10^2 UFC/g (Figura 7). En conjunt, aquests resultats indiquen que les mostres HMB van presentar una major abundància inicial de colònies compatibles amb *Aeromonas* spp. o microbiota relacionada respecte a les mostres ECO. No obstant això, aquesta diferència es va reduir durant l'emmagatzematge en refrigeració, especialment a partir del dia 3.

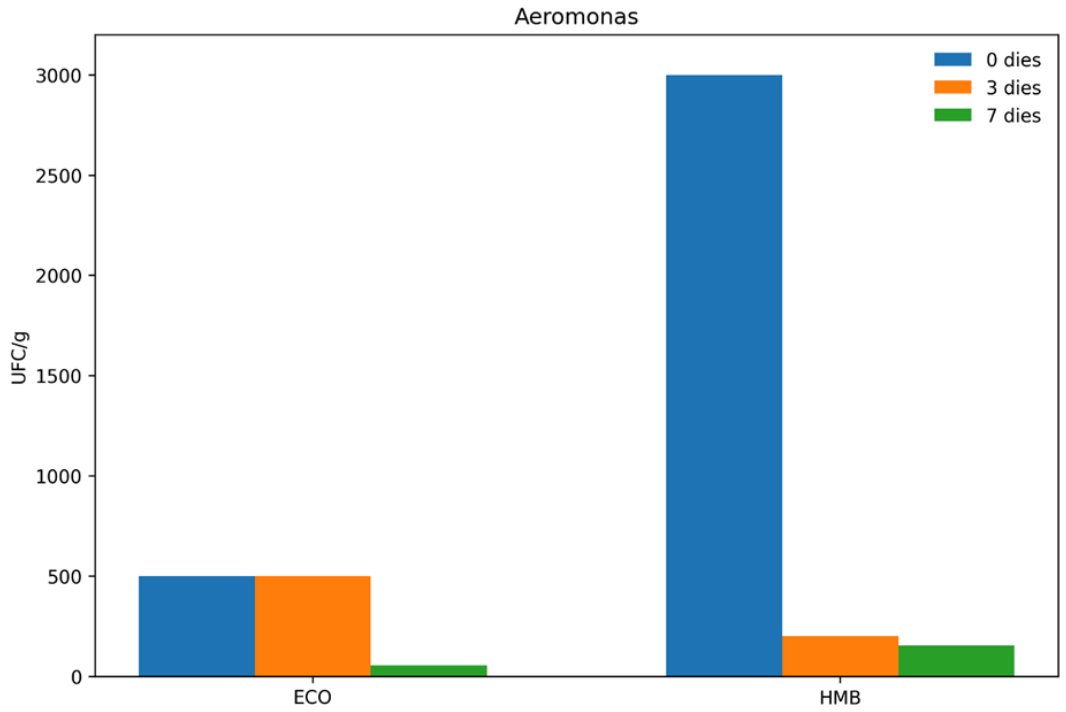


Figura 7. Recompte de colònies compatibles amb Aeromonas spp. o microbiota relacionada en hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) i en hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) als dies 0, 3 i 7 d'emmagatzematge en refrigeració.

Finalment, els recomptes en medi VRBG, emprat per a l'aïllament i quantificació d'Enterobacteriaceae, van mostrar algunes de les diferències més marcades entre les dues tipologies d'hamburguesa. Les mostres de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) van presentar valors inicials de l'ordre de 10^3 UFC/g, seguits d'una disminució progressiva durant l'emmagatzematge en refrigeració, fins a assolir valors propers a 10^1 UFC/g al dia 7. En canvi, les hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) van registrar una càrrega inicial clarament més elevada en aquest medi, amb valors de l'ordre de 10^4 UFC/g al dia 0. Posteriorment, els recomptes van disminuir de manera considerable als dies 3 i 7, situant-se en valors molt inferiors als inicials (Figura 8). Aquests resultats indiquen que les mostres HMB presentaven una major càrrega inicial de bacteris compatibles amb Enterobacteriaceae en comparació amb les mostres ECO. Aquesta diferència podria estar relacionada amb factors previs al moment de l'anàlisi, com la matèria primera, el processament, la manipulació, l'envasament o les condicions de conservació del producte, més que no pas atribuir-se exclusivament a la presència de sulfits.

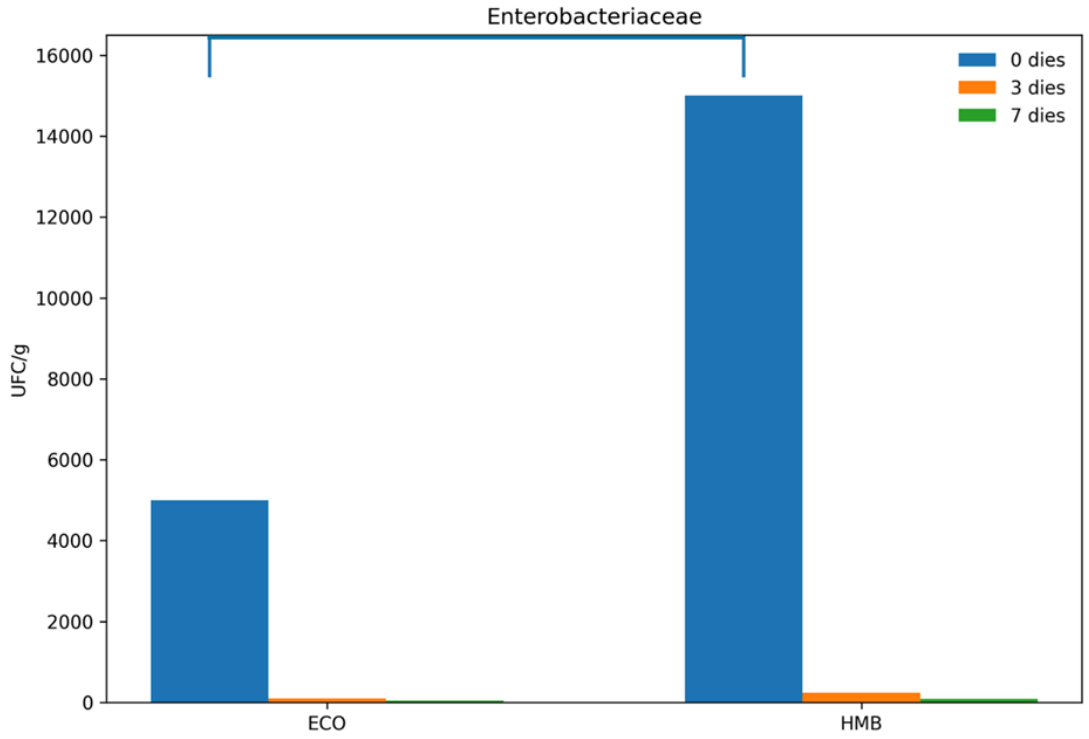


Figura 8. Recompte de bacteris compatibles amb Enterobacteriaceae en hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats (ECO) i en hamburgueses de producció convencional amb sulfits (HMB) als dies 0, 3 i 7 d'emmagatzematge en refrigeració.

7. Discussió

Els resultats obtinguts evidencien diferències en la càrrega microbiològica i en l'evolució temporal de la microbiota cultivable entre les hamburgueses de vedella ecològica sense conservants declarats i les hamburgueses de producció convencional amb sulfits durant l'emmagatzematge en refrigeració. En ambdues tipologies de mostra, el medi TSA va presentar un creixement molt elevat, en molts casos incomptable, durant tot el període experimental. Aquest resultat confirma l'elevada càrrega microbiana total associada a la carn picada, una matriu especialment susceptible al creixement bacterià a causa de la seva elevada activitat d'aigua, el pH proper a la neutralitat, l'alt contingut nutricional i l'increment de superfície exposada derivat del procés de picat **[23]**.

Contràriament al que es podria esperar segons la hipòtesi inicial, les hamburgueses amb sulfits no van mostrar una reducció clara de la càrrega microbiana respecte a les hamburgueses ecològiques sense conservants declarats. De fet, en diversos medis selectius, especialment VRBG i ADA, les mostres HMB van presentar recomptes inicials superiors als de les mostres ECO. Aquest resultat suggereix que la presència de conservants no garanteix necessàriament una menor contaminació microbiològica del producte final, ja que la càrrega microbiana inicial pot estar fortament

condicionada per la qualitat de la matèria primera, les condicions higièniques durant el processament, el tipus d'envasament i la conservació prèvia del producte **[24]**.

Els additius alimentaris presents en els productes càrnics poden incloure conservants com nitrits, lactats, sulfits i altres agents antimicrobians naturals o sintètics **[24]**. La seva funció principal és inhibir o retardar el creixement de microorganismes patògens i alterants, contribuint així a allargar la vida útil del producte. No obstant això, la seva eficàcia depèn de múltiples factors, entre els quals destaquen la concentració de l'additiu, la seva distribució dins la matriu alimentària, el tipus de microorganisme, la població inicial, la composició del producte, el pH, l'activitat d'aigua i la interacció amb altres microorganismes presents. A més, determinats bacteris, com els compatibles amb *Listeria* spp. o *Staphylococcus* spp., poden presentar una certa tolerància a condicions adverses, especialment quan es troben en biofilms o en entorns amb competència microbiana **[25][26]**.

Els resultats obtinguts en el medi VRBG van mostrar recomptes inicials més elevats en les hamburgueses HMB al dia 0, seguits d'una disminució progressiva durant l'emmagatzematge en refrigeració **[23]**. Aquesta tendència podria estar relacionada amb l'efecte de la refrigeració sobre determinats grups bacterians, amb la competència entre poblacions microbianes o amb la reducció de microorganismes més sensibles a les condicions de conservació. Atès que les Enterobacteriaceae s'utilitzen habitualment com a indicadors d'higiene i de possible contaminació fecal o ambiental, els recomptes inicials elevats observats en les mostres HMB podrien reflectir diferències en la manipulació, el processament o la qualitat microbiològica inicial de la matèria primera **[23][26]**.

En el cas del medi Chapman, les hamburgueses HMB van presentar, en general, recomptes superiors als de les hamburgueses ECO durant els primers dies d'emmagatzematge. Les anàlisis estadístiques van mostrar diferències significatives al dia 0 ($p = 0,0157$) i al dia 3 ($p = 0,0140$), mentre que al dia 7 no es van detectar diferències significatives entre ambdues tipologies de mostra ($p = 1$). Aquests resultats indiquen més presència inicial de colònies compatibles amb *Staphylococcus* spp. en les mostres HMB. Aquest grup bacterià s'associa sovint a contaminació derivada de la manipulació humana o animal, de manera que els resultats podrien estar relacionats amb les condicions higièniques de l'animal, del procés d'elaboració o de la manipulació posterior del producte **[27]**.

Pel que fa al medi selectiu per a *Listeria*, les hamburgueses ECO van mantenir valors inferiors al límit de detecció o molt baixos al llarg de tot l'estudi, mentre que les hamburgueses HMB van mostrar creixement compatible amb *Listeria* spp. des del moment inicial. Les anàlisis estadístiques només van indicar diferències significatives al dia 7 ($p = 0,0275$). La capacitat de *Listeria* spp., i especialment de *Listeria monocytogenes*, per sobreviure i multiplicar-se a temperatures de refrigeració és ben

coneguda, fet que converteix aquest grup en un indicador rellevant de seguretat alimentària en productes càrnics refrigerats **[28]**. Tot i això, cal remarcar que el creixement en un medi selectiu no confirma per si sol la identificació definitiva del microorganisme, per la qual cosa aquests resultats s'han d'interpretar com a presumptius si no van acompanyats de confirmació molecular o bioquímica.

En relació amb el medi selectiu per a *Yersinia*, ambdues tipologies de mostra van mostrar variacions al llarg del temps, amb increments puntuals durant l'emmagatzematge. No obstant això, les diferències entre ECO i HMB no van ser estadísticament significatives en cap dels dies analitzats ($p = 0,4682$; $p = 0,9201$; $p = 0,4059$). Aquest resultat indica que, tot i observar-se variacions descriptives en els recomptes, no es pot afirmar que hi hagués un efecte diferencial clar entre les dues tipologies d'hamburguesa. La capacitat de *Yersinia* spp. per persistir a baixes temperatures pot afavorir la seva supervivència en productes refrigerats, fet que justifica el seu interès en estudis de microbiologia alimentària **[13]**.

Els recomptes en el medi ADA, utilitzat per a la detecció presumptiva de colònies compatibles amb *Aeromonas* spp. o microbiota relacionada, van mostrar una disminució progressiva al llarg de l'emmagatzematge. Tot i que les mostres HMB van presentar una càrrega inicial superior, cap de les diferències entre ECO i HMB va ser estadísticament significativa en els dies analitzats ($p = 0,1033$; $p = 0,8132$; $p = 0,8521$). Aquesta reducció podria estar relacionada amb la competència microbiana, l'esgotament de nutrients, l'efecte de la refrigeració o una adaptació diferencial de les poblacions bacterianes durant el període de conservació **[29]**.

En conjunt, els resultats indiquen que la microbiota cultivable de les hamburgueses no depèn exclusivament de la presència o absència d'additius, sinó també de la contaminació inicial de la matèria primera, les condicions higièniques de l'animal, els processos d'elaboració, la manipulació, l'envasament, la refrigeració i les interaccions entre els diferents grups microbians. Tot i que els conservants tenen una funció tecnològica destinada a limitar el creixement microbià i prolongar la vida útil dels aliments, la seva eficàcia en carn picada pot veure's condicionada per la composició del producte, la resistència o tolerància de determinats microorganismes, la possible formació de biofilms i les propietats intrínseques de la matriu càrnia. Per tant, l'ús d'additius no substitueix les bones pràctiques d'higiene, elaboració i conservació, sinó que ha d'entendre's com una mesura complementària dins d'una estratègia global de seguretat alimentària.

8. Conclusió

Els resultats obtinguts en aquest treball permeten concloure que la microbiota resident de les hamburgueses de vedella varia en funció de la presència d'additius conservants i del temps d'emmagatzematge en refrigeració. Tot i que els conservants tenen com a objectiu limitar el creixement microbià i augmentar la vida útil del producte, en aquest estudi no es va observar una reducció clara ni constant de la càrrega bacteriana en les hamburgueses amb additius respecte a les hamburgueses ecològiques.

Les hamburgueses amb additius van presentar, en general, una càrrega microbiana inicial superior, especialment pel que fa als enterobacteris i Aeromonas, fet que suggereix que la qualitat microbiològica final no depèn exclusivament de la presència de conservants, sinó també de factors com la contaminació inicial de la matèria primera, les condicions higièniques durant la manipulació i els processos d'elaboració i conservació.

Durant l'emmagatzematge refrigerat es van observar canvis en la composició de la microbiota. Alguns microorganismes, com Yersinia enterocolitica i Listeria spp., van mostrar capacitat de persistència o proliferació a baixes temperatures, especialment en les hamburgueses amb additius. En canvi, altres grups bacterians, com Aeromonas i Enterobacteriaceae, van tendir a disminuir amb el temps, probablement a causa de la competència microbiana, l'esgotament de nutrients i les condicions de refrigeració.

Els resultats també posen de manifest que la carn picada constitueix una matriu especialment favorable per al desenvolupament microbià, a cause de la seva elevada activitat d'aigua, el pH proper a la neutralitat i l'alt contingut en nutrients. Això reforça la importància de mantenir una correcta cadena de fred i aplicar bones pràctiques higièniques durant tota la cadena alimentària per garantir la seguretat microbiològica del producte.

La identificació microbiològica mitjançant medis selectius i la confirmació molecular per PCR i seqüenciació del gen 16S rRNA van permetre corroborar la presència dels principals grups bacterians estudiats, aportant fiabilitat als resultats obtinguts.

En conjunt, aquest treball evidencia que l'ús d'additius conservants no garanteix per si sol una menor càrrega microbiològica ni l'eliminació de microorganismes potencialment patògens en hamburgueses de vedella. Per aquest motiu, la seguretat microbiològica dels productes càrnics ha de basar-se en una combinació de mesures, incloent-hi l'ús adequat de conservants, unes bones pràctiques d'higiene, una correcta manipulació i unes condicions adequades de refrigeració i emmagatzematge.

Finalment, els resultats obtinguts suggereixen la necessitat de continuar investigant la influència dels additius sobre la microbiota d'aquest tipus de productes, així com, les possibles implicacions que poden tenir aquests canvis microbiològics en la qualitat, vida útil dels aliments i en salut del consumidor.

9. Bibliografia

1. González-Gutiérrez, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2020). Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain. *Food Science & Nutrition*, *8*(2), 777–785.
2. Organización Mundial de la Salud. (2023, 16 de noviembre). *Aditivos alimentarios*.
3. Instituto Nacional del Consumo. (1989). *ABC de los aditivos*. Ministerio de Sanidad y Consumo.
4. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (s. f.). *Aditivos alimentarios*.
5. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2008, 16 de diciembre). *Reglamento (CE) n.º 1333/2008 sobre aditivos alimentarios*. EUR-Lex.
6. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2004, 29 de abril). *Reglamento (CE) n.º 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal*. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 139, 55–205.
7. Aditivos Alimentarios. (2016, enero). *E221 – Sulfito sódico*.
8. Comisión Europea. (s. f.). *Food and Feed Information Portal Database: Food additives*.
9. Ribeiro, A. J., Silva, F., Teixeira, P., & Saraiva, C. M. (2025). Dry-aged beef: A global review of meat quality traits, microbiome dynamics, safety, and sustainable strategies. *Journal of Food Science, 90*(10), e70589.
10. Colegio de Veterinarios de Alicante. (2020). *Guía para la determinación de la vida útil de los alimentos*.
11. Bari, M. L., Hossain, M. A., Isshiki, K., & Ukuku, D. O. (2011). Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. *Journal of Pathogens*, 2011, 420732.
12. Higiene Ambiental. (2014, 5 de septiembre). *EFSA investiga la seguridad de alargar el tiempo de almacenamiento de la carne para producir carne picada*.
13. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2021). *Guidance on date marking and related food information: Part 2 (food information)*. EFSA Journal, 19(4), e06510.
14. Federación Empresarial de Agroalimentación de la Comunidad Valenciana (FEDACOVA). (2016). *Guía de prácticas correctas de higiene del sector cárnico*.
15. El-Wehedy SE, Elshafee AK, Helal ZF, Shehab-Eldin YR, Yassin AM, Zaki HT. Contamination of meat and its products by Pseudomonas species and assessment of the antibacterial effect of clove (Syzygium aromaticum) essential oil on multidrug-resistant P. aeruginosa. Open Vet J [Internet]. 2025;15(4):1812–22. Disponible en: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12124795/

16. Rehman, S., Ullah, S., Abuzahra, M., Effendi, M. H., Budiastuti, B., Kholik, K., Munawarah, M., Zaman, A., Rahman, A. U., Malik, M. I., Ullah, S., & Rustam, S. A. (2025). Determination of risk factors for foot and mouth disease emergence in East Java, Indonesia. *Open Veterinary Journal, 15*(5), 2049–2058.
17. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2023). *Microbiological safety of aged meat*. EFSA Journal, 21(1), e07745.
18. Reis, J. O., Teixeira, L. A. C., Cunha-Neto, A., Castro, V. S., & Figueiredo, E. E. S. (2024). Listeria monocytogenes in beef: a hidden risk. *Research in Microbiology, 175*(7), 104215.
19. Heredia, N., Dávila-Aviña, J. E., Solís Soto, L., & García, S. (2014). Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. *Nacameh, 8*(Suplemento 1), 20–42.
20. Fernandez-Bravo and Figueras 2020.
21. Xing, L., Cheng, M., Wang, S., Jiang, J., Li, T., Zhang, X., Yang, J., Tian, Y., & Liu, W. (2025). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination in meat and meat products: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Microbiology, 16*, 1636622.
22. Oh, H., & Lee, J. (2024). Psychrotrophic bacteria threatening the safety of animal-derived foods: Characteristics, contamination, and control strategies. *Food Science of Animal Resources, 44*(5), 1011–1027.
23. American Society for Microbiology. (2016). Mannitol salt agar plates protocols. American Society for Microbiology.
24. Alliance Bio Expertise. (2025). Tryptic Soy Agar (TSA) (EP): Technical data sheet. A.B.E.
25. Dutscher. (2019). Listeria Chromogenic Agar (ISO 11290-1): Technical data sheet. Dutscher.
26. Havelaar, A. H., During, M., & Versteegh, J. F. M. (1987). Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of Aeromonas species in water by membrane filtration. Journal of Applied Bacteriology, 62, 279–287.
27. International Organization for Standardization. (2017). ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp.—Part 1: Detection method. ISO.
28. International Organization for Standardization. (2017). ISO 11290-2:2017. Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp.—Part 2: Enumeration method. ISO.
29. International Organization for Standardization. (2017). ISO 21528-1:2017. Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae—Part 1: Detection of Enterobacteriaceae. ISO.

30. International Organization for Standardization. (2017). ISO 21528-2:2017. Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae—Part 2: Colony-count technique. ISO.
31. MilliporeSigma. (2018). Violet Red Bile Glucose Agar: Technical data sheet. Merck KGaA.
32. U.S. Environmental Protection Agency. (2001). Method 1605: Aeromonas in finished water by membrane filtration using ampicillin-dextrin agar with vancomycin (ADA-V). Office of Water, EPA-821-R-01-034.
33. U.S. Food and Drug Administration. (2017). BAM Media M35: Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) agar or Yersinia selective agar (YSA). Bacteriological Analytical Manual.
34. Elsevier. (s. f.). Meat contamination. ScienceDirect Topics.
35. Autor desconocido. (s. f.). *[Tesis doctoral]*. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa).
36. U.S. Food and Drug Administration. (2001). *Evaluation and definition of potentially hazardous foods*.
37. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2019). *Revista del Comité Científico de la AESAN n.º 19*.
38. Rajaei, M., Moosavy, M. H., Gharajalar, S. N., & Khatibi, S. A. (2021). Antibiotic resistance in pathogenic foodborne bacteria isolated from raw kebab and hamburger: Phenotypic and genotypic study. *BMC Microbiology, 21*, 272.
39. Lee, J. C., Daraba, A., Voidarou, C., Rozos, G., El Enshasy, H. A., & Varzakas, T. (2021). Implementation of food safety management systems along with other management tools (HAZOP, FMEA, Ishikawa, Pareto): The case study of *Listeria monocytogenes* and correlation with microbiological criteria. *Foods, 10*(9), 2169.
40. Tofalo, R. (2021). Microbial dynamics in wine production. *Microorganisms, 9*(4), 700.