



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE
DIFERENTES DILUYENTES PARA LA RECUPERACIÓN DE
MICROORGANISMOS INDICADORES EN ALIMENTOS
(MESÓFILOS AEROBIOS Y COLIFORMES TOTALES),
EMPLEANDO PLACAS PETRIFILM™ 3M™**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE OLVERA BARRÓN



MEXICO CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO
VOCAL:	AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA
SECRETARIO:	AGUSTÍN REYO HERRERA
1ER SUPLENTE:	GLORIA DÍAZ RUIZ
2DO SUPLENTE:	NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

ANEXO DEL LABORATORIO 4-B EDIFICIO A DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

M. EN E. OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. ANA LILIA CRUCES MARTÍNEZ

SUSTENTANTE(S):

OLVERA BARRÓN MA. GUADALUPE

“Es importante recordar que todos tenemos magia dentro de nosotros”

J.K Rowling

“La mayoría de veces el éxito depende de saber cuánto se ha de tardar en lograrlo”

Montesquieu

Abreviaturas

- ❖ ABRV: Agar Bilis Rojo Violeta.
- ❖ AP: Agua peptonada
- ❖ APB: Agua peptonada Bufferada
- ❖ APS: Agua peptona sal
- ❖ Aw: Actividad del agua
- ❖ BAL: Bacterias Ácido Lácticas.
- ❖ BF: Buffer de Fosfatos
- ❖ BHI: Infusión cerebro corazón
- ❖ BPM: Buenas prácticas de manufactura.
- ❖ COFOCALEC: Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados.
- ❖ FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- ❖ HACCP: Sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control.
- ❖ NMP: Método del número más probable.
- ❖ NOM: Norma Oficial Mexicana.
- ❖ OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ❖ POE: Procedimiento de operación estandarizado.
- ❖ RSI: Reglamento Sanitario Internacional.
- ❖ SSI: Solución Salina Isotónica.
- ❖ TTC: Cloruro de Trifenil Tetrazolio.
- ❖ UFC: Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	III
❖ TABLAS	III
❖ FIGURAS	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
1.1 OBJETIVO GENERAL	4
1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	4
1.3 HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 INOCUIDAD ALIMENTARIA	6
2.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS	10
2.3 GENERALIDADES SOBRE MICROORGANISMOS INDICADORES	11
2.4. CUENTA EN PLACA	13
2.4.1. <i>Mesófilos aerobios</i>	15
2.4.2. <i>Coliformes totales</i>	17
2.5. TENDENCIAS EN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	19
2.6 PLACAS PETRIFILM	22
2.6.1 <i>Placas para el recuento de aerobios o Petrifilm AC (Aerobic Count)</i>	24
2.6.2 <i>Placas para el recuento de coliformes o Petrifilm CC (Coliform Count)</i>	25
2.7 DILUYENTES MICROBIOLÓGICOS	25
2.7.1 <i>Agua peptonada bufferada</i>	28
2.7.2. <i>Buffer de Fosfatos</i>	28
2.7.3. <i>Agua peptonada al 0.1%</i>	29
2.7.4. <i>Solución peptona-sal</i>	29
COMO PUEDE APRECIARSE, HAY DIFERENCIAS ENTRE LOS DILUYENTES, QUE PERMITEN SUPONER DIFERENCIAS EN EL DESEMPEÑO, EN LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS. 30	
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	31
3.1 ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS	31
3.2 EVALUACIÓN DE DILUYENTES	32
3.2.1 <i>Evaluación de diluyentes en la determinación de Coliformes Totales</i>	32
3.2.1 <i>Evaluación de diluyentes para la determinación de mesófilos aerobios</i>	33
3.3 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS COMERCIALES	33
3.3.1 <i>Análisis de matrices con poblaciones conocidas</i>	34
3.3.2 <i>Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales en Matrices Semisólidas</i>	36
3.3.3 <i>Análisis de las matrices semisólidas sin dilución</i>	37

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 PRIMERA ETAPA: RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CEPAS	38
TABLA 2. ESTANDARIZAIÓN DE CEPAS	38
4.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS DILUYENTES EN LAS DETERMINACIONES DE MESÓFILOS AEROBIOS Y COLIFORMES TOTALES.	39
4.3 SEGUNDA ETAPA: CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES	45
4.4 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PRODUCTOS COMERCIALES INOCULADOS, CON Y SIN DILUCIÓN DE LA MUESTRA.....	46
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	49
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA	51

Índice de Tablas y Figuras

❖ Tablas

Tabla 1. Diluyentes indicados en las Normas.....	27
Tabla 2. Estandarización de Cepas	38
Tabla 3. Resultados de los diluyentes probados en la determinación de mesófilos aerobios utilizando inóculo conocido (32 determinaciones).	39
Tabla 4. Resultados de los diluyentes probados en la determinación de coliformes totales, utilizando inóculo conocido (32 determinaciones).	39
Tabla 5. Media y desviación estándar por diluyente para todas las determinaciones.	40
Tabla 6. Media y desviación estándar por método y diluyente para todas las determinaciones.	41
Tabla 7. Media y desviación estándar para mesófilos aerobios y coliformes totales por ambos métodos.....	42
Tabla 8. Especificaciones microbiológicas para los productos analizados, con base en la NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Cap. 6, inciso 6.1.8.1.....	45
Tabla 9. Resultados de la caracterización microbiológica de los productos comerciales.	46
Tabla 10. Resultados del análisis de productos comerciales inoculados con poblaciones conocidas	47

❖ Figuras

Figura 1. Manejo e inoculación de Placas Petrifilm	31
Figura 2. Diagrama de bloques para la estandarización de cepas por Métodos Tradicional y Petrifilm	32
Figura 3. Diagrama de bloques de la Caracterización Microbiologica del producto.	34
Figura 4. Diagrama de bloques de las determinaciones de Mesófilos aerobios y COLiformes totales con inóculo conocido.	35
Figura 5. Diagrama del análisis de las matrices con carga microbiana conocida, sin diluir y con dilución de Buffer de Fosfatos.	37
Figura 6. Interacción diluyente-método para determinación de mesófilos aerobios.	43
Figura 7. Interacción diluyente-método para determinación de coliformes totales.	44

RESUMEN

En el análisis microbiológico de alimentos hay muchos factores que pueden afectar el resultado final. Es muy importante confiar en que están aplicando las condiciones ideales para recuperar a los microorganismos presentes en el alimento analizado, de manera que puedan emitir resultados confiables. Uno de dichos factores, es el diluyente en el cual se preparan las diluciones decimales que permiten el recuento de microorganismos; generalmente se cuentan los microorganismos indicadores de inocuidad y de calidad.

El objetivo del proyecto fue comparar el efecto de los diluyentes más utilizados en el análisis microbiológico de alimentos, tanto en los métodos tradicionales de análisis (indicados en las NOM de dichos productos), como en Placas Petrifilm 3M. Los diluyentes evaluados fueron los mencionados en las NOM de los métodos en cuestión y de productos lácteos. Dichos diluyentes son: agua peptonada, buffer de fosfatos, diluyente de peptona-sal y solución salina isotónica. Las matrices alimenticias utilizadas fueron lácteos semisólidos: crema de leche, yogur natural y postre de arroz con leche. Se determinaron los dos principales indicadores: Mesófilos aerobios y Coliformes totales. En la primera etapa se evaluó el efecto de los diluyentes en las determinaciones mencionadas, inoculando los productos con cultivos estandarizados de mesófilos aerobios y de coliformes. En la segunda etapa se caracterizaron los productos por su calidad microbiológica y se inocularon con poblaciones conocidas para determinar si hay o no efecto de la dilución en los resultados, ya que se ha vuelto práctica común en la industria el sembrar los alimentos semisólidos sin diluir. Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM.

Los resultados se analizaron para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los diluyentes evaluados, (por método tradicional y por Petrifilm), para las determinaciones de mesófilos aerobios y de coliformes totales,

en las matrices alimentarias mencionadas. Y se estableció claramente la importancia de la dilución en las determinaciones microbiológicas en cuestión.

INTRODUCCIÓN

Los productos lácteos son parte importante de la alimentación cotidiana de la población de todas las edades, debido a que aportan nutrientes importantes para el organismo, en especial proteína de origen animal, con un alto valor biológico (caseína), calcio, vitaminas A, B, D y E; en algunas ocasiones también aportan probióticos. Todo ello hace que sean productos de gran demanda. Además los productos lácteos, por su origen animal son relativamente caros y por su misma calidad nutricia, son altamente perecederos (Ramírez, 2012). Dentro de este grupo de trabajo se han estudiado Placas Petrifilm también para matrices representativas de otros grupos de alimentos como Cárnicos (Duran, 2013), Harinas (Sanabria, en revisión), Jugos (Márquez, 2011).

Por todas estas razones la industria productora de lácteos tiene que hacer muchos análisis a lo largo de la producción y se necesitan resultados rápidos, de fácil interpretación y gran confiabilidad, para asegurar por una parte, la inocuidad y la calidad a lo largo de toda la vida de anaquel del alimento, y por otra parte, para garantizar que se cumple con la normatividad aplicable en el lugar donde se comercializan los alimentos (Fung, 2002).

Dentro de los análisis que tiene que llevar a cabo la industria de productos lácteos, los microbiológicos generalmente son los más largos, laboriosos y complicados. En la actualidad la tecnología ha generado métodos microbiológicos rápidos y/o listos para usar, que conjuntan varias características, especialmente tiempos más cortos para obtención de resultados, preparativos mínimos, facilidad de interpretación y, algo muy importante, una excelente estandarización.

Entre los métodos microbiológicos de esta gama destacan las Placas 3M™ Petrifilm, que cuentan con aprobaciones de organismos internacionales, como AOAC, AFNOR y COFOCALEC (3M México, 2012). Se ha reportado la importancia de validar estos métodos nuevos cuando se aplican a diferentes

productos, sobre todo si se trata de matrices de alta complejidad que pueden interactuar durante los análisis (Barembuem, 2003; Ramírez, 2012).

Tanto la metodología de referencia (de las NOM) como estos productos novedosos, rápidos y muy cómodos de usar e interpretar, proponen varios diluyentes para la preparación de las muestras. Pero no hay guías o criterios para la selección de los diluyentes y es muy posible que, como componentes del sistema, afecten los resultados finales de los análisis. En una búsqueda que incluyó *International Journal of Food Microbiology*, *Current Microbiology* y *Food Analytical Methods* (a través de *dgibiblio. Unam*), sobre efecto de los diluyentes en análisis microbiológicos y/o en validación de métodos microbiológicos, solo se encontraron dos reportes publicados sobre el efecto de los diluyentes (Torres y cols, 2012; Gautier, 1987); y un artículo que los considera al evaluar diferentes kits para análisis microbiológico (Bernal-Guadarrama y cols, 2015). También se ha notado que algunos reportes de evaluación de calidad microbiológica y/o de identificación de agentes etiológicos de ETA reportan el método de cuantificación o de aislamiento de los microorganismos sin especificar cuál de los diluyentes que la metodología menciona, fue utilizado (Tejedor, 2015; Gutiérrez, 2014; Díaz Pérez, 2013; Tryness y cols, 2011; Zamora y cols, 2012; Peña et al., 2015).

A través de este trabajo se ha evaluado el efecto de los diferentes diluyentes considerados en las metodologías tradicionales y en Petrifilm, sobre la recuperación de los microorganismos presentes en alimentos lácteos semisólidos; se evaluaron tanto en el análisis de muestras comerciales de las matrices mencionadas como en muestras inoculadas con cantidades conocidas de los indicadores considerados en el estudio. Los resultados obtenidos permitirán seleccionar los diluyentes para obtener los resultados más confiables en los análisis.

Mientras se desarrollaba el trabajo, se encontró que en la industria láctea se acostumbra analizar algunas muestras semisólidas sin diluir. Considerando que en el alimento hay factores como actividad acuosa (A_w), acidez, pH y fuerza iónica,

que influyen en la conservación del alimento y que son afectados al diluir la muestra, lo cual favorece la recuperación de los microorganismos que pueden estar presentes, se decidió evaluar también si la práctica de no diluir las muestras semisólidas, afecta la recuperación de los microorganismos presentes.

Capítulo 1. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1.1 Objetivo General

- ✓ Evaluar el desempeño de cuatro diferentes diluyentes aceptados en la metodología tradicional y en metodología Petrifilm, para el recuento de microorganismos indicadores: agua peptonada 1%, solución peptona-sal, agua peptonada-bufferada, buffer de fosfatos.

1.2 Objetivos Particulares

- ✓ Determinar si hay diferencias significativas en los resultados de recuento de mesófilos aerobios en muestras de lácteos semisólidos, con los 4 diluyentes en estudio, tanto por método tradicional como en Petrifilm™AC.
- ✓ Determinar si hay diferencias significativas en los resultados de recuento de coliformes totales en muestras de lácteos semisólidos, con los 4 diluyentes en estudio, tanto por método tradicional como en Petrifilm™CC.
- ✓ Determinar si hay diferencias significativas en los resultados de recuento de mesófilos aerobios en muestras de lácteos semisólidos inoculados con población conocida, con los 4 diluyentes en estudio, tanto por método tradicional como en Petrifilm™AC.
- ✓ Determinar si hay diferencias significativas en los resultados de recuento de coliformes totales en muestras de lácteos semisólidos inoculados con población conocida, con los 4 diluyentes en estudio, tanto por método tradicional como en Petrifilm™CC.
- ✓ Evaluar el efecto de sembrar muestras semi-sólidas sin dilución y con los diluyentes en estudio.

1.3 Hipótesis

- ✓ Si todos los diluyentes en estudio son igualmente adecuados para el recuento de microorganismos indicadores, entonces no habrá diferencia significativa entre los resultados obtenidos con cualquiera de ellos, por el Método Tradicional.

- ✓ Si todos los diluyentes en estudio son igualmente adecuados para el recuento de microorganismos indicadores, entonces no habrá diferencia significativa entre los resultados obtenidos con cualquiera de ellos, por el Método Petrifilm.

- ✓ Si la dilución no influye en la recuperación de microorganismos indicadores, entonces es posible sembrar muestras semisólidas directamente para la determinación de microorganismos indicadores.

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Inocuidad alimentaria

La inocuidad alimentaria es el atributo de los alimentos a través del cual se garantiza que no causan daño alguno y no pongan en riesgo la salud de los consumidores (PANAFTOSA, 2010). La inocuidad de los alimentos, es un concepto que implica que los alimentos no causaran daño al consumidor cuando se preparan y/o consumen de acuerdo al uso previsto. Y según la Organización Mundial de la Salud, engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo (González, 2013).

El *Codex Alimentarius*, o Código Alimentario se ha convertido en un punto de referencia mundial para los consumidores, los productores y elaboradores de alimentos, los organismos nacionales de control de los alimentos y el comercio alimentario internacional. Su influencia se extiende a todos los continentes y su contribución a la protección de la salud de los consumidores y a la garantía de unas prácticas equitativas en el comercio alimentario (*Codex Alimentarius*, 2015); se establece que un alimento se considera contaminado cuando contiene: agentes vivos (bacterias, virus o parásitos riesgosos para la salud), sustancias químicas, tóxicas u orgánicas, extrañas a su composición normal y componentes naturales tóxicos, en concentraciones mayores a las permitidas (Márquez, 2011).

El objetivo de la OMS es facilitar la prevención, detección y capacidad de respuesta a la amenaza que constituyen los alimentos insalubres para la salud pública a escala mundial. Uno de los resultados que la OMS pretende conseguir a través de sus actividades es lograr que los consumidores tengan confianza en sus administraciones y en el suministro de alimentos seguros (OMS, 2014).

Para ello, la OMS ayuda a los Estados Miembros a fortalecer su capacidad para prevenir, detectar y gestionar los riesgos de origen alimentario mediante:

- ✓ La realización de evaluaciones científicas independientes sobre los riesgos microbiológicos y químicos, que constituyen el fundamento del conjunto de normas, directrices y recomendaciones internacionales sobre los alimentos que se conocen como el *Codex Alimentarius*, con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos, sea cual sea su procedencia;
- ✓ La evaluación de la inocuidad de las nuevas tecnologías utilizadas para la elaboración de alimentos, como la modificación genética y la nanotecnología;
- ✓ La asistencia para mejorar los sistemas nacionales y los marcos jurídicos destinados a garantizar la inocuidad de los alimentos, y la creación de infraestructura adecuada para la gestión de los riesgos relacionados con la inocuidad de los alimentos. La Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN), creada por la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), tiene por objeto agilizar el intercambio de información en situaciones de emergencia relacionadas con la seguridad de los alimentos;
- ✓ La promoción de prácticas seguras para la manipulación de alimentos a través de programas sistemáticos de prevención y sensibilización sobre las enfermedades, y sobre la base de la información de la publicación *Cinco claves para la inocuidad de los alimentos* de la OMS y de sus materiales de capacitación; y
- ✓ La promoción de la inocuidad de los alimentos como componente importante de la seguridad sanitaria y la integración de la inocuidad de los alimentos en las políticas y programas nacionales con arreglo al Reglamento Sanitario Internacional (RSI, 2005).

La OMS colabora estrechamente con la FAO, con la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE por las siglas del nombre original, Oficina Internacional de Epizootias) y con otras organizaciones internacionales para garantizar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el consumo (OMS, 2014).

Las bacterias son algunos de los agentes vivos que pueden contaminar los alimentos. Su presencia no siempre es detectable ya que es muy frecuente que estén presentes y en grandes cantidades sin modificar el sabor, olor o aspecto del alimento. El objetivo de la higiene en este sentido es garantizar la producción y elaboración de alimentos que sean inocuos y limpios (Mossel, 2003).

A continuación se presentan tres principios generales que están relacionados con el problema de sanidad e inocuidad de los alimentos (Márquez, 2011):

- ✓ Un alimento que contenga cantidades de organismos patógenos peligrosamente elevadas o niveles clínicamente importantes de toxinas microbianas puede parecer perfectamente salubre para el consumidor porque su aspecto, su sabor y su olor son normales.
- ✓ Las medidas eficaces que impiden el crecimiento de microorganismos, como la refrigeración a temperaturas inferiores a 3°C, no necesariamente controlaran la alteración microbiana de los alimentos ni a todos los microorganismos patógenos.
- ✓ La inhibición de los patógenos cuando se impide la alteración, por lo general, se consigue, especialmente cuando para ello se utilizan métodos adecuados de refrigeración, desecación, acidificación, etc. Sin embargo, estas medidas no necesariamente eliminarán a los microorganismos patógenos, de modo que en algunos casos tales alimentos pueden seguir siendo fuentes de contaminación peligrosa (Márquez, 2011).

En la industria alimentaria se debe administrar la calidad para producir alimentos aceptados y seguros para los consumidores, esto se logra administrando la calidad efectivamente usando las herramientas de control total de la calidad eliminando riesgos de contaminación (física, química y biológica), se deben cumplir requerimientos legales como el cumplimiento de buenas prácticas de manufactura (BPM), control del contenido neto, registro sanitario y correcto rotulado además de cumplir con los requisitos exigidos por los clientes (Caballero, 2014).

La administración de la calidad en la industria alimentaria da una ventaja competitiva al optimizar los recursos, aumentar la producción, reducir los costos y promover la mejora continua (Caballero, 2014).

Las mejoras en la calidad ayudan a que las empresas incrementen su rentabilidad aumentando las ventas y reduciendo los costos, cuando aumenta la calidad se reducen los costos operativos; cuándo se aumenta la productividad, se disminuyen el trabajo repetitivo, los desperdicios y los costos de garantía (Heizer, 2009).

Las organizaciones tienen la responsabilidad sobre el producto debido a que las autoridades sancionan a las empresas que diseñan, producen o distribuyen productos o servicios defectuosos, por los daños o perjuicios que resulten de su uso como alimentos contaminados que provocan enfermedades al consumidor, los cuales derivan en gastos legales enormes (Heizer, 2009).

2.2 Análisis microbiológico de alimentos

El análisis microbiológico de alimentos no tiene carácter preventivo sino que simplemente es una inspección que permite valorar la carga microbiana presente en los productos. Por tanto no se puede lograr un aumento en la calidad microbiológica mediante los análisis; éstos sirven para determinar en la industria, cuales son los puntos de riesgo de contaminación o multiplicación microbiana (los llamados Puntos Críticos del Proceso) y para controlarlos siguiendo un código estricto de Buenas Prácticas de Elaboración o Manufactura (BPE o BPM) y Distribución del Alimento; (Pisabarro, 2008).

Un análisis microbiológico consta de 3 puntos importantes (Pisabarro, 2008):

- ✓ Muestreo: Planes o programas de muestreo, muestras estadísticamente significativas.
- ✓ Método analítico: Sensibilidad de la técnica, detección adecuada, aspectos económicos o costo-beneficio de dicho método.
- ✓ Interpretación de resultados: Comparación de criterios establecidos con Normas nacionales e internacionales.

Los métodos analíticos tienen diferentes alcances, aplicaciones y, por supuesto, diferentes interpretaciones. Algunos de los tipos más importantes de métodos microbiológicos son:

- ✓ Estimación del número de microorganismos (indicadores o grupos específicos)
- ✓ Estimación del número de patógenos específicos (por ejemplo *Staph. aureus* enterotoxigénico)
- ✓ Presencia/ausencia de microorganismos patógenos (como *Salmonella*, *Vibrio* o *Listeria*)

- ✓ Detección y/o cuantificación de productos metabólicos de los microorganismos, por ejemplo: toxinas.

En nuestro país se han desarrollado Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que son de carácter obligatorio a nivel nacional. Éstas contienen información, requisitos, especificaciones y metodología que deben cumplir los productos o servicios a los que se refieren, para su comercialización en el país (PROFECO, 2011).

En las normas de alimentos generalmente hay especificaciones sanitarias que incluyen algunos parámetros microbiológicos. Éstos se establecen a partir de un análisis de riesgos y pueden referirse a microorganismos “indicadores” o directamente a patógenos.

2.3 Generalidades sobre microorganismos indicadores

Un microorganismo indicador es aquel cuya presencia nos alerta sobre la posible existencia de un microorganismo patógeno relacionado con él. Por ejemplo, *E.coli* es indicador de la posible presencia de *Salmonella enteritidis* var. Typhi ya que ambos provienen del tracto intestinal (Pisabarro, 2008).

Se elige determinar indicadores porque su detección y enumeración se llevan a cabo con mayor facilidad y porque su presencia indica con certeza, que los alimentos presentan condiciones sanitarias inadecuadas (lo cual puede no ser tan contundente si sólo se busca a los microorganismos patógenos en los alimentos, ya que éstos pueden estar contaminados en un momento en que no hay presencia del patógeno o en el que su número está por debajo de la sensibilidad de los métodos analíticos (EcuRed, 2013).

Las finalidades del uso de indicadores incluyen: verificar ausencia (o niveles) de contaminaciones particularmente riesgosas, como fecal; comprobar la eficacia de los tratamientos tecnológicos destinados a conseguir la inocuidad de los productos alimenticios, como cloración, pasteurización o refrigeración; y la ausencia de

contaminación post proceso. En la práctica, el análisis de microorganismos indicadores también se hace para predecir la posible vida útil de un alimento, pero con mayor frecuencia se emplea para evaluar la inocuidad y la salubridad relacionadas con su calidad sanitaria (Bello, 2000).

Así pues, la presencia de microorganismos indicadores por encima de los límites aceptables, nos advierte que en un alimento presenta riesgos para el consumidor por (UP de Navarra, 2008):

- ✓ Introducción de organismos peligrosos
- ✓ Multiplicación de especies patógenas y/o
- ✓ Fallas en los tratamientos de reducción o eliminación de microorganismos.

La detección de indicadores es preferible al análisis directo de patógenos porque la frecuencia de estos últimos puede ser menor o su determinación incierta; por ejemplo algunas especies pueden ser fermentadoras lentas como es el caso de *Yersinia spp* o cepas no fermentadoras como *Salmonella spp*. Detectar a los indicadores permite un enfoque de prevención de riesgos, puesto que advierten oportunamente de un manejo inadecuado y/o contaminación (Ramírez, 2012).

Los principales microorganismos indicadores en alimentos son (Ramírez, 2012):

Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso

- ✓ Mesófilos aerobios o cuenta total
- ✓ Cuenta de coliformes totales
- ✓ Cuenta de hongos y levaduras

Indicadores de contaminación fecal

- ✓ Coliformes fecales
- ✓ *E.coli*

- ✓ Enterococos
- ✓ *Clostridium perfringens*

En la industria de alimentos los más importantes son los indicadores del primer grupo, es decir, los que advierten sobre condiciones de manejo y/o eficiencia de los procesos (Ramírez, 2012).

La selección de indicadores en un alimentos depende fundamentalmente de los riesgos implicados y de lo que se requiera saber para liberar, controlar o mejorar el alimento, manteniendo el enfoque preventivo (Camacho y cols., 2010).

2.4. Cuenta en placa

Una de las técnicas para determinar el nivel de contaminación o población microbiana en un alimento, es el recuento de microorganismos en placa. Se denomina también recuento en placa, o método de las placas vertidas. Su fundamento se basa en la capacidad que tienen muchos microorganismos de producir colonias dentro o sobre la superficie de los medios de agar, a través de una serie de diluciones debido a que la suspensión microbiana contiene tantos microorganismos que la dilución no puede llevarse a cabo en una sola etapa (Tovar, 2012).

Se reporta en “unidades formadoras de colonias” por gramo de alimento o ufc/g, indicando las condiciones de cultivo, que deben ser las óptimas para el grupo estudiado. Estos recuentos pueden servir de criterios marcadores porque revelan el grado de colonización que ha tenido lugar hasta el momento del muestreo (Mossel, 2003). Por ejemplo, una industria determinada que hace regularmente una cuenta en placa de psicrófilos aerobios en sus productos refrigerados, puede

detectar un problema si los niveles están fuera de lo que generalmente se encuentra.

Para llevar a cabo, interpretar y sobre todo, para aprovechar los resultados de las cuentas en placa, Sutton (2011), columnista del *Journal of Validation Technology*, recomienda recordar lo siguiente:

Cierta variabilidad es inherente a los datos microbiológicos; la cuenta en placa es una aproximación al número de células presentes, que pueden crecer en las condiciones de la prueba.

- ✓ El intervalo de interpretación se ha establecido para bacterias comunes, en placas de tamaño más o menos estándar (10x100 mm) y con una cantidad estándar de medio de cultivo.
- ✓ En situaciones poco usuales, muestras atípicas, entre otros, conviene contar con un procedimiento operativo, estandarizado para hacer el análisis.
- ✓ Las reglas para promedios y redondeos afectan los resultados finales; por lo tanto, deben aplicarse de acuerdo a la normatividad aplicable y a los POE.
- ✓ Las cuentas en placa juegan un papel muy importante en decisiones de conformidad o no conformidad con especificaciones y/o de control de procesos; por lo tanto, la estandarización para llevarlas a cabo es muy importante.

Y la reflexión de este equipo de trabajo (Microbiología de Alimentos, FQ, UNAM) es que no se ha evaluado el efecto de los diluyentes en dichos procesos y, por lo tanto, siguen siendo una variable sin control en estos análisis.

Los dos grupos de microorganismos indicadores más importantes de la industria alimentaria son: mesófilos aerobios que siempre se determina mediante el método

de cuenta en placa, y coliformes totales que puede determinarse por los métodos de tubos múltiples (NMP) o por cuenta en placa. Por eso, a través de este trabajo, se han evaluado los diluyentes para cuenta en placa de mesófilos aerobios y de coliformes totales, por métodos tradicionales y Petrifilm, que es una adaptación de la cuenta en placa. Entre los métodos detallados existentes para la cuenta en placa están los de AOAC, APHA, IFD (Maturín, 2001) y por supuesto, los de NOM en México.

2.4.1. Mesófilos aerobios

En la determinación de mesófilos aerobios (o bacterias mesofílicas aerobias) se cultiva un amplio grupo de microorganismos: todos aquellos heterótrofos, capaces de crecer en las condiciones de la prueba; no recupera microorganismos peligrosos específicamente, pero el número o nivel en este resultado se puede relacionar con calidad, vida útil, contaminación post proceso y/o abuso de temperatura. El medio de cultivo afecta indudablemente al número y tipo de bacterias que crecen en la prueba (Sutton, 2011). El método más comúnmente utilizado es el de placas vertidas utilizando Agar Cuenta Estándar que se agrega fundido y a 45°C a las placas con la muestra previamente diluida, las cuales se homogenizan y se incuban a 37°C por 48 h (NOM-092-SSA1-1994), salvo para el agua que se incuba por 24 h.

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores (NOM-092-SSA1-1994).

El agar cuenta estándar es el medio de cultivo recomendado para el recuento de bacterias aeróbicas, se basa en el alto contenido nutricional de sus componentes,

que permiten el desarrollo de las bacterias presentes en la muestra. Dicho medio se compone de extracto de levadura, tripteína, glucosa y agar (Britanialab, 2015).

El significado de esta prueba puede relacionarse con materia prima excesivamente contaminada, métodos de manipulación deficientes durante la elaboración de productos o condiciones de almacenamiento inadecuadas; todo ello incrementa la posibilidad de que haya microorganismos patógenos. Finalmente, los altos recuentos pueden ser signo de inmediata alteración del producto (Pascual, 2000).

Por ejemplo Hammons y cols (2015) investigaron instalaciones de alimentos “*ready to eat*” tipo delicatessen, y encontraron que un incremento de 1 log en los resultados de cuenta aerobia incrementa 3.3 veces la probabilidad de detectar *L. monocytogenes* ($P < 0.03$), se relaciona con un incremento de casi 2 Log en *L. monocytogenes*.

Campuzano et. al (2015) hicieron un estudio para evaluar la calidad microbiológica de algunos alimentos preparados y servidos en puestos ambulantes cerca de la Universidad de Bogotá D.C, donde encontraron que en los dos puestos de hamburguesas los recuentos de mesófilos aerobios y coliformes por recuento en placa, el 33% de las muestras sobrepasa el máximo permitido, otro dato de importancia al estudio de patógenos en una muestra de postre de leche que se venden en el mismo lugar fue la presencia de *Staphylococcus coagulasa* positivo, sin embargo el riesgo de contraer intoxicación es mínimo ya que el recuento total se encontró por debajo de 100 UFC/g y se necesitan recuento mayores de 10^5 UFC/g para que se produzca la enterotoxina en el alimento.

Otro ejemplo es el de Yáñez (2015) donde evaluó como indicadores de productos perecederos a los mesófilos aerobios, hongos y levaduras en papillas instantáneas de papa nativa (*Solanum tuberosum ssp*) variedades de Yema de huevo y Santa Rosa, se realizaron pruebas de almacenamiento durante 90 días sometidas a diferentes temperaturas 26 °C / 50% HR, 32 °C / 75% HR, y 38 °C /

100% HR como condiciones normales. Se usaron mesófilos aerobios, mohos y levaduras para los análisis microbiológicos: Se concluyó que usando un envase metalizado en condiciones de almacenamiento a 32°C se conservaron mejor las propiedades físico-químicas, microbiológicas y sensoriales del producto, obteniendo una estimación óptima de vida de anaquel de 40 días para las papillas de variedad yema de huevo de 31 días para las de Santa Rosa, tomando en cuenta como principal factor de degradación la cuantificación de mesófilos aerobios. Ellos establecen este como un parámetro de seguridad alimentaria para niños entre los 6 y 36 meses de edad, a quienes va dirigido el producto.

2.4.2. Coliformes totales.

Las bacterias del grupo coliforme se definen como: bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa a 35° C, en menos de 48 h con producción de ácido y gas. Incluye los géneros: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia* (Pascual, 2000). Durante mucho tiempo se consideraron evidencia de contaminación fecal, pero se ha demostrado que muchos de ellos pueden vivir e incluso crecer en el suelo, el agua y otros ambientes. Actualmente se consideran excelente indicador de eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección, así como la calidad sanitaria en agua, vegetales y productos procesados (Camacho y cols, 2010).

Su determinación se basa generalmente en la capacidad de fermentar lactosa. Se pueden utilizar el método del número más probable (NMP o MPN por sus siglas en inglés) que es un método estadístico en tres etapas y permite el hallazgo de cantidades muy bajas de coliformes. También se pueden detectar por cuenta en placa utilizando Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV o RVBA por sus siglas en inglés). El método permite determinar el número de microorganismos coliformes, utilizando agar bilis rojo violeta en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 horas dando como resultado la producción de gas y ácidos

orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares (NOM-113-SSA1-1994).

El agar bilis rojo violeta es un medio selectivo para la investigación presuntiva y recuento de coliformes en alimentos y producto lácteos. En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, las sales y el cristal violeta inhiben el desarrollo de la flora Gram Positiva, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y el rojo neutro es el indicador de pH. Los coliformes son bacterias que fermentan la lactosa, acidifican el medio y producen un viraje del indicador de pH al rojo intenso, debido a esto se observan como colonias de color rojo purpura de 1 a 2 mm de diámetro rodeadas, generalmente de una zona rojiza de bilis precipitada (Britania, 2015).

Los coliformes también pueden detectarse separándolos por filtración en membrana (*Millipore*) y luego incubando en medios adecuados; entre los métodos rápidos o listos para usar, destaca Petrifilm. Finalmente los medios de cultivo cromogénicos o fluorogénicos altamente específicos también se utilizan cada vez más (Camacho y cols, 2010).

Tejedor y cols (2015) realizaron una investigación en un restaurante de una red hotelera de Cuba, con el objetivo de evaluar el riesgo del par *E.coli*/Filete Mignon, producto que requiere ser elaborado con carnes certificadas libres de patógenos debido a que los términos de cocción solicitados por los clientes pueden resultar de alto riesgo. Para ello, realizaron inspecciones higiénico-sanitarias desde la etapa de recepción hasta el servicio del plato; dichos análisis microbiológicos tradicionales, incluyeron microorganismos indicadores y patógenos; evaluaron la exposición del cliente al riesgo, con base en los diferentes términos de cocción solicitados. Se comprobó que aunque la carne cumpla con estándares microbiológicos, durante diferentes etapas de preparación puede resultar contaminada con microorganismos de origen intestinal como *E. coli* y causar enfermedad al consumidor.

2.5. Tendencias en análisis microbiológico en la industria alimentaria.

Los análisis microbiológicos tradicionales son, por todo lo mencionado, de gran importancia en la industria alimentaria, para tomar decisiones sobre materias primas, para controlar etapas del proceso. La inocuidad de los alimentos producidos depende en buena medida de las cargas microbianas de materias primas y de la eficiencia de los procesos, que se determinan a través de los análisis mencionados.

Pero una de sus desventajas es que son métodos laboriosos y que la obtención de los resultados es lenta: 24 horas como mínimo y hasta 7 días para hongos, el tercer grupo indicador más importante en alimentos (Durán, 2012).

De ahí que la industria tenga una creciente necesidad de métodos rápidos de análisis, tanto para el control de especificaciones obligatorias de alimentos, como para los procesos internos de control y de mejora continua (Chordi, 2011).

Es por ello que se han desarrollado métodos microbiológicos alternativos de fácil utilización que pueden resultar muy convenientes para la industria, sobre todo cuando se realizan cientos de análisis en un día y cuando se aplican en laboratorios diferentes, por ejemplo en diferentes plantas de una misma empresa.

Para que estos métodos alternativos puedan ser utilizados, deben de cumplir los siguientes criterios:

- ✓ Proporcionar resultados de manera rápida
- ✓ Ser adecuados para el análisis de rutina,
- ✓ Ser precisos y exactos
- ✓ Ser técnicamente viables e
- ✓ Intencionalmente aceptables (Jordano y Medina, 1999)

De acuerdo con los puntos anteriores 3M ha desarrollado una línea de productos para este fin: las Placas Petrifilm™ que permiten ahorrar tiempo y mejorar la productividad (3M, 2006). Además han sido reconocidos por organizaciones como el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados (COFOCALEC), que es una organización nacional encargada de evaluar la calidad de la leche y sus derivados en el país, conforme a las Normas Mexicanas y Normas Oficiales Mexicanas aplicables. Gracias a las validaciones llevadas a cabo, las placas 3M han sido incluidas entre los métodos establecidos para el control microbiológico de lácteos en la “NMX-F-717-COFOCALEC-2006. Sistema producto Leche – Alimentos – Lácteos – Análisis microbiológicos de leche y derivados – Métodos de prueba rápidos”.

En el punto 5.1.1.1 de esta Norma hace referencia a las Placas Petrifilm de 3M como “Placa con medio seco rehidratable, sistema de doble película”. Método aplicable a la determinación de mesófilos aerobios, organismos coliformes, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

La incorporación de métodos rápidos permite a la industria de Alimentos la estandarización de procesos analíticos y agiliza los análisis, reduciendo fuentes de error, además son métodos más fáciles de interpretar. Eso también hace que se reduzcan los costos en general, reducción de costos de energía al no esterilizar medios de cultivo, en el lavado de material de laboratorio y reducción de desechos, entre otros; por eso las industrias están interesadas en utilizarlos para hacer más productivos sus procesos (Durán, 2012).

Los métodos rápidos ofrecen la posibilidad de eliminar algunos de los pasos de un análisis convencional permitiendo que estos análisis se conviertan en herramientas eficientes dentro del proceso de fabricación de un alimento. Estos análisis reúnen las siguientes características: facilidad, uniformidad en los procesos y resultados rápidos, confiables y seguros. Corresponden a un grupo de técnicas microbiológicas, bioquímicas, fisiológicas que permiten un aislamiento

efectivo, detección, caracterización y enumeración más rápida de los microorganismos (Gamboa, 2015).

Las técnicas microbiológicas en el sector de los alimentos están dirigidas con frecuencia a microorganismos indicadores de la posible presencia de patógenos, los métodos convencionales de detección de microorganismos como la técnica NMP, filtración por membrana, siembra en profundidad o vertido en placa, requieren en primer lugar que el microorganismo objeto del análisis forme una colonia en un medio de cultivo, lo cual implica su preparación, esterilización de material, mano de obra suficiente, períodos de incubación relativamente largos, el empleo de cultivos de enriquecimiento o de recuperación y se debe disponer de equipos necesarios como incubadoras, refrigeradores, autoclave, entre otros (Ercsey y cols, 2012).

Estos métodos favorecen el ahorro de tiempo y trabajo, existen diversos métodos basados en la normativa mexicana, los cuales son llamados “tradicionales”; se consideran métodos “alternativos” a aquellos con el mismo fundamento, pero que vienen preparados y estandarizados de fábrica y cuyo manejo e interpretación son más sencillos. Entre éstos destacan las placas Petrifilm las cuales se consideran un método más fácil de usar puesto que vienen listas y no requieren preparativos, ocupan menor espacio en incubadoras y se desechan más fácilmente que los medios convencionales; sus mayores cualidades son la estandarización que no se logra en medios de cultivo preparados en laboratorio y la facilidad para la interpretación, gracias al colorante que incluyen y que permite distinguir muy bien las colonias, de los restos de alimento (Díaz y cols, 2009).

Las Placas 3M™ Petrifilm™ ayudan a aumentar en un 80% la productividad al eliminar el tedioso proceso de agar, lo que le dará a los técnicos tiempo valioso, que puede destinarse a desempeñar tareas más provechosas, como aumentar el muestreo, monitorizar la producción y los Programas de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), aumento de la productividad de los técnicos de laboratorio, reducción de costos. Un estudio realizado en 274 plantas que cambiaron los

métodos tradicionales que utilizan agar por las Placas 3M™ Petrifilm™ detectó una disminución en la carga de trabajo en un 45% y un incremento promedio del 80% en la eficiencia de los técnicos (3M México, 2015).

En un estudio realizado por Gutiérrez y cols. (2014) se cuantificaron bacterias ácido lácticas evaluadas como parámetros microbiológicos, mediante método tradicional y Placas Petrifilm™, identificando ventajas contra métodos convencionales en muestras de aderezos. Petrifilm™ es un método simple y fácil de utilizar. El ahorro de tiempo en los procesos de verificación de calidad en la industria, ha sido determinante para uso de ese sistema y por la facilidad de interpretación se considera un método de conteo rápido, aunque los periodos de incubación son prácticamente iguales a los tradicionales.

2.6 Placas Petrifilm

La empresa 3M ha desarrollado diversos productos alternativos para el análisis microbiológico, incluyendo una línea de placas “listas para usar” cuidadosamente estandarizadas y aplicables a Laboratorios Microbiológicos e industrias de alimentos que necesita cubrir los riesgos de seguridad. Las placas Petrifilm de 3M cuentan con un diseño que consiste en una película plástica cubierta de nutrientes y agentes gelificantes que solidifican en frío, y se formulan siguiendo la composición de los medios de cultivo de los métodos oficiales (3M, 2014).

La película superior es de plástico y además contiene un adhesivo. La capa inferior de las placas consta de un papel cuadriculado que facilita el conteo de las colonias, y contiene los mismos nutrientes que el medio de cultivo utilizado en el método tradicional, más un colorante (Cloruro de Trifenil Tetrazolio o TTC) que facilita el reconocimiento de las colonias; ambas capas se hidratan con el volumen de agua con el cual se aplica la muestra y se adhieren al entrar en contacto, evitando la deshidratación del medio con la incubación (3M, 2014; Alonso y Poveda, 2008).

El empleo de Placas Petrifilm™ ayuda a incrementar la eficiencia del laboratorio ya que ayuda a maximizar la productividad de la planta; por su óptima estandarización hacen más confiables y reproducibles los procesos de las pruebas, reduciendo variaciones entre turnos, plantas e incluso analistas. Su utilización permite reducir el número de horas necesarias para pruebas microbiológicas, lo que lleva a la reducción de costos en general.

Las Placas Petrifilm™ usadas en este trabajo experimental son:

- ✓ Placas para el recuento de aerobios o Petrifilm™ AC (*Aerobic Count*)
- ✓ Placas para el recuento de coliformes o Petrifilm™ CC (*Coliform Count*)

El trabajo de Quezada (2015) muestra el uso de Placas Petrifilm para la evaluación microbiológica de quesos, con algunas ventajas, por ejemplo, en coliformes totales y *E.coli* debido a que el método tradicional NMP para coliformes generó falsos positivos por la abundancia de BAL en quesos; por lo cual se optó por hacer las determinaciones mediante placas Petrifilm™ EC.

Otro ejemplo del uso de Placas Petrifilm es el trabajo de Salto (2013) sobre la identificación y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en queso Cotija artesanal madurado, dónde se utilizaron placas Petrifilm™ *Staph Express* con el fin de ahorrar tiempo de preparación y esterilización.

Ortega (2015) en su investigación sobre bacterias ácido lácticas (BAL) hace uso de Placas Petrifilm™ como método rápido validado, haciendo comparación con el método tradicional en Agar MRS; el sistema Petrifilm mostró eficiencia similar a la técnica tradicional que emplea MRS en el recuento de cultivos BAL estresadas en condiciones de bajo pH ($R^2=0.93$), se cuantificaron cultivos puros de 6 cepas de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. También evaluó la correlación entre las técnicas en un estudio del comportamiento de *L. mesenteroides* durante su desarrollo en salchichas empacadas al vacío. Este desempeño no se obtuvo cuando se emplearon suspensiones de BAL estresadas por calor ($R^2=0.0371$). El

uso del sistema Petrifilm™ durante la evaluación del desarrollo de *L. mesenteroides* en salchichas empacadas al vacío, mostró un desempeño intermedio, con una buena correlación (80%) con la metodología tradicional.

2.6.1 Placas para el recuento de aerobios o Petrifilm AC (Aerobic Count)

Son utilizadas para la enumeración de bacterias aeróbicas en la industria de bebidas y alimentos. Contiene medio de cultivo equivalente al de los métodos estándar, con Cloruro de Trifenil-Tetrazolio (TTC) como indicador, que facilita la enumeración de las colonias (3M Food Safety, 2006).

La Placa Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios puede ser usada para enumerar aerobios totales en todos los alimentos y cuenta con aprobaciones AOAC-OMA. Debido a que las colonias en la Placa Petrifilm™ AC son de color rojo, se las puede diferenciar de las partículas de producto que tienen forma irregular y color opaco (3M Food Safety, 2006).

Las sales de tetrazolio proveen métodos alternos indirectos para medir la actividad respiratoria a una cadena de transporte de electrones. Dichas sales se conocen desde 1894, siendo reconocidas inicialmente por su efecto para teñir bacterias. La reducción de una sal de tetrazolio causa la formación de un precipitado insoluble de coloración roja intensa, conocido con el nombre de Formazán (OCW, 2008).

La reducción de las sales de tetrazolio es afectada por el pH. A pH bajo (pH<5) se inhibe la reducción del TTC a la correspondiente sal formazán, por consiguiente es importante considerar el pH de la muestra, cuándo utilizamos sales de tetrazolio como indicador de la actividad respiratoria en un cultivo microbiano (OCW, 2008)

Benítez y cols (2011) en su trabajo sobre calidad microbiológica de una galleta formulada a base de harina de yuca y plasma de bovino, hacen uso de la técnica de Placas Petrifilm 3M para la determinación de mesófilos aerobios; obtienen excelentes resultados, en menor tiempo.

2.6.2 Placas para el recuento de coliformes o Petrifilm CC (Coliform Count)

Contiene los nutrientes del violeta rojo bilis (RBV) con el indicador cloruro de tetrafenil tetrazolio (TTC) que facilita la cuenta de colonias, dándoles una coloración roja intensa. En estas placas la cubierta superior atrapa el gas producido por los microorganismos, generando burbujas claramente perceptibles, lo que hace muy fácil la diferenciación de los fermentadores de lactosa (3M, 2005).

Vélez y cols (2013) hacen uso de la técnica Petrifilm^{3M} para la determinación de coliformes totales y *E.coli* en lechugas de variedad Iceberg. Analizaron 96 muestras, por duplicado para cada una de estas determinaciones. Encontraron que sólo el 1% de las muestras estuvo contaminado con niveles no aceptables de coliformes totales y el 6,25% con niveles no aceptables de *E. coli*, según la Recopilación Internacional de Normas Microbiológicas de los Alimentos.

Dada la complejidad de las matrices alimentarias, aún con las ventajas y las aprobaciones por los organismos nacionales e internacionales que presenta el método, es importante verificar que dicho método genere resultados equivalentes o mejores, comparados con el método de referencia, para matrices específicas.

2.7 Diluyentes Microbiológicos

En los métodos de cuenta en placa para determinación de microorganismos, es necesario utilizar diluyentes para obtener una mejor recuperación en las células, sin afectar la viabilidad. La carga microbiana de los distintos alimentos es muy variable y debe diluirse para que el recuento pueda realizarse con una razonable precisión. Esta etapa consiste en realizar diluciones sucesivas y conocidas de la muestra, en condiciones de asepsia, con objeto de sembrar después cantidades conocidas de las mismas en placas Petri, de manera que sea posible contar las ufc provenientes de las muestras (Tomás, 2015).

Torres y cols (2012) en su estudio sobre influencia del diluyente y métodos de procesamiento de muestras en la recuperación de *Pantoea agglomerans*, agente de biocontrol CPA-2 de diferentes superficies de frutas, estudian la microbiota que persiste en la fruta y para ello desarrollaron una metodología que involucra los diluyentes y un proceso que no afecte la viabilidad de los microorganismos. Compararon tres diluyentes y tres métodos de preparación de muestra para la recuperación del agente de biocontrol. Encontraron que el pH influye en los diferentes procesos de la muestras y que aunque la solución salina con peptona aumenta el número de células recuperadas, en algunos casos sucedió que un pH menor podía reducir la población CPA-2 en las muestras. También demostraron cómo la combinación de buffer de fosfato y peptona no incrementó el número de células recuperadas del agente del biocontrol; los resultados fueron similares o inferiores a los obtenidos con cada diluyente por separado.

La característica principal de un buen diluyente es que no produzca modificaciones cualitativas ni cuantitativas en la microbiota de los alimentos por analizar, es decir, que mantenga lo más fielmente posible el contenido microbiano de la muestra, sin suprimirlo ni favorecer su desarrollo (Pascual, 2000). Los diluyentes más utilizados son: la solución amortiguadora de fosfatos, el agua peptonada y la solución salina isotónica, pero pueden utilizarse otros diluyentes que cumplan con las funciones de dispersar y homogenizar la carga microbiana y de facilitar la recuperación de los microorganismos en estudio, mediante condiciones de osmolaridad, pH, protección y otras adecuadas para ellos. Por ejemplo, para la determinación de *Vibrio cholerae*, que es alcalófilo, se utiliza agua peptonada a pH 8.5 (Camacho y cols, 2009).

Cabe mencionar que hay normas oficiales y métodos de referencia que ni siquiera mencionan qué diluyente usar o entre cuáles elegir; esto permite una variabilidad grande en la preparación de diluciones, que puede estar afectando los resultados.

La tabla 1 muestra los diluyentes indicados en las diferentes NOM, en otras normas y en algunos métodos de referencia; se incluyeron también los

mencionados en el manual de prácticas de Microbiología de alimentos, de la Facultad de Química, UNAM.

Tabla 1. Diluyentes indicados en las Normas

Referencia	Propósito	Buffer de Fosfatos	Agua peptonada bufferada	Agua peptonada al 0.1%	Solución peptona sal
		Denominado	Denominado	Denominado	Denominado
NOM-110-SSA1-1994	Preparación de muestras para análisis microbiológico	6.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos	No se menciona	No se menciona	6.1.1.2.2 Agua peptonada
NOM-092-SSA1-1994	Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa	No se menciona	No se menciona	No se menciona	No se menciona
NOM-113-SSA1-1994	Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales	6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos	No se menciona	No se menciona	6.1.1.2 Agua peptonada
NOM-115-SSA1-1994	Determinación de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico	6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos	No se menciona	No se menciona	6.1.1.2 Agua peptonada
NMX-F-717-COFOCALEC-2006.	Métodos Rápidos	No se menciona	No se menciona	No se menciona	No se menciona
NMX-F-717-COFOCALEC-2006.	Métodos Rápidos	No se menciona	No se menciona	No se menciona	No se menciona
ISO 6887-1:1999	Microbiología de alimentos, preparación de muestras	Introducción <i>buffered peptone water</i>	Es necesario <u>especificar diluyentes</u> utilizados y prácticas de dilución para los alimentos específicos.		
Manual de Prácticas de Microbiología de Alimentos. FQ, UNAM	Prácticas: Preparación de muestras, Cuenta aerobia, Coliformes en placa	Buffer de fosfatos	No se menciona	Agua Peptonada	No se menciona
	Menciona Solución Salina Isotónica en Preparación y Dilución de muestras				

*Es posible que cuando se prepara este diluyente para la detección de *Salmonella*, se use también para las demás diluciones necesarias.

A continuación se describen la composición y propiedades de los diluyentes.

2.7.1 *Agua peptonada bufferada*

Medio de cultivo empleado como diluyente para el pre enriquecimiento de microorganismos a partir de diferentes muestras. El agua peptonada tamponada mantiene un pH alto durante el periodo de pre enriquecimiento y anula los efectos del daño celular que pueden ocurrir a un pH ácido (BritaniaLab, 2010).

Su composición es (BritaniaLab, 2010):

- ✓ Fórmula (en gramos por litro)

Agua peptonada bufferada

Peptona de carne.....	10.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fosfato disódico.....	3.5
Fosfato monopotásico.....	1.5

pH final: 7.2 ± 0.2

2.7.2. *Buffer de Fosfatos*

Se utiliza para preparar suspensiones de células microbianas, además los fosfatos proporcionan un pH entre 6.8-7.0 lo que puede ser importante para mantener la viabilidad de las células (Britania, 2010).

Su composición es (NOM-110-SSA1-1994):

- ✓ Fórmula (en gramos por litro)

Buffer de fosfatos

Fosfato de sodio monobásico.....	34
Agua.....	1.0

2.7.3. Agua peptonada al 0.1%

Medio utilizado como diluyente y para el enriquecimiento bacteriano a partir de los alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Puede ser empleado también en muestras de reemplazo de solución fisiológica y como medio base para la fermentación de hidratos de carbono (BritaniaLab, 2010).

Su composición es (BritaniaLab, 2010):

- ✓ Fórmula (en gramos por litro)

Agua peptonada al 0.1%

Peptona de carne.....	1.0
Cloruro de sodio.....	5.0

pH final: 7.2 ± 0.2

2.7.4. Solución peptona-sal

Medio utilizado para diluciones que mantiene la presión osmótica de la membrana de las células y la peptona como fuente de carbono (BritaniaLab, 2010).

Su composición es (NOM-110-SSA1-1994):

- ✓ Fórmula (en gramos por litro)

Solución peptona-sal

Peptona..... 1.0

Cloruro de Sodio.....8.5

Agua.....1.0

Como puede apreciarse, hay diferencias entre los diluyentes, que permiten suponer diferencias en el desempeño, en las determinaciones analíticas.

Capítulo 3. Metodología

3.1 Estandarización de cepas

Se utilizaron cepas proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química de la UNAM, para inocular las matrices bajo estudio y determinar la eficiencia de los diluyentes en la recuperación de la población microbiana conocida. Las cepas utilizadas fueron: *S.aureus* ATCC-6538 y *E. coli* ATCC-11229. Para la determinación de mesófilos aerobios se utilizó una mezcla de ambas y la misma cepa de *E.coli* para la determinación de coliformes totales.

Para la estandarización de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se utilizaron cultivos en caldo BHI de 24 horas de incubación, se hicieron diluciones decimales en solución salina isotónica (SSI) hasta 10^{-10} en condiciones de asepsia y mezclando en vórtex. Se inocularon por triplicado las diluciones 10^{-5} hasta 10^{-10} , en Agar Cuenta Estándar y en Petrifilm AC (para mesófilos aerobios). Y se inocularon las diluciones 10^{-4} hasta 10^{-8} , para coliformes totales, en Agar Bilis Rojo Violeta y en Petrifilm CC. Todas las placas se incubaron durante 24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se determinaron UFC/mL de cultivo (Figura 1).



Figura 1. Manejo e inoculación de Placas Petrifilm

A continuación se muestra el diagrama de esta etapa (Figura 2).

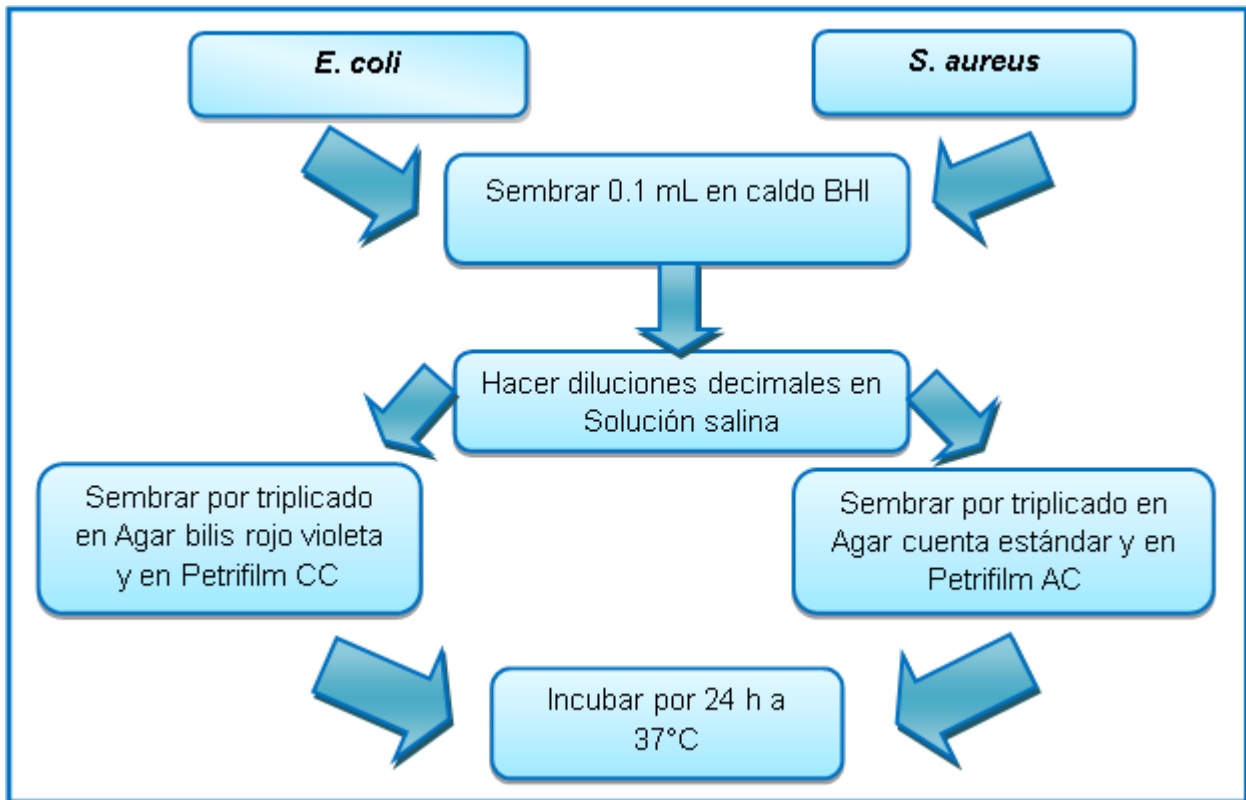


Figura 2. Diagrama de bloques para la estandarización de cepas por Métodos Tradicional y Petrifilm

3.2 Evaluación de diluyentes

3.2.1 Evaluación de diluyentes en la determinación de Coliformes Totales.

A partir del resultado de la estandarización. Se tomó la alícuota de la dilución que nos permitiera agregar 100 a 200 UFC/ mL en el matraz de la primera dilución de muestra, es decir que se agregaron de 10^3 a 2×10^3 UFC en el matraz de 10^{-1} con Buffer de Fosfatos. A continuación se completaron las diluciones decimales y se hizo el recuento por método tradicional en ABRV y en Petrifilm CC. Se repitió el procedimiento con cada uno de los diluyentes (Agua peptonada bufferada, Agua peptonada-sal, Agua peptonada al 0.1%).

3.2.1 Evaluación de diluyentes para la determinación de mesófilos aerobios

A partir del resultado de la estandarización. Se tomó la alícuota de la dilución que nos permitiera agregar 100 a 200 ufc/ mL en el matraz de la primera dilución de muestra, es decir que se agregaron de 10^3 a 2×10^3 UFC en el matraz de 10^{-1} con buffer de fosfatos. A continuación se completaron las diluciones decimales y se hizo el recuento por método tradicional en ATGEL y en Petrifilm AC. Se repitió el procedimiento con cada uno de los diluyentes (Agua peptonada bufferada, Agua peptona-sal, Agua peptonada al 0.1%).

A partir de los resultados obtenidos, se determinaron la dilución del cultivo y la alícuota que permitirían inocular entre 100 y 200 células bacterianas por g de muestra en las pruebas para determinar la recuperación de bacterias.

3.3 Caracterización microbiológica de los productos comerciales

Con el propósito de determinar la carga microbiana inicial de los alimentos con que trabajamos, se realizó una caracterización de cada producto comercial en estudio: crema ácida, yogur natural y postre de arroz con leche marca Lala, adquiridos en un centro comercial; se analizaron dos muestras de cada producto, para mesófilos aerobios y coliformes totales por ambos métodos: Tradicional y Petrifilm. Estas muestras se obtuvieron simplemente adquiriéndolas en el comercio, ya que el objetivo del trabajo no fue establecer la calidad microbiológica de dichas muestras sino tener información básica para utilizarlas como matrices alimentarias en las pruebas con los diluyentes.

Se realizaron las diluciones conforme a la NOM-110-SSA1-1994. Se pesaron 11 g y se colocaron en un frasco de 250 ml con tapón de rosca el cuál contiene 99 ml de Buffer de Fosfatos, con el fin de obtener la dilución 1:10. Para las determinaciones de mesófilos aerobios y coliformes totales, se ajustó el pH a 6,5 – 7 mediante NaOH estéril 1 N. A continuación se hicieron diluciones decimales en

tubos, con buffer de fosfatos, para permitir el recuento. El siguiente esquema resume la caracterización del producto (Figura 3):

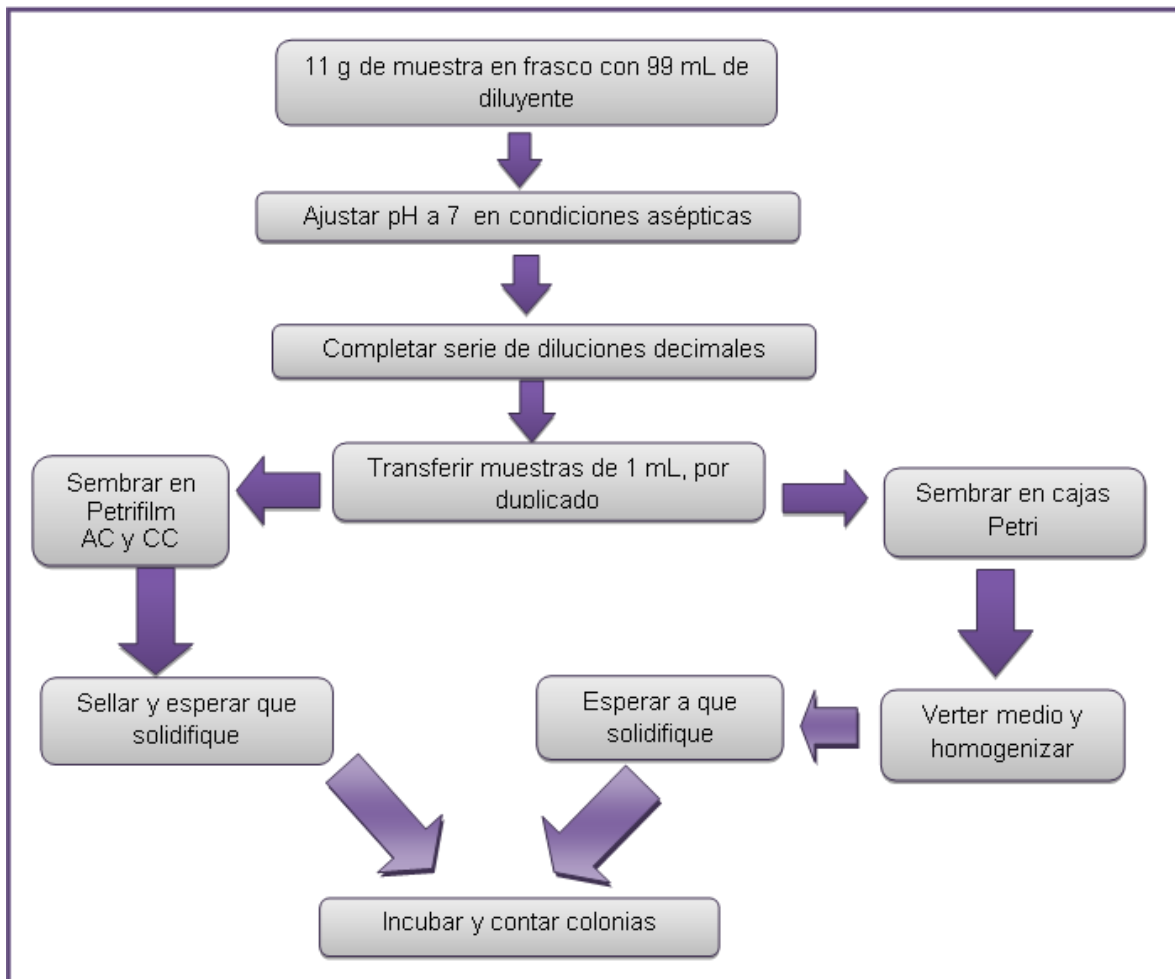


Figura 3. Diagrama de bloques de la Caracterización Microbiológica del producto.

3.3.1 Análisis de matrices con poblaciones conocidas

Una vez que se seleccionó el diluyente más eficaz para la recuperación y recuento de los indicadores, se analizaron matrices alimentarias semisólidas, con y sin diluciones, ya que se ha visto que sembrar los alimentos semisólidos directamente, se ha vuelto una práctica común en la industria. Es preocupante ya que factores como bajo A_w , concentración de inhibidores naturales y acidez, no se

abatan lo suficiente para detectar la contaminación, si no se diluye la muestra. La figura 4 muestra esquemáticamente esta etapa

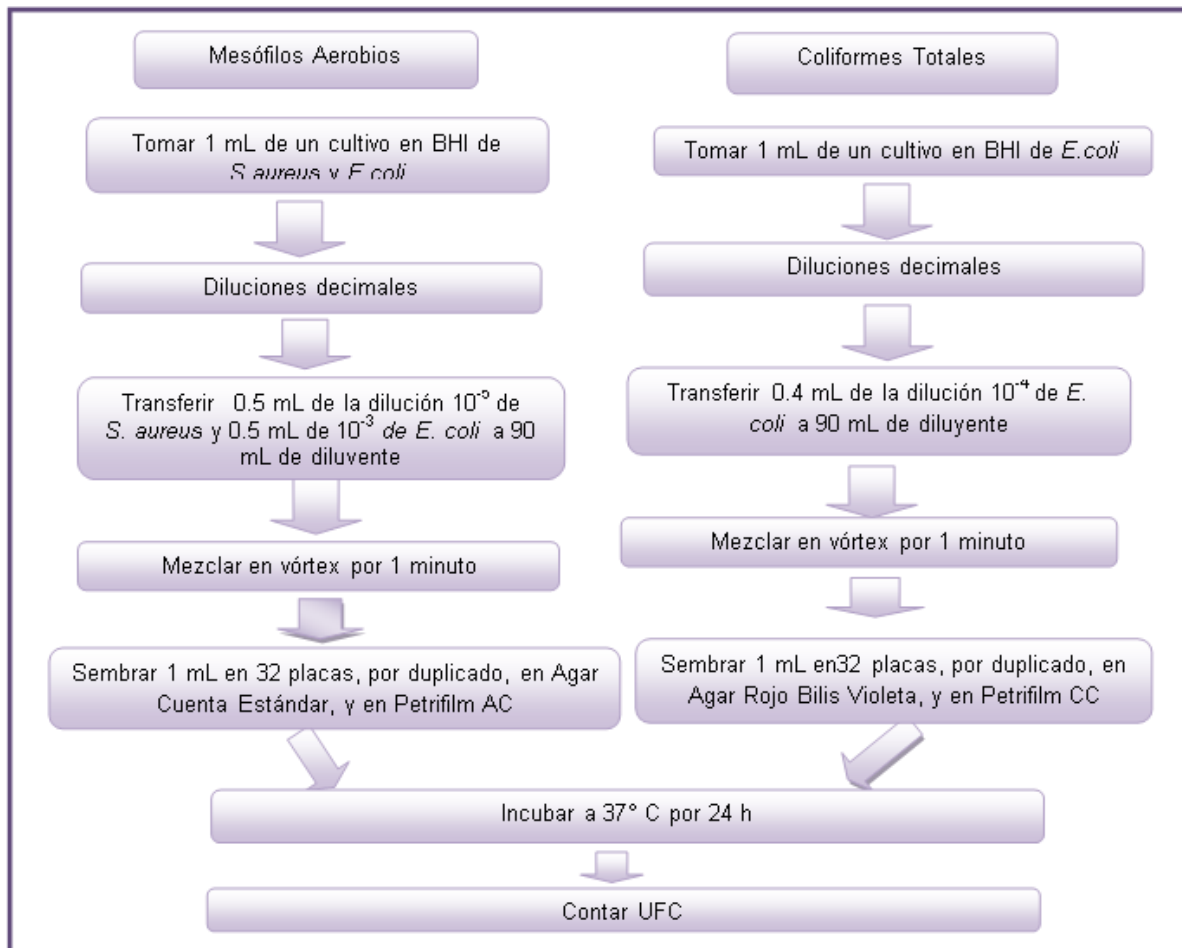


Figura 4. Diagrama de bloques de las determinaciones de Mesófilos aerobios y Coliformes totales con inóculo conocido.

3.3.2 Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales en Matrices Semisólidas

Para la determinación de mesófilos aerobios se utilizó una mezcla de *S. aureus* ATCC-6538 y *E. coli* ATCC-11229, cultivados por separado en caldo BHI durante 24 h a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se hicieron diluciones 1:5 en Buffer de Fosfatos en tubos de 75x100 mm mezclando en vórtex y, con base en los resultados de la estandarización de cepas, se calculó el volumen de cultivo necesario para tener un conteo aproximado de 200 UFC/mL. Para la determinación de coliformes totales se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC-11229. Ambas cepas fueron proporcionadas por el Cepario de la FQ.

Para la prueba estadística se utilizaron 32 muestras de cada producto en estudio, se analizaron por duplicado. En la dilución 10^{-1} de cada muestra, se inocularon las cepas estandarizadas, calculando tener resultados de 100 a 200 UFC/g. Se continuó con las diluciones y con el análisis por los dos métodos.

Para determinar mesófilos aerobios utilizaron placas vertidas de agar cuenta estándar y las placas Petrifilm AC. Para la determinación de coliformes totales se utilizaron placas vertidas de agar bilis rojo violeta, con sobrecapa después de solidificar, y placas Petrifilm CC. Tanto las placas Petrifilm como las cajas Petri se incubaron durante 24 h a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, como en los casos anteriores.

En todos los casos se incluyeron:

- ✓ Controles (inoculando la misma cantidad de cultivo en búffer de fostafo y sembrando por duplicado en los medios utilizados), con el fin de descartar algún efecto de la matriz sobre el inóculo).
- ✓ Blancos en los cuales se sembró la dilución 10^{-1} del alimento antes de inocularlo con las cepas estandarizadas, para conocer la carga original de la matriz.

- ✓ Cajas y placas Petrifilm sembradas directamente con el alimento sin diluir, para determinar si la dilución tiene efecto en la recuperación de los microorganismos presentes en la muestra.

3.3.3 Análisis de las matrices semisólidas sin dilución

Se hizo una prueba con las matrices para la determinación del efecto de la dilución en la recuperación de microorganismos indicadores de calidad. Para ello, dentro del mismo esquema de trabajo de determinación de mesófilos aerobios y coliformes totales en matrices semisólidas, se transfirió 1g de alimento previamente inoculado y se sembró directamente sobre las cajas Petri y las placas Petrifilm; se incubaron durante 24 h a 37 ± 2 °C

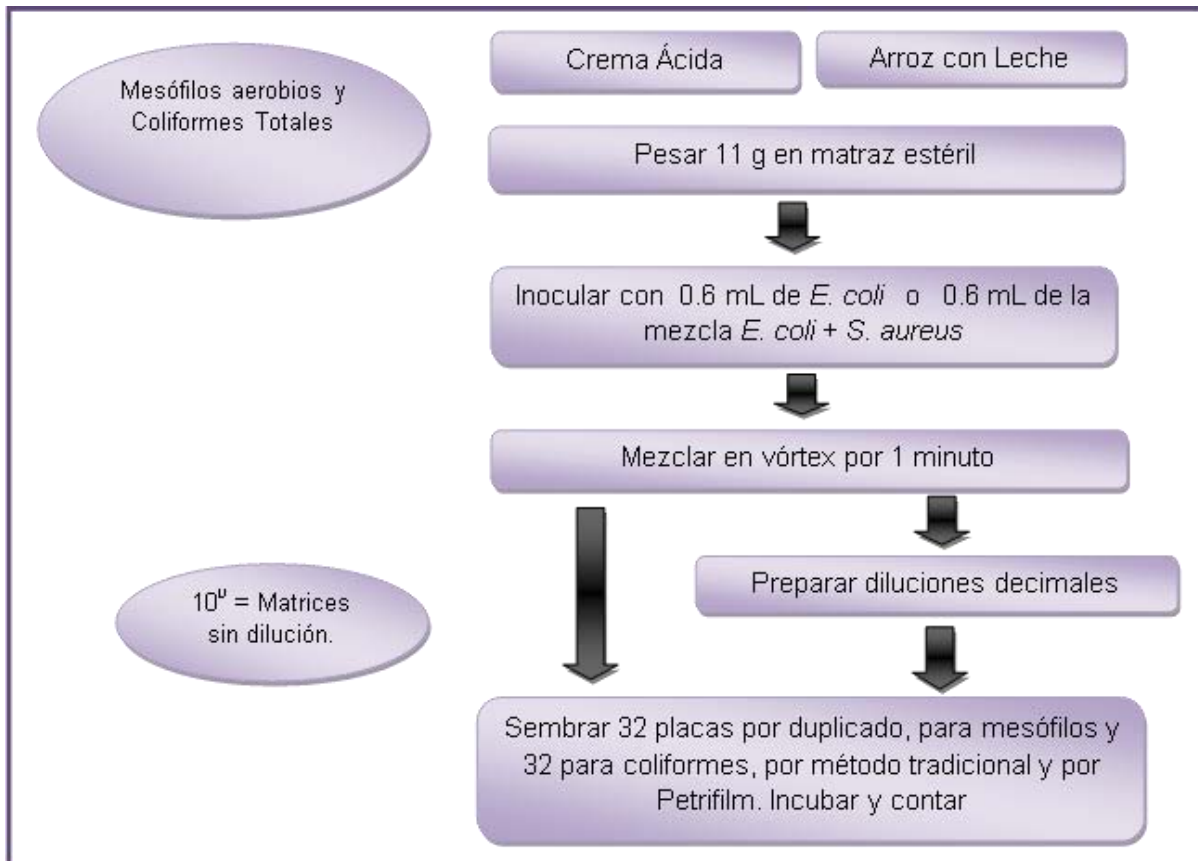


Figura 5. Diagrama del análisis de las matrices con carga microbiana conocida, sin diluir y con dilución de Buffer de Fosfatos.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Primera Etapa: Resultados de la Estandarización de las Cepas

Tabla 2. Estandarización de Cepas

Pruebas	Microorganismo	MÉTODO TRADICIONAL		MÉTODO PETRIFILM	
		Mesóf. Aerobios en ATGEL (ufc/mL)	Colif. Totales en ABRV (ufc/mL)	Mesóf. Aerobios AC (ufc/mL)	Colif. Totales CC (ufc/mL)
A	<i>S. aureus</i>	24x10 ⁵	N.A.	31x10 ⁵	N.A.
B	<i>S. aureus</i>	27x10 ⁵	N.A.	25x10 ⁶	N.A.
A	<i>E. coli</i>	N.A.	Error	N.A.	42x10 ⁷
B	<i>E. coli</i>	N.A.	37x10 ⁷	N.A.	30x10 ⁶
C	<i>E. coli</i>	N.A.	51x10 ⁷	N.A.	25x10 ⁷
D	Mezcla	21x10 ⁷ V.E.	N.A.	52x10 ⁸ V.E.	N.A.
E	Mezcla	13x10 ⁸ V.E.	N.A.	42x10 ⁸ V.E.	N.A.
F	Mezcla	43x10 ¹⁰	N.A.	12x10 ¹⁰	N.A.
G	Mezcla	84x10 ¹⁰	N.A.	22x10 ¹⁰	N.A.

N.A. No aplica. V.E. Valor estimado.

Mezcla: Igual cantidad de cultivos de 24 h en caldo BHI, de *S. aureus* + *E. coli*

En la tabla 2 se muestran los resultados de la estandarización de las cepas utilizadas, tanto para el recuento de coliformes totales como para el de mesófilos aerobios, por métodos tradicional y Petrifilm.

4.2 Resultados de la evaluación de los diluyentes en las determinaciones de Mesófilos aerobios y Coliformes Totales.

A continuación, se hicieron las pruebas con coliformes totales, con los 4 diluyentes en estudio. Estas pruebas se hicieron con 32 cultivos, para aplicar una prueba *t de Student*, los resultados promedio se muestran a continuación, en las tablas 3 y 4:

Tabla 3. Resultados de los diluyentes probados en la determinación de mesófilos aerobios utilizando inóculo conocido (32 determinaciones).

Diluyente	Método Tradicional en ATGEL				Petrifilm AC			
	Promedio	log	UFC/ mL		Promedio	log	UFC/ mL	
	UFC/mL	UFC/mL	mín	máx	UFC/mL	UFC/mL	mín	máx
BUFFER DE FOSFATOS	24x10 ²	3.36 ^a	169	300	22x10 ²	3.34 ^a	160	296
AGUA PEPTONADA BUFFERADA	23x10	2.36 ^b	13	31	21x10 ²	3.33 ^a	131	276
AGUA PEPTONADA AL 0.1%	18x10	2.24 ^b	24	276	19x10 ²	3.30 ^a	24	278
SOLUCION PEPTONA-SAL	19x10	2.28 ^b	122	256	21x10 ²	3.32 ^a	92	270

Literales diferentes implican diferencias significativas (P>0.05)

Tabla 4. Resultados de los diluyentes probados en la determinación de coliformes totales, utilizando inóculo conocido (32 determinaciones).

Diluyente	Método Tradicional en ABRV				Petrifilm CC			
	Promedio	log	UFC/ mL		Promedio	log	UFC/ mL	
	UFC/mL	UFC/mL	mín	máx	UFC/mL	UFC/mL	mín	máx
BUFFER DE FOSFATOS	12x10 ⁶	7.22 ^a	58	226	79 x 10 ⁶	7.07 ^a	58	100
AGUA PEPTONADA BUFFERADA	15x10 ³	4.17 ^b	0	8	11x10 ⁶	7.21 ^a	29	189
AGUA PEPTONADA AL 0.1%	29x10 ⁵	6.46 ^c	11	60	25x10 ⁵	6.39 ^b	11	34
SOLUCION PEPTONA-SAL	67x10 ⁵	6.80 ^c	33	114	64x10 ⁵	6.80 ^b	31	101

Literales diferentes implican diferencias significativas (P>0.05)

La prueba *t* de *Student* mostró que si hay diferencias significativas en la recuperación de ufc ($P>0.05$), en por efecto de los diluyentes. Buffer de fosfatos logra una recuperación significativamente mayor por ambos métodos, para ambos indicadores. No hay diferencias significativas entre la recuperación con agua peptonada al 1% y solución peptona sal; en Petrifilm tampoco es significativamente diferente el efecto de estos diluyentes, el agua peptonada tamponada. En cambio, por método tradicional, la recuperación de UFC es significativamente menor con agua peptonada bufferada.

También se llevó a cabo un análisis de varianza completamente al azar con arreglo factorial 4 X 2 y se realizó la prueba de Rango Múltiple de Duncan para diferenciar tratamientos.

Los resultados que destacan, son los siguientes:

Tabla 5. Media y desviación estándar por diluyente para todas las determinaciones.

Diluyente	N	UFC / mL		Diferencia significativa
		Media	Std. Dev	
BF	128	186.632813	51.2061214	A
APB	128	103.425781	96.2698101	C
AP 0.1%	128	104.269531	83.3913882	C
APS	128	134.095703	72.3456143	B

Diferencias significativas ($P<0.01$)

La tabla 5 permite apreciar que, estadísticamente, el buffer de fosfatos permite la mayor recuperación de ufc con la menor desviación estándar, lo que lo hace el diluyente que genera resultados más consistentes. También nos muestra que hay diferencia significativa entre buffer de fosfatos y los demás diluyentes, aunque no la hay entre agua peptonada bufferada y agua peptonada al 0.1%. Cabe hacer notar que las desviaciones estándar obtenidas con estos diluyentes son muy grandes.

A partir del mismo análisis, se encontraron las siguientes diferencias por método y diluyente, para todas las pruebas:

Tabla 6. Media y desviación estándar por método y diluyente para todas las determinaciones.

Diluyente	MÉTODO TRADICIONAL			MÉTODO PETRIFILM		
	N	Media	Std. Dev.	N	Media	Std. Dev.
BF	64	202.507813	43.274180	64	170.757813	53.8615577
APB	64	12.660156	10.6365243	64	194.191406	42.7947701
AP 0.1%	64	105.164063	82.9050808	64	103.375000	84.5207193
APS	64	130.601563	68.7758713	64	137.589844	76.1309879

La tabla 6 integra varios resultados interesantes: Las mejores recuperaciones por ambos métodos se logran con buffer de fosfatos. Aunque la recuperación con agua peptonada bufferada en Petrifilm puede ser muy buena, este resultado difiere de manera significativa del que puede obtenerse por método tradicional.

La desviación estándar es sumamente importante, pues es una medida de la precisión del método; en tanto que las desviaciones estándar cuando se utiliza buffer de fosfatos son del orden de $\pm 20\%$, en otros casos son del orden de 80%, que representa una gran variabilidad en los resultados.

Si se analizan los resultados por determinación (mesófilos aerobios o coliformes), como muestra la tabla 7, encontramos que se confirman las diferencias descritas; resalta la gran desviación estándar aunada a una muy baja recuperación del agua peptonada tamponada para la determinación de coliformes totales por método tradicional; esto aunado a la obtención de resultados muy diferentes por Petrifilm.

En cuanto al agua peptonada al 0.1% que es probablemente el diluyente más utilizado en México, da menor recuperación por ambos métodos.

Tabla 7. Media y desviación estándar para mesófilos aerobios y coliformes totales por ambos métodos.

MESÓFILOS AEROBIOS. N = 32 para todos los casos				
Método tradicional		Diluyente	Método Petrifilm	
Media log UFC	Std dev.		Media log UFC	Std dev.
5.45016892	0.10246445	BF	5.40200846	0.07291765
3.12944349	0.09545556	APB	5.38027254	0.09950904
5.17509203	0.23786694	AP 0.1%	5.17509203	0.23786694
5.26235129	0.13612851	APS	5.34568104	0.10746135
COLIFORMES TOTALES. N = 32 para todos los casos				
Método tradicional		Diluyente	Método Petrifilm	
Media log UFC	Std dev.		Media log UFC	Std dev.
5.12268972	0.19844751	BF	4.77566202	0.09380623
0.77234043	0.87904671	APB	5.09754368	0.29867592
3.33296124	0.20815902	AP 0.1%	3.20774968	0.16778798
4.14089755	0.34639996	APS	4.13564518	0.24536494

Como se puede apreciar, si hay notables diferencias en el uso de diferentes diluyentes. En la determinación de mesófilos aerobios, el buffer de fosfatos da las mejores recuperaciones tanto por método tradicional como por Petrifilm. Y además no hay diferencia significativa en la recuperación por ambos métodos, con buffer de fosfatos. Además, las desviaciones estándar son muy bajas, lo que indica precisión. En la determinación de coliformes, el agua peptonada bufferada puede dar una recuperación ligeramente mayor que el buffer de fosfatos, pero hay dos grandes inconvenientes: la desviación estándar y hay diferencia significativa entre este resultado y el de método tradicional.

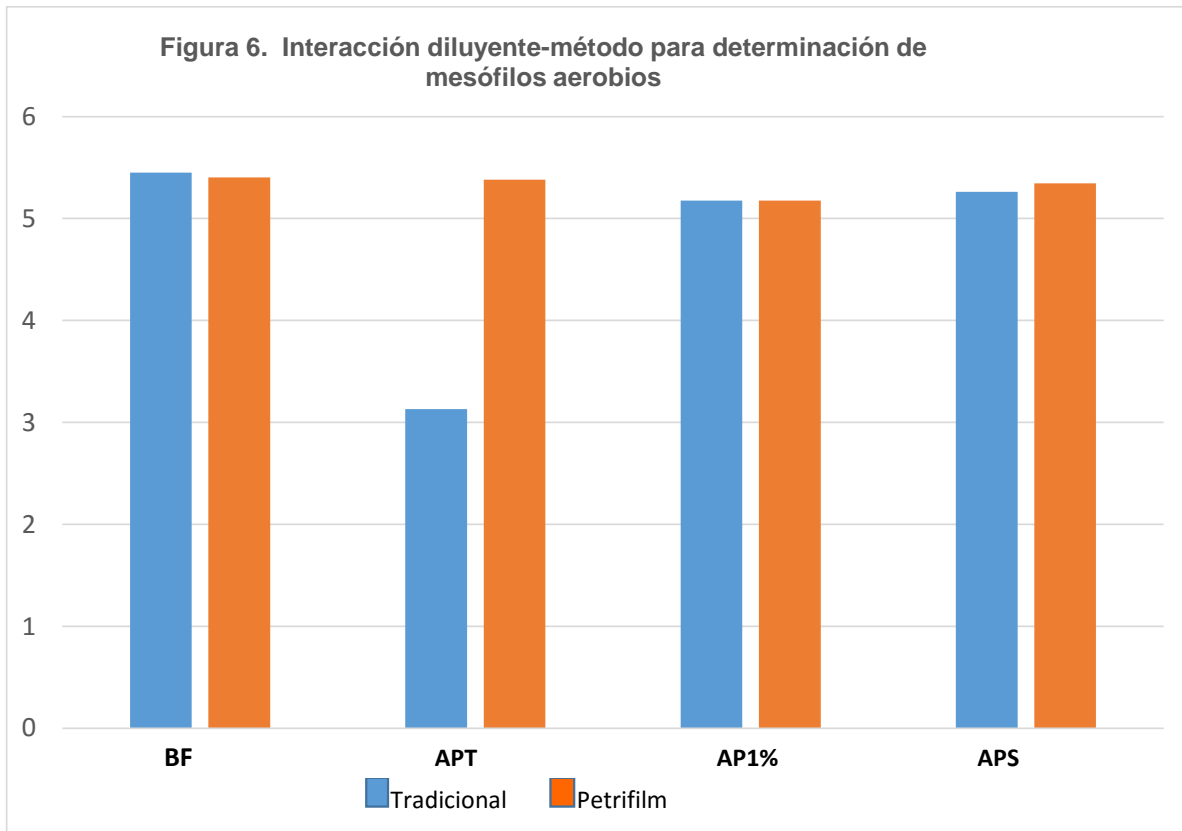


Figura 6. Interacción diluyente-método para determinación de mesófilos aerobios.

Si consideramos los promedios, como muestra la figura 6, agua peptonada y buffer de fosfatos siguen generando los mejores resultados, para mesófilos aerobios, por ambos métodos. Aunque en Petrifilm el APB da mejor recuperación, la diferencia de recuperación respecto al método tradicional la hace menos elegible.

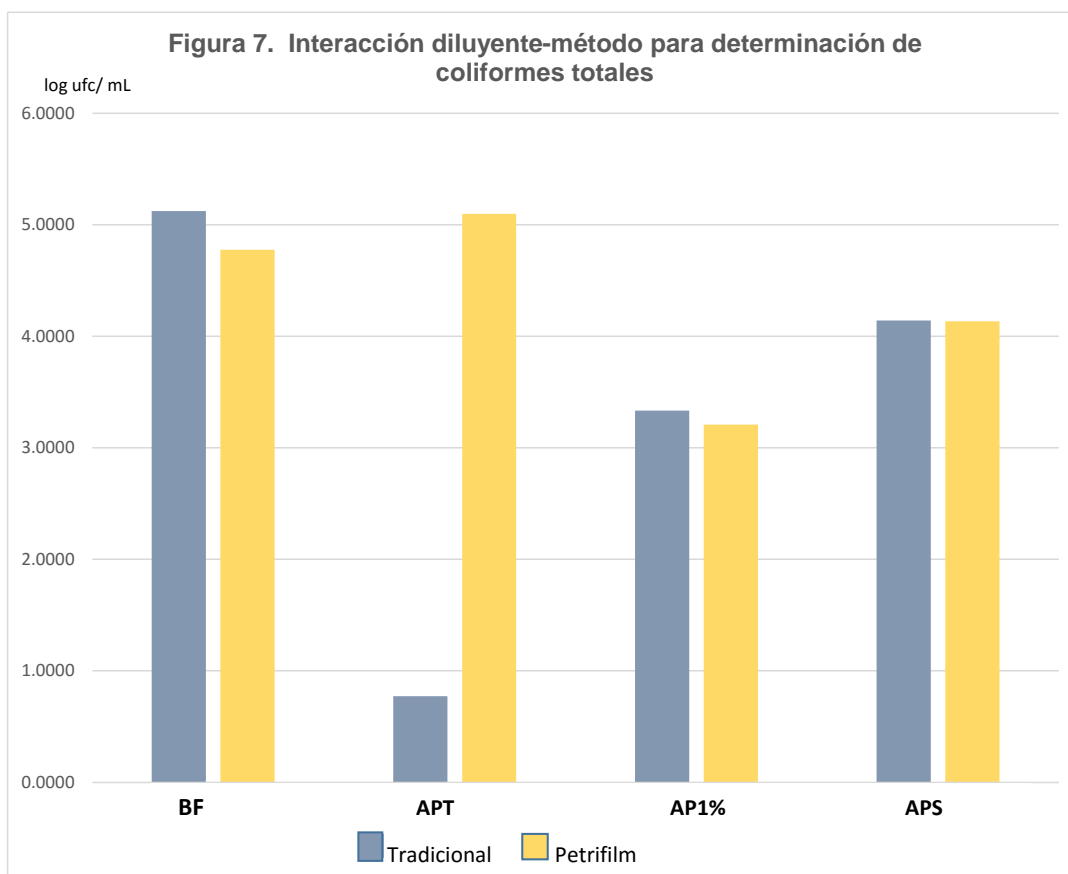


Figura 7. Interacción diluyente-método para determinación de coliformes totales.

En la figura 7 se hace la misma comparación para la determinación de coliformes totales. Nuevamente, la mejor recuperación y comparación entre ambos métodos corresponde al buffer de fosfatos. Y el resultado obtenido mediante agua peptonada bufferada por Petrifilm es ligeramente mayor que con buffer de fosfatos (sin diferencia significativa) pero con una desviación estándar mucho mayor (0.2987 vs 0.09380 del BF); y lo más grave es que la diferencia de recuperación con respecto al método tradicional, es enorme.

4.3 Segunda Etapa: Caracterización de Productos Comerciales

Se analizaron muestras comerciales (unidades de prueba) de arroz con leche, crema ácida y yogur natural todos de marca Lala, con el propósito de evaluar su calidad microbiológica utilizando buffer de fosfatos como diluyente. En la tabla 8 se resumen las especificaciones:

Tabla 8. Especificaciones microbiológicas para los productos analizados, con base en la NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Cap. 6, inciso 6.1.8.1.

Determinación	Límite máximo ufc/g o mL	
	Crema acidificada	Arroz con leche (Dulces a base de leche)
Coliformes totales	≤ 10 UFC/g	≤ 10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i> enterotox.	≤ 100 UFC/g	≤ 100 UFC/g
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente en 25 g	Ausente en 25 g

Dado el interés de este trabajo, los productos comerciales se analizaron para determinar mesófilos aerobios y coliformes totales; se analizaron sin dilución inoculando directamente 1 g de muestra, y también, diluyendo con buffer de fosfatos. La tabla 9 muestra los resultados con y sin dilución; después de los resultados del primer lote de 10 muestras, se decidió no continuar con las muestras sin dilución.

Tabla 9. Resultados de la caracterización microbiológica de los productos comerciales.

MESÓFILOS AEROBIOS				
PRODUCTOS	Sin diluir (N = 10)		Con dilución en BF (N = 32)	
	Trad. ATGEL	Petrifilm AC	Trad. ATGEL	Petrifilm AC
	media	media	media	media
Crema ácida Lala	0	0	0	0
Arroz con leche Lala	0	0	0	0
COLIFORMES TOTALES				
PRODUCTOS	Trad. ABRV	Petrifilm CC	Trad. ABRV	Petrifilm CC
	media	media	media	media
	Crema ácida Lala	0	0	0
Arroz con leche Lala	0	0	0	0

4.4 Resultados del análisis de productos comerciales inoculados, con y sin dilución de la muestra.

Los productos analizados son de buena calidad y, como puede apreciarse no hay crecimiento de indicadores en ninguno de ellos, ni en siembra directa ni con dilución. Pero este resultado no es suficiente para establecer si el diluir o no diluir la muestra, tiene efecto en la recuperación, puesto que no había nada que recuperar (o no en el rango de sensibilidad del método). Por ello, en la siguiente etapa se analizaron las matrices en cuestión, previamente inoculadas con una población conocida de mesófilos aerobios (Mezcla *E.coli* + *S. aureus*). Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados del análisis de productos comerciales inoculados con poblaciones conocidas

MESÓFILOS AEROBIOS								
Población inoculada ~ 22 x10² ufc/ g								
PRODUCTOS	Sin diluir (N = 10)				Con dilución en BF (N = 32)			
	Trad. ATGEL		Petrifilm AC		Trad. ATGEL		Petrifilm AC	
	media	StdDev	media	StdDev	media	StdDev	media	StdDev
Crema ácida Lala Ufc /g	0	0	0	0	20x10 ²	22.7	22x10 ²	23.99
Crema ácida Lala Log ufc	0	0	0	0	3.30	0.050	3.34	0.045
Arroz con leche Lala ufc/g	0	0	0	0	11x10 ²	61.7	12x10 ²	53.5
Arroz con leche Lala Log ufc	0	0	0	0	3.04	0.267	3.07	0.192
COLIFORMES TOTALES								
Población inoculada ~ 15x10² ufc/ g								
PRODUCTOS	Trad. ABRV		Petrifilm CC		Trad. ABRV		Petrifilm CC	
	media	StdDev	media	StdDev	media	StdDev	media	StdDev
	Crema ácida Lala ufc/g	0	0	0	0	19x10 ²	30.3	10x10 ²
Crema ácida Lala Log ufc	0	0	0	0	3.27	0.078	3.0	0.213
Arroz con leche Lala ufc/g	0	0	0	0	10x10 ²	47.9	11x10 ²	47.9
Arroz con leche Lala Log ufc	0	0	0	0	3.0	0.193	3.04	0.194

Estos resultados demuestran que si hay una gran diferencia en la recuperación de microorganismos de las matrices cuando se hace dilución y que el no diluir la muestra, definitivamente impide la recuperación de la población inoculada.

Capítulo 5. Conclusiones

A través de este proyecto se logró evaluar el desempeño de los diluyentes más utilizados en el análisis microbiológico de alimentos. Se encontró que si hay una diferencia estadísticamente significativa en los resultados, en función del diluyente.

El que tiene mejor desempeño (mayor recuperación de ufc y menor desviación estándar) es el buffer de fosfatos, tanto para la determinación de mesófilos aerobios como para la de coliformes totales; su desempeño es aún mejor en método Petrifilm. Este resultado concuerda con el reportado por Torres (2012) quien concluyó que el efecto del pH controlado es muy importante para obtener buenos resultados y que no mejora con la adición de peptona al buffer de fosfatos. En los resultados de este trabajo, el agua peptonada bufferada no genera los mejores resultados y además tiene las mayores diferencias entre método tradicional y Petrifilm. También se observó lo reportado por Márquez (2011), Ramírez Lima (2012) y Durán (2013) que coinciden en que Petrifilm, en términos generales, da mejor recuperación de ufc, con menores desviaciones estándar.

Sobre los objetivos particulares se pueden detallar las siguientes conclusiones:

No es posible determinar si hay o no diferencias significativas en el desempeño de los diluyentes bajo estudio para determinar mesófilos aerobios y coliformes totales, en muestras comerciales de lácteos semisólidos, porque no se detectaron estos grupos con ninguno de los diluyentes.

En la determinación de mesófilos aerobios usando inóculos conocidos, por método tradicional, si hay diferencia significativa entre el buffer de fosfatos y los demás diluyentes, aunque no la hay entre ellos. En método Petrifilm, en cambio prácticamente no hay diferencia significativa entre los diluyentes.

En cuanto a la determinación de coliformes utilizando inóculos conocidos, por método tradicional, nuevamente hay diferencia significativa entre el buffer de fosfatos y el agua peptonada bufferada, y también la hay entre ésta y los otros dos

diluyentes, que dan resultados mucho menores. En cuanto a Petrifilm, no hay diferencias significativas en la recuperación de bacterias cuando se usan buffer de fosfatos o agua peptonada bufferada; pero si hay diferencias significativas entre éstos dos y los otros diluyentes, que son menos efectivos.

En la segunda parte del estudio, se demostró que analizar las muestras semisólidas sin dilución, no es una buena práctica ya que no se recuperan los microorganismos presentes; esto se demostró incluso inoculando poblaciones conocidas en las matrices de crema ácida y arroz con leche. En cambio, a partir de la dilución 10^{-1} de las muestras, se logra una muy buena recuperación del inóculo utilizado. Se concluye que los alimentos semisólidos no deben analizarse sin dilución.

Capítulo 6. Bibliografía

Alonso Nore, L.X y J.A Poveda. 2008. Estudio Comparativo en Técnicas de Recuento Rápido en el Mercado y Placas Petrifilm 3M para el Análisis de Alimentos .Tesis para la obtención del grado como Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. Disponible a través de Internet en:

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>

Barembuem C. 2003. Guía para Validación de Métodos de Ensayo, Organismo Argentino de Acreditación, Argentina, 26/09/2003.

Bello, J. 2000. Ciencia Bromatológica; Principios generales de los alimentos, Madrid, España; Ed Díaz Santos.

Benítez, B. et. al. Calidad Microbiológica de una Galleta Formulada a base de Harina de Yuca y Plasma Bovino. Revista Facultad de Agronomía. [En línea]. 9 de Marzo 2011. **28**,2. Disponible a través de Internet en:

www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php./agronomia/article/view/12458

Bernal-Guadarrama, M.J., N. Fernández-Gallardo, R. Zamora-Padrón, V. Pacheco, M. Reyes-Batlle, B. Valladares, J. Lorenzo-Morales y E. Martínez-Carretero. 2015 (May). Evaluation of Two Commercially Available Immunological Kits for the Diagnosis of *Helicobacter* spp. in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Curr. Microbiol.*, **70**, 5: 685-689. Disponible a través de Red UNAM. DOI: 10.1007/s00284-014-0772-8

Caballero Vargas, J.2014.Administración de la calidad en la industria alimentaria. Tesis para Obtener el Grado de Maestro en Calidad. Universidad Católica de Manizales. Disponible a través de Internet en:

<http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/957/Jeszer%20Caballero%20Vargas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Camacho, A., M. Giles, A. Ortigón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Campuzano, S., Flórez, D. M., Ibarra, C. M., & Sánchez, P. P. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá DC. Revista

- Electrónica: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. **13**,23. Disponible a través de Internet en:
www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/290/554
- Codex Alimentarius, 2015. ¿Qué es el Codex? .Portal del Codex Alimentarius. Disponible a través de Internet en:
<http://www.codexalimentarius.org/about-codex/que-es-el-codex/es/>
- COFOCALEC. “NMX-F-717-COFOCALEC-2006. Sistema producto Leche – Alimentos – Lácteos – Análisis microbiológicos de leche y derivados – Métodos de prueba rápidos”.
- Chordi, A. 2011. Curso de Métodos Rápidos en Microbiología de Alimentos y Agua. Universidad de Salamanca, España. Disponible a través de Internet en:
<http://fundación.usal.es/es/index.php/inicio/formación-especializada/cursos-biosanitarios/métodos-rapidos-en-microbiologia-de-alimentos-y-agua/información-general>
- Díaz, M. Rodríguez, C. Gobín Y. 2009. Identificación de *Enterococcus* como Indicador más eficiente de las Aguas utilizadas en los Procesos. Presentación en Póster. Biotecnología, Habana. Palacio de Convenciones.
- Díaz Pérez, M., C. Rodríguez Martínez y C. Raisa Zhurbenko. 2013. *Enterococcus*, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. Artículo de Revisión. Revistas Médicas Cubanas. **51**, 1. BVSCuba-InfoMed. Disponible a través de Internet en:
http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol51_1_13/hie10113.htm
- Durán León, P. 2013. Evaluación de Placas Petrifilm para el Recuento de Bacterias Lácticas en Productos Cárnicos Procesados y para la Estimación de Vida de Anaquel. Tesis de Licenciatura. Química de Alimentos UNAM. Facultad de Química. México.
- EcuRed. 2013. Microorganismos Indicadores de la Calidad Sanitaria. Microbiología de los Alimentos. Disponible a través de Internet en:
http://www.ecured.cu/index.php/Microbiolog%C3%ADa_de_los_alimentos#Microorganismos_Indicadores_de_la_Calidad_Sanitaria
- Ercsey-Ravasz, M., Z. Toroczka, Z. Lakner & J. Baranyi. 2012. Complexity of the International Agro-Food Trade Network and its Impact on Food Safety. Journal PLOS one. **7**,5. Disponible en:
<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0037810&representation=PDF>

Fung, D. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **1**,1:3-22

Gamboa, M.C. 2015. Actualización de Pruebas de Laboratorio Microbiológicas para el Control de Calidad en Alimentos. Monografía para obtener el título como Licenciado en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Escuela de Ciencias Biológicas. Repositorio Digital. URI:
<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/8719>

Gautier, M.J., P.M. Munro, S. Mohajer. 1987. Influence of Salts and Sodium Chloride on the recovery of *Escherichia coli* from Seawater. *Current Microbiology*, **15**, 1:5-10. Disponible a través de Red UNAM en:
<http://link.springer.com.pbidi.unam.mx:8080/journal/284/15/1>

González, M.A. 2013. La inocuidad en el Plan Nacional de Seguridad Alimentaria y Nutricional: análisis orientado a la valoración del concepto. *Diaeta* **31**, 145: 15-21. Disponible a través de Internet en:
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-73372013000400003&lng=es&nrm=iso

Gutiérrez, M.L, et.al. 2014. Evaluación de Bacterias Acidófilas como Indicadoras de Inocuidad en Aderezos. Jóvenes en la Ciencia. **1**,1. Disponible a través de Internet en:
<http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/articulo/view/598>

Hammons, S.R., M.J. Stasiewicz, S. Roof & H.F. Oliver. 2015 (Apr). Aerobic plate counts and ATP levels correlate with *Listeria monocytogenes* detection in retail delis. *J Food Prot.* **78**, 4:825-30. doi: [10.4315/0362-028X.JFP-14-500](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-500)

Heizer, J y B. Render. 2009. Administración de la Calidad. Principios de Administración de Operaciones. 2ª ed. Pearson Education. USA.

Jordano R; Medina L. 1999. Petrifilm –An enhanced cultural technique– Encyclopedia of Food Microbiology .Universidad de Córdoba, España.

Laboratorios Britania S.A. Hoja Técnica Agua Peptonada al 1%. Disponible a través de Internet en:
http://www.britanialab.com/productos/363_hoja_tecnica_es.pdf

Laboratorios Britania S.A. 2010 (Feb). Hoja Técnica Agua Peptonada Bufferada. Disponible en Internet a través de:
http://www.britanialab.com/productos/398_hoja_tecnica_es.pdf

Laboratorios Britania.S.A.2015.Productos Recuento en placa Agar. Disponible a través de Internet en:

<http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/recplacagar.htm>

Márquez Huerta I. L.2011. Comparación de método Petrifilm con método tradicional para la determinación de indicadores microbiológicos en alimentos de pH bajo. Tesis de Licenciatura. Química de Alimentos. UNAM. Facultad de Química, UNAM. México.

Maturin, L. & J.T. Peeler. 2011 (Jan). Aerobic Plate Count, Chapter 3, Bacteriological Analytical Manual (BAM). FDA, USA. Disponible a través de Internet en:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>

Menéndez López, A. 2013. Validación y Cálculo de Incertidumbre para la Determinación de Microorganismos Indicadores Mediante Microbiología Clásica y NMP Automatizado en Matrices Cárnicas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud. Disponible a través de Internet en:

http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17940/6/TFM_AlejandraVMenendez.pdf

Mossel A., 2003. Microbiología de los Alimentos, 2^a. ed. Acribia, España.

Nero, L. A., Beloti, V., Ferreira, B. M., Tassinari, O. M., Tamanini, R., & Gombossy, D. M. 2006. Comparison of Petrifilm Aerobic Count Plates and de Man–Rogosa–Sharpe agar for Enumeration of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. **14**, 3: 249-257. Disponible a través de bidiUNAM en:

<http://eds.a.ebscohost.com/pbidi.unam.mx:8080/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=caff0bae-e634-45eb-8a0f-8cb20177f57f@sessionmgr4001&hid=4102>

OCW, 2008. Editorial Electrónica de la Universidad Politécnica de Madrid. Capítulo 4. Actividad Metabólica. Disponible en Internet en:

<http://ocw.um.es/ciencias/ecologia/lectura-obligatoria-1/p4actividadmicro.pdf>

OMS, 2015. Inocuidad Alimentaria. Centro de Prensa de OMS: Nota Descriptiva 399. Disponible a través de Internet en:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

Ortega Olgún, I .2015. Comparación de Métodos de Cuantificación de Bacterias Lácticas expuestas a estrés durante su Desarrollo en Salchichas. Tesis para Obtener el Título de Ingeniero Químico en Alimentos. Facultad de Química, UAQ. México. Disponible a través de Internet en: <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/2342/1/RI001401.pdf>

PANAFTOSA .2010 Inocuidad Alimentaria .Disponible a través de Internet: <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?cd=211&id=65>

Pascual, M del R. 2000. Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª ed. Díaz de Santos Madrid, España.

Pisabarro, A.G. 2009. Notas de Microbiología de Alimentos .Métodos Generales de Análisis de Alimentos. Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. Disponible a través de Internet en: <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20general/1metodos%20analiticos%20generales.htm>

Peña, M., Méndez., O., Guerra, M., Peña, S. 2015. Desarrollo de Productos Cárnicos Funcionales: utilización de harina de quinua. Universidad Técnica de Ambato. 21: 21-36. [En línea]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/11028>

PROFECO. 2011. Normas Oficiales Mexicanas. Marco Normativo. Portal de la Procuraduría Federal del Consumidor .México. Disponible a través de Internet en: <http://www.profeco.gob.mx/juridico/noms.asp>

Quezada, R.2015. Evaluación de Especificaciones Sanitarias de Quesos Producidos por Pymes Mexicanas. Tesis de Licenciatura. Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México.

Ramírez Lima, I.S. 2012. Validación de Placas Petrifilm™ en matrices lácteas producidas en México. Tesis de Licenciatura. Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México.

Reglamento Sanitario Internacional.2005.Organizacion Mundial de la Salud. Disponible a través de internet en: <http://www.who.int/ihr/es/>

Salto González, I.B. 2013. Identificación y Cuantificación de *Staphylococcus aureus* en Queso Cotija Artesanal Madurado. Tesis de Licenciatura. Químico de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México.

- Secretaría de Salud. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa .Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios .México. Publicado en el D.O.F. en noviembre de 1995.
- Secretaría de Salud.NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios .México. Publicado en el D.O.F. en mayo de 1995.
- Secretaría de Salud.NOM-113-SSA11994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios .México. Publicada en el D.O.F. en agosto de 1995.
- Secretaría de Salud .NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Publicada en el D.O.F. el 27 de septiembre de 2010.
- Secretaría de Salud. Norma Mexicana NMX-F-717-COFOCALEC-2006.Sistema producto Leche – Alimentos – Lácteos – Análisis microbiológicos de leche y derivados – Métodos de prueba rápidos. Declaratoria de vigencia publicada en el D.O.F. el 25 de mayo de 2006.
- Sutton, S. 2011. Accuracy of Plate Counts. "Microbiology Topics". *Journal of Validation Technology*. **17**,3:46-49. Disponible a través de Internet en: http://www.microbiologynetwork.com/content/file/JVT_2011_v17n3_Accuracy-of-Plate-Count.pdf
- Tejedor, R., Y. Padrón y V. Leyva. 2015. Evaluación de Riesgos del Par *E.coli*/Filete Mignon en un Restaurante de la Red Hotelera. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*. **1,2** .Disponible a través de Internet en: <http://www.rcfa.uh.cu/index.php/rcfa/article/view/21/17>
- Tomás, L. 2015. Comparación de Métodos de Siembra en el Análisis Microbiológico de Pescado. Tesis para obtener el grado de maestro en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias. Universidad Pública de Navarra. Disponible a través de Internet en: <http://repositorio.ucm.ac.mz/handle/123456789/98>
- Torres, R., I. Viñas, J. Sall, D. Remón y N. Teixidó. 2012 (July 4th). Influence of diluent and simple processing methods in the recovery of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 from different fruit surfaces. *Int. Journal of Food Microbiol.* **158**, 1:85-88. Disponible a través de RedUNAM

en: http://ac.els-cdn.com.pbidi.unam.mx:8080/S0168160512003431/1-s2.0-S0168160512003431-main.pdf?_tid=a5fe0728-96d1-11e5-a09d-0000aacb362&acdnat=1448826468_cc5a163bc7b699f4cd5ef5b19d43416a

Tovar, F. 2012. Técnicas y Métodos de Aislamiento y Selección de Microorganismos. Disponible a través de Internet en: <https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>

Trynness, A., Matope, G., Petronella, T. 2011. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiol.* **151**, 223-228.

Universidad Pública de Navarra. 2008. Métodos Generales de Análisis Microbiológico de los Alimentos III. Detección de Microorganismos Índices e Indicadores. Portal de la Universidad de Navarra. España. Disponible a través de Internet en: <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/13-deteccion%20de%20indicadores%20e%20indices.htm>

Vélez Bravo, A. 2013. Determinación de Coliformes Totales y *E.coli* en muestras de lechuga expandidas en cuatro mercados de Cd. de Cuenca. Tesis para obtener el grado de maestro de Bioquímica Farmacéutica. Universidad Pública de Navarra. Facultad de Ciencias Químicas. Ecuador. Disponible a través de internet en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4301>

Yáñez Núñez, A. N. 2015. Determinación del efecto de la temperatura y tipo de envase en el tiempo de vida en anaquel de papillas instantáneas elaboradas a base de papas nativas (*Solanum tuberosum* ssp.), variedades Yema de huevo y Santa Rosa. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Alimentos. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. Disponible a través de Internet en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11986/1/AL%20578.pdf>

Zamora-Vega, R, Martínez Flores, H, Montañez Soto, J., Huerta Silva, U. Pérez Sánchez, R. 2012. Estudio Microbiológico de queso fresco adicionado con el prebiótico *Saccharomyces boulardii*. *Biológicas*. **14**.37-41.

3M. 2005. Placas Petrifilm para el recuento de coliformes totales. Guía de Interpretación (pág. 13). Microbiología 3M. México. Disponible a través de Internet en:

http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

3M. 2006. Placas Petrifilm para el recuento de mesófilos aerobios. Guía de Interpretación (página 1). Microbiología 3M. México. Disponible a través de Internet en:

http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

3M Food Safety. 2012. (Julio-Septiembre). Monitoreo de Ambientes y Superficies. Edición no. 3. Boletín Coleccionable. Disponible a través de Internet en:

http://solutions.3mchile.cl/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1346785550000&locale=pt_BR&assetType=MMM_Image&assetId=1319237475150&blobAttribute=ImageFile

3M Food Safety.2014.Seguridad Alimentaria Maximizada. Disponible a través de Internet en:

http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Catalogo_Seguridad_alimentaria.pdf

3M Food Safety.2015.Soluciones Innovadoras en Seguridad de Alimentos. Disponible a través de internet en:

http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/