



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE LA PLACA 3M PETRIFILM (RYM) PARA LA
DETERMINACIÓN RÁPIDA DE MOHOS Y LEVADURAS EN
ALIMENTOS, FRENTE AL MÉTODO CONVENCIONAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ROCIO AIDE SANABRIA AGUIRRE



CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Profesor: OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

VOCAL: Profesor: AGUSTIN REYO HERRERA

SECRETARIO: Profesor: ANA LILIA CRUCES MARTINEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: ELSI IDELI JUAREZ ARROYO

2° SUPLENTE: Profesor: NAYELI HERNANDEZ MEJIAGG

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
LABORATORIO 4A, ANEXO**

ASESOR DEL TEMA:

OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

SUSTENTANTE:

ROCIO AIDE SANABRIA AGUIRRE

ÍNDICE

Introducción	1
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
Hipótesis	4
Justificación	5
Marco teórico	8
Hongos y Levaduras	8
Principales características morfológicas	8
Mohos y levaduras en alimentos	9
Desarrollo de mohos y levaduras en alimentos	12
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	17
Métodos convencionales para el recuento de microorganismos	19
Métodos rápidos para el recuento de microorganismos	20
Placas 3M Petrifilm de RYM™	21
Utilización de placas 3M Petrifilm RYM™	23
Ventajas y Desventajas	24
Validación	25
Validación de métodos microbiológicos	26
Tipos de validación	27

Diseño de la validación	28
Estadística empleada	30
Análisis estadístico: <i>t-Student</i>	31
Metodología	33
Resultados y análisis	40
Conclusiones	60
Bibliografía	62

Validación de la placa 3M Petrifilm™ (RYM) para la determinación rápida de mohos y levaduras en alimentos, frente al método convencional

Introducción

El análisis microbiológico de los alimentos y sus ingredientes ayuda a valorar si son seguros para los consumidores, su estabilidad o vida útil en condiciones normales de almacenamiento, y el grado de higiene que se tuvo al manejarlos. La carga microbiológica y el tipo de microorganismos son importantes para determinar si un producto y sus ingredientes satisfacen los criterios de inocuidad y de calidad exigidos por las autoridades sanitarias y establecidos por los productores (Bibek y Arun, 2010).

El reto para los países y para los productores de alimentos es enorme en el siglo XXI, por la necesidad de transportar alimentos desde las zonas de producción hasta los grandes centros de consumo. La manufactura de alimentos implica varias etapas, con la participación de múltiples elementos, a veces provenientes de varios países. A lo largo de todos esos procesos los alimentos pueden ser alterados, mal manejados o mal empacados, contaminados, falsificados o adulterados. Es por eso que se requiere supervisión, liderazgo, colaboración y políticas adecuadas para garantizar su inocuidad y calidad. Y, por supuesto, se requieren métodos analíticos confiables, de fácil aplicación e interpretación, para mantener la adecuada vigilancia en los alimentos (FDA, 2015).

Los métodos empleados para la detección de microorganismos en alimentos, sus ingredientes y su entorno pueden ser cuantitativos o cualitativos. Los cuantitativos están estructurados para calcular de manera directa o indirecta, la carga microbiana. Algunos ejemplos de métodos cuantitativos son: cuenta de mesófilos aerobios en placa de Petri (ACP), cuenta de anaerobios, cuenta de psicrótrofos, recuento de microorganismos termorresistentes, cuenta de coliformes, recuento de *Staphylococcus aureus* y cuentas de hongos y levaduras (Bibek y Arun, 2010).

Los métodos cualitativos están diseñados para determinar si una muestra de un alimento contiene o no una especie microbiana específica. Estos métodos se utilizan para detectar la posible presencia de patógenos en alimentos, sobre todo los que tienen capacidad de ocasionar altas tasas de mortalidad en los consumidores, como *Salmonella*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. (Bibek y Arun, 2010).

En los métodos de análisis microbiológicos se utilizan las cajas Petri. Éstas se han utilizado en los laboratorios desde los tiempos de Robert Koch, a finales del siglo XIX. Julius Richard Petri, ayudante de Koch, fue quien inventó las cajas Petri en 1877, como una modificación menor de las placas de Koch, que carecían de tapa y se colocaban bajo un capelo de cristal, para evitar contaminación (Smith, 2005). También fue en éste laboratorio donde se descubrió la utilidad del agar como parte del medio para que crecieran las bacterias en el método de placas (Montville y Matthews, 2010). Actualmente se utilizan ampliamente en los laboratorios de microbiología, para el recuento microbiano. Se utilizan más las de plástico, previamente esterilizadas.

A partir de entonces ha crecido la necesidad de métodos de prueba más rápidos, más económicos, fáciles de aplicar y más exactos. En el tema de seguridad de alimentos, esta demanda es aún más intensa porque los métodos tradicionales implican tiempo de análisis más prolongados. En algunos casos, el tiempo completo de realización e interpretación de las pruebas puede ser más largo que la vida de anaquel del alimento. Por supuesto que en esos casos se requieren alternativas, como métodos indirectos, rápidos, en tiempo real, entre otros (FDA, 2016).

Actualmente, en el área de microbiología de alimentos se siguen utilizando estos métodos de manera convencional (Tanús, 2014). Los métodos tradicionales tienen su base en el cultivo de los microorganismos sobre mezclas de nutrientes solidificadas con agar; implican un trabajo laborioso y consumen mucho tiempo en la preparación de los medios de cultivo así como en la interpretación. En el caso de hongos y levaduras, que son los de interés del presente trabajo, el crecimiento

que permite el recuento se obtiene después de 3 a 5 días (NOM-111-SSA1-1994). A pesar de ello, se mantienen como los métodos oficiales de referencia aceptados por las agencias regulatorias para detectar, enumerar o identificar a microorganismos de interés para la seguridad alimentaria (Tanús, 2014).

Las matrices alimentarias pueden interferir con los métodos analíticos más modernos; y éstos son concluyentes cuando son negativos pero pueden ser insuficientes cuando hay resultados positivos que requieran ser confirmados por métodos convencionales (FDA, 2016). En México, apenas en diciembre pasado (2015) entró en vigor la NOM-210-SSA1-2002. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Ésta establece como:

Métodos alternativos aprobados: a aquéllos que se encuentran referidos en las referencias internacionales como AOAC Internacional, AFNOR, ISO, FDA, CODEX, entre otras y que cuentan con validación internacional y verificación en el laboratorio de prueba, sólo pueden ser usados en el análisis del producto para el cual fue validado (NOM-210, 2002, 3.15).

Así, surge la necesidad de validar y de verificar métodos alternativos, por lo general más rápidos y mejor estandarizados, para demostrar que el método efectivamente detecta a los microorganismos en cuestión, que los resultados cuantitativos no tienen diferencia significativa respecto al método aprobado (que generalmente es convencional), que la sensibilidad del método es igual o mayor y que genera resultados confiables (falsos positivos ni falsos negativos).

El propósito de este trabajo fue validar las placas 3M Petrifilm™ RYM (*Rapid Yeast and Mold*) frente al método aprobado (método tradicional de cuenta en placa, NOM-111-SSA1-1994) y verificarlas para utilización en matrices de algunos alimentos mexicanos.

Objetivo General

Validar las nuevas placas RYM (siglas para "*Rapid Yeast & Mold*") de 3M Petrifilm™ para el recuento rápido de hongos y levaduras, con respecto al método establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Objetivos específicos

Determinar si hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos por el método convencional y mediante las placas RYM de 3M Petrifilm™, para el recuento de mohos y levaduras.

Validar las placas RYM de 3M Petrifilm™ para la determinación de mohos y levaduras en matrices alimentarias mexicanas específicas: fécula de maíz y tortilla.

Hipótesis

Si no hay diferencia estadística significativa entre el método convencional y la placa RYM de 3M Petrifilm™ para la determinación de mohos y levaduras en alimentos, entonces se puede utilizar el método de placa RYM de 3M Petrifilm™ que es más rápido y más cómodo.

Justificación

La seguridad y los nuevos temas de bioseguridad alimentaria son de igual importancia para consumidores, fabricantes de productos alimenticios y productores de alimentos.

Aunque las estadísticas de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), reportan que ha disminuido el número de casos, los brotes de enfermedades y la veda de productos aún constituyen una enorme carga económica para los productores (Bibek y Arun, 2010).

Las intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados con toxinas fúngicas, están incluidas en las ETA. Como muestra la tabla 1, en México, las intoxicaciones alimentarias han disminuido un 10 % en 2013 y un 13% en 2014, respecto al año anterior en ambos casos.

Tabla 1. Enfermedades Intestinales atribuibles al Consumo de Alimentos						
	2010	2011	2012	2013	2014	Datos a sem.epid. 33 de 2015
Cólera	0	5	4	0	0	11
Tifoidea	58 639	61 694	70 536	53 134	52 128	30 395
Paratifoidea y otras Salmonelosis	119 374	121 510	128 434	84 866	87 289	56 161
Shigelosis	11 283	9 891	8 209	7 164	5 847	2 705
Infecciones virales y por otros	4 945 894	4 267 813	5 462 919	5 296 143	4 893 190	3 184 795
<i>Intoxicaciones Alimentarias</i>	39 988	43 670	46 595	42 232	36 599	20 543
TOTAL	5 175 178	4 504 583	5 716 697	5 483 539	5 075 053	3 294 610

Fuente: Arroyo Gómez, 2015

En el 2015 sólo se cuenta con resultados hasta la semana epidemiológica 33 (abreviado como “sem. epid.”). Conviene recordar que para fines de vigilancia epidemiológica, se agrupan los padecimientos o eventos epidemiológicos alrededor de un período de tiempo que es la semana epidemiológica; y es un instrumento de estandarización de la variable tiempo, para los fines de la vigilancia epidemiológica. Las semanas epidemiológicas inician en domingo a las 0:00 y terminan en sábado a las 12 p.m.

De acuerdo con SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2015) cada año mueren 16 000 personas por ETA. Este tipo de brotes son notificados al Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) de la Dirección General de Epidemiología. Los registros que se tienen de las enfermedades gastro-intestinales debidas al consumo de alimentos en el periodo de 2010 al 2015 muestran algunas disminuciones, pero también algunos repuntes. El tema sigue teniendo gran importancia pues un total de más de 4.5 millones de afectados anualmente, sigue siendo un dato preocupante. Cada unidad es una persona que estuvo enferma, que tuvo malestar, incapacidad, bajo rendimiento, gastos en medicamentos y, en muchos casos, complicaciones; algunas de esas complicaciones generan los 16000 fallecimientos anuales por ETA que equivalen a más de 43 personas que pierden la vida diariamente ¡por algo que comieron!!

El asunto es muy serio, y es responsabilidad de la industria, los profesionales, los empresarios y, desde luego, las autoridades, actuar para reducir este problema.

Alimentos como tortillas empacadas y harinas de cereales son productos cuyo consumo en la población mexicana se ha ido incrementando; de acuerdo con García-Urigüen (2012) en el año 2000 el consumo *per cápita* de tortillas fue de 72.1 kg y para el 2008 incrementó a 78.5 kg. Las harinas de cereales donde se considera los productos derivados de la panadería, tuvo en el año 2000 un consumo *per cápita* de 14.2 kg e incrementó para el 2008 hasta 18 kg.

Este tipo de alimentos son vulnerables a estar contaminados desde su origen por algún tipo de hongo debido a las características propias de los cereales que son el principal ingrediente para la elaboración, en este caso el maíz. La producción de estos productos debe ser acorde a las exigencias de los mercados, siendo la calidad y la inocuidad dos de los principales atributos que rigen la oferta y la demanda de los productos a nivel mundial (SAGARPA, 2012).

La principal norma aplicable en México para estos productos es la *NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba*. Esta NOM hace énfasis en el límite de toxinas que son producidas por hongos, pero también marca límites en el contenido de hongos en diferentes materias primas y productos, ya que la presencia de éstos, determinará en gran parte, la posible presencia de toxinas. La determinación rápida de la presencia de mohos y levaduras ayuda a establecer si las especificaciones microbiológicas pueden asegurar que el producto será inocuo. Esta es una razón por la que se requieren métodos de análisis microbiológicos alternativos, tan confiables como los tradicionales que se estipulan en las normas oficiales, pero con resultados en menor tiempo, tal como las placas RYM de 3M Pretrifilm® .

Marco teórico

Hongos y levaduras

Principales características morfológicas

Los mohos y las levaduras son eucariontes, pero las levaduras son unicelulares en tanto que el moho puede formar agregados de múltiples células. Las células eucariontes en general son mucho más grandes (20 a 100 μm) que las células procariontes (1 a 10 μm). Las células eucariontes tienen paredes celulares rígidas y membranas plasmáticas delgadas. La pared celular no tiene peptidoglucano, es rígida y está compuesta por carbohidratos. La membrana plasmática contiene esterol. El citoplasma es móvil (fluye) y contiene organelos (mitocondria y vacuolas) que están unidos a la membrana. Los ribosomas son de tipo 80S y están pegados al retículo endoplásmico. El DNA es lineal (cromosomas), contiene histonas y está envuelto en una membrana nuclear. La división celular es por medio de mitosis (es decir, reproducción asexual), la reproducción sexual, cuando ocurre, es por medio de meiosis (Bibek y Arun, 2010).

El moho es inmóvil, y está integrado por numerosos filamentos llamados hifas. A un agregado de hifa se le denomina micelio. Es probable que una hifa no sea tabicada o que sea tabicada unicelular o multicelular. Una hifa puede ser vegetativa o reproductiva. La hifa reproductiva suele extenderse en el aire y formar esporas, ya sea libre (conidia) o en un saco (esporangio). La forma, el tamaño y el color de las esporas se usan para la clasificación taxonómica. La pared celular de los mohos está compuesta por celulosa, quitina o ambas (Bibek y Arun, 2010).

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las células son ovales, esféricas o alargadas, de un tamaño aproximado de 5 a 30 μm . No son móviles. La pared celular contiene polisacáridos (glucanos), proteínas y lípidos. La pared celular puede tener cicatrices que indican el sitio de gemación. La membrana está por debajo de la pared. El citoplasma tiene una apariencia granular fina por los ribosomas y los organelos. El núcleo está bien definido con una membrana nuclear (Bibek y Arun, 2010).

Mohos y levaduras en los alimentos

Los mohos y las levaduras están ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como microbiota nativa de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados (Camacho *et al.*, 2009). Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos pero en grandes cantidades pueden ser los causantes de la descomposición del mismo (Solutions 3M, 2011).

La producción de alimentos por técnicas microbiológicas es una actividad de larga historia, a medida que las antiguas sociedades evolucionaban los alimentos progresaban. Muchas especies de mohos y levaduras se consideran seguras, con grado de alimento y se usan para el bioprocesamiento de los alimentos, es decir, para producir alimentos fermentados, aditivos, enzimas e ingredientes alimentarios. Alimentos orientales como *el miso, el sake, la salsa de soya*, son ejemplos de alimentos fermentados por hongos así como también los quesos maduros como el *Roquefort, Camembert* o el queso *Brie* (Bibek y Arun, 2010).

El pan, la cerveza y el vino son alimentos donde se aprovecha la fermentación de levaduras. El pan leuda en la cerveza y el vino se producen alcohol y dióxido de carbono (Montville y Matthews, 2010). Dentro de los ingredientes alimentarios, se utilizan las levaduras para la producción de enzimas para su uso en alimentos, la producción de proteínas de origen unicelular (SCP por sus siglas en inglés) y como aditivos para dar un sabor deseable a algunos alimentos (Bibek y Arun, 2010).

Estos microorganismos que se utilizan en todo el mundo para la elaboración de alimentos fermentados modifican los constituyentes de los alimentos de forma que los pueden estabilizar permitiendo su mayor duración y, además, proporcionan compuestos que confieren sabores característicos y deseables a los alimentos producidos por ellos. Ésta es una faceta que se complementa con la acción de microorganismos alterantes de los alimentos y responsables de su deterioro de

forma que se haga inaceptable por los consumidores (Andino, y Castillo, 2010). En esta faceta los alimentos pueden ser vehículos de infecciones (ingestión de alimentos contaminados con microorganismos patógenos) o de intoxicaciones (ingestión de toxinas producidas por microorganismos presentes en los alimentos) graves.

Diversas levaduras y mohos son importantes en los alimentos, pero también participan en su descomposición y algunos mohos en la producción de micotoxinas, cuando las cepas de mohos crecen y se multiplican en un ambiente apropiado, generan metabolitos que son tóxicos para los seres humanos, animales y aves. El consumo de alimentos que contienen micotoxinas causa micotoxicosis.

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos naturalmente por mohos que pueden infestar y contaminan cultivos y productos agrícolas, como granos de cereal, frutas, vegetales e incluso materia orgánica en el suelo. Las micotoxinas han sido clasificadas como el factor crónico más importante de riesgo alimentario, superior que los contaminantes sintéticos, toxinas vegetales, aditivos alimentarios o residuos de pesticidas. Muchas investigaciones se han llevado a cabo en el análisis de micotoxinas en matrices de alimentos y piensos, la exposición humana y la cría animal y los efectos relacionados con la salud (Schenzel *et al.*, 2012).

Algunas de las micotoxinas son carcinógenas, y cuando se consumen, por estar presentes en los alimentos, pueden causar cáncer en distintos tejidos del cuerpo, como hepatocarcinoma (cáncer de hígado). Algunas provocan toxicidad de órganos como hígado y riñones, micotoxinas nefrotóxicas, por la vía de señalización de células moduladoras y la muerte celular programada, y otras tienen efectos tóxicos específicos sobre el sistema nervioso central, sistema endocrino e inmunitario, tracto gastrointestinal y piel. Aunque en años recientes no se ha registrado la incidencia de micotoxinas en muchos países, al menos no en los desarrollados. Esto se debe a que los organismos reguladores evalúan de manera estricta su presencia en muchos alimentos (Bibek y Arun, 2010). Sin

embargo, la población siempre ha estado expuesta a una intoxicación crónica asociada al consumo de pequeñas cantidades de micotoxinas en los alimentos durante periodos prolongados.

A continuación, la tabla 2 muestra algunas de las toxinas provenientes de mohos relacionados con alimentos.

Tabla 2. Mohos que producen micotoxinas en alimentos.	
CEPA de moho toxigénico	MICOTOXINA
<i>Aspegillus flavus</i>	Aflatoxinas
<i>Aspegillus parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>Aspegillus nidulans</i>	Esterigmatocistina
<i>Aspegillus virsicolor</i>	Esterigmatocistina
<i>Fusarium verticiloides</i>	Fumonisina
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol o DON
<i>Fusarium spp</i>	Zearalenona
<i>Penicillum viridicatum</i>	Ocratoxina
<i>Penicillum patolum</i>	Patulina
<i>Penicillum roqueforti</i>	Roquefortina
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergocalcoides

Fuente: Bibek y Arun, 2010

Para determinar la capacidad de una cepa de producir la micotoxina, es necesario cultivarla en condiciones adecuadas y probar si generó la toxina. Actualmente también se pueden hacer estudios genéticos, mediante PCR para encontrar los genes que codifican la producción de las toxinas (Montville y Matthews, 2010).

Como muchas cepas de mohos de diferentes géneros se usan en la producción de alimentos, particularmente los alimentos con fermentación controlada, las cepas que se utilizan para fines favorables en alimentos no deben producir micotoxinas. FDA tiene un protocolo para determinar si los mohos son toxigénicos (Tournas, 2001); en la industria deben utilizarse mohos con certificado de no-toxicidad.

En el caso de fermentación natural es difícil de identificar (Montville y Matthews, 2010).

Actualmente se considera que las aflatoxinas son las micotoxinas de mayor riesgo para la salud, en especial por su potencial hepatocarcinógeno. Entre ellas la aflatoxina B1 es la considerada como la de mayor riesgo (Bibek y Arun, 2010).

Desarrollo de mohos y levaduras en alimentos

Los alimentos, desde su origen en la naturaleza, están en contacto con importantes poblaciones microbianas, cuya composición depende de qué organismos llegan a ellos y de cómo se multiplican, sobreviven e interaccionan en el alimento en el transcurso del tiempo. De toda la flora que naturalmente se encuentra en las zonas de producción de los alimentos, mucha puede mantenerse a lo largo de toda su vida útil. Los humanos aplicamos diversos métodos de conservación y condiciones de almacenamiento que nos permiten destruir dicha microbiota, o al menos, mantenerla bajo control (Soriano, 2007). De cualquier manera, sin tener en cuenta las condiciones de conservación o almacenamiento, solamente una parte de la microbiota inicial llega a proliferar lo suficiente como para alterar los productos. Los factores que influyen en la proliferación son:

- Factores intrínsecos, relacionados con la composición química y las propiedades físicas o biológicas del alimento. Se incluye el pH y la actividad de agua.
- Factores extrínsecos o propios del ambiente donde se conserva el alimento como la temperatura de almacenamiento, la humedad ambiental, la presencia de oxígeno, la composición gaseosa del envase y la presencia o ausencia de luz.
- Factores relacionados con los tratamientos tecnológicos a los que se ha sometido el producto. Estos tratamientos pueden ser físicos, principalmente térmicos, pero también pueden ser químicos o biológicos.

- Factores implícitos, es decir, la competencia entre los diferentes microorganismos que se encuentra en el alimento (Soriano, 2007).

Estos factores determinan la asociación microbiana alterante en cada uno de los alimentos. Los alimentos que típicamente pueden ser alterados por mohos son muy diversos, e incluye aquellos que están formados por carbohidratos de alto peso molecular, que tienen baja actividad acuosa (A_w) y/o bajo pH, condiciones que evitan el crecimiento bacteriano y dan oportunidad a los mohos. Entre estos alimentos destacan los cereales como maíz, trigo, cebada, centeno, arroz, etc.

También las semillas, las especias, las oleaginosas, frutas y legumbres son alimentos de origen vegetal que se ven alterados. Los productos cárnicos como embutidos secos; productos lácteos fermentados, frutos secos, pasas, espagueti, sidra de manzana, quesos y productos de panadería como harinas de granos, son alimentos que han sido sometidos a un proceso de elaboración y que aun así, debido a la calidad de la materia prima con las que fueron elaborados o las condiciones de almacenamiento que tuvieron, son alimentos en los que los mohos pueden crecer.

Estos productos se caracterizan por tener un valor de actividad de agua bajo y/o por tener un pH bajo o por tener una presión osmótica alta. Estos factores junto con el tipo de contaminación, son los determinantes para que los mohos sean capaces de proliferar en los alimentos y de inhibir el crecimiento de bacterias ya que en estas condiciones las bacterias no pueden crecer (Soriano, 2007).

Cuando se hace mención de pH y A_w bajos, se refiere a que los mohos pueden crecer hasta valores de pH 3.5 y valores de hasta 0.65 para la actividad de agua y además pueden crecer a temperaturas bajas como las de refrigeración. Considerando el almacenamiento de los alimentos, los mohos, en general, crecen mejor en ambientes húmedos y cálidos. Son aerobios, lo que significa que necesitan aire para crecer.

En el almacenamiento es donde principalmente los cereales llegan a contaminarse, debido a que las esporas de los mohos pueden hallarse en

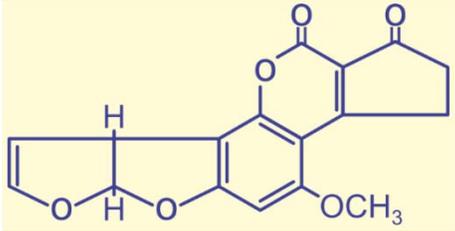
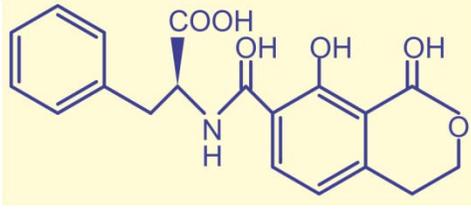
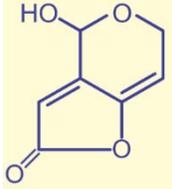
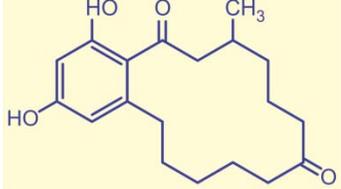
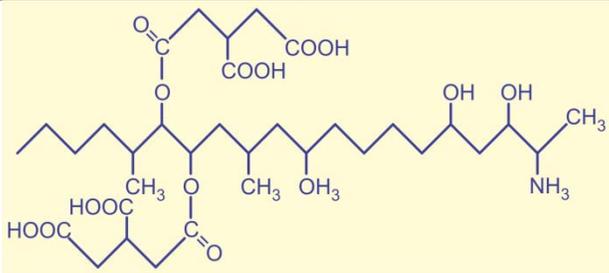
inmundicias, polvo y el ambiente. (Bibek y Arun, 2010). Muchos alimentos pueden tener esporas viables o micelios, en especial antes de ser sometidos a algún tratamiento con calor.

La contaminación o producción de micotoxinas en los alimentos se puede disminuir si se controla bien la población de hongos. Se consideran dos posibilidades para reducir o eliminar la población fúngica; una de ellas es aplicar agentes biológicos, físicos o químicos, como antifúngicos o radiación.

La otra posibilidad de reducir población de mohos, radica en las operaciones a que son sometidos los alimentos en los procesos para su elaboración, como la limpieza de granos, los tratamiento térmicos o la fermentación (Soriano, 2007).

Aunque, hay que tener en cuenta que muchas de las micotoxinas son resistentes al calor usado en la preparación normal de los alimentos debido a sus propias estructuras químicas (Bibek y Arun, 2010).

A continuación, en la tabla 3 se muestran las micotoxinas más importantes y sus estructuras químicas.

Tabla 3. Estructuras químicas de alguna micotoxinas	
 <p>Aflatoxina B1</p>	 <p>Ocratoxina A</p>
 <p>Patulina</p>	 <p>Zearalenona</p>
 <p>Fumonisin B₁</p>	

Fuente: Fuente: Bibek y Arun, 2010

Para garantizar la inocuidad de los alimentos es indispensable mantener el control sobre estas micotoxinas y prevenir la posible aparición de ellas en los productos, desde su producción primaria hasta el final de la vida de anaquel (Bibek y Arun, 2010).

Los alimentos que típicamente pueden ser alterados por levaduras provocando su descomposición son las frutas frescas, los jugos de frutas, las conservas y los concentrados de jugos de frutas. Son alimentos con un pH bajo (2.5 a 4.0) con un contenido de carbohidratos de 5 a 15% en jugos y bebidas, pero en concentrados y conservas fluctúa entre 40 y 60% por lo que el contenido de azúcar reduce la actividad de agua. Las levaduras causan tanto la oxidación (producción de CO₂) como la fermentación (producción de alcohol y CO₂) de estos productos.

Todas las micotoxinas son de origen natural; son metabolitos secundarios de hongos filamentosos y pueden producirse en una gran variedad de productos agrícolas (Piacentini, 2015-b)

Diferentes estudios han demostrado que la cebada puede estar contaminada por hongos; desde una perspectiva tecnológica, la persistencia de los hongos puede reducir la comerciabilidad de un producto y causar pérdidas económicas. Esto disminuye la calidad del grano y, en consecuencia, el producto final es afectado notablemente (Noots, Delcour & Michiels, 1999). La contaminación del grano de cebada por *Fusarium* reduce la capacidad de germinación y la calidad del grano, lo que a su vez genera bajo rendimiento y pérdidas económicas (Oliveira *et al.*, 2012). A pesar de que *Fusarium spp.* se conoce como “hongo del campo”, también puede crecer durante el almacenamiento (Hashmi y Ghaffar, 2006; Oliveira *et al.*, 2012). También se ha reportado la presencia de *Fusarium verticilloides*, el cual es un productor de fumonisinas B (FBs), en cebada. Las fumonisinas son una familia de micotoxinas carcinogénicas que causan enfermedades que afectan a humanos y animales. Más de 10 tipos de FBs se han aislado y caracterizado. De estas, fumonisina B₁ (FB₁), fumonisina B₂ (FB₂), y fumonisina B₃ (FB₃) son las que se producen mayoritariamente en la naturaleza siendo la fumonisina FB₁ la que prevalece y es más tóxica. Estas toxinas son catalogadas en el grupo 2B carcinógeno por la Agencia Internacional de Investigación contra el cáncer. (IARC, WHO, 1993).

Con respecto a las micotoxinas producidas por *Fusarium* podría decirse que son producidas en el campo sin embargo puede darse la síntesis de toxinas durante el almacenamiento e incluso durante la germinación de la cebada en el malteado y en el proceso de fabricación de cerveza. (Pietri y cols, 2010; Paicentini, 2015-a). Básicamente, la temperatura y condiciones de humedad son factores cruciales que promueven infecciones por hongos y síntesis de toxinas.

También se han reportado micotoxinas en productos de origen animal, principalmente porque los animales se alimentan de cereales que las contienen, y las acumulan en sus propios tejidos; por ejemplo, el alimento para trucha arcoíris

incluye rastrojo de soya, soya granulada, maíz, trigo, salvado de trigo, harina de gluten de maíz, aceite de soya, comida y aceite de pescado, entre otros, formulado para diferentes etapas de vida de la trucha y presentado en gránulos compactos en diferentes tamaños. Habitualmente la producción de trucha se basa exclusivamente en alimentación comercial (Pietsch *et al.*, 2011). Como consecuencia, la presencia de hongos en alimento para peces indica contaminación debida probablemente a una inapropiada selección de materia prima o inadecuado almacenamiento y constituyen una fuente potencial de micotoxinas. La ingesta de alimento de baja calidad tiene un efecto adverso en la salud animal así como en la productividad (Greco *et al.*, 2014; Manning *et al.*, 2012). Además, si las micotoxinas se transfieren en la carne y los huevos de los peces de cultivo, el alimento contaminado supone un riesgo adicional para los consumidores humanos (Wonzy *et al.*, 2013).

La materia prima usada en la alimentación de producción animal es, con frecuencia, fuente de mohos y micotoxinas. Una cuenta elevada de hongos indica una baja calidad de materia prima y/o malas prácticas de manufactura. Los hongos que crecen en la materia prima afectan la calidad nutricional, pero sobre todo, los alimentos que no cumplen con criterios de calidad higiénica, implican riesgos para la salud animal y humana (Greco, *et al.*, 2014).

Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum y Saccharomyces cerevisiae.

En el presente trabajo se utilizaron los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* porque son importantes desde el punto de vista agroalimentario, son mohos que infectan cultivos y producen algunas micotoxinas en diferentes productos vegetales, antes de su recolección y causan problemas durante el almacenamiento, debido al incremento de su producción (Soriano, 2007). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la más utilizada para elevar el pan en el horneado y producir alcohol en la cerveza, y aunque no puede producir enfermedades de origen alimentario si pueden deteriorar los alimentos (Bibek y Arun, 2010; Hayes, 2012).

Se aprovecharon sus características morfológicas, que son las más usadas para la identificación de hongos filamentosos, para su diferenciación y recuento en el medio de crecimiento Agar Papa Dextrosa.

Las especies de *Penicillium* son consideradas como contaminantes habituales de diferentes sustratos. Estas especies forman colonias que crecen generalmente de manera rápida en medio como el Agar Papa Dextrosa, están formadas por densas agrupaciones de conidióforos y la mayoría presentan coloraciones verdosas-azuladas. La textura de la colonia es una característica relevante, porque suelen describirse con los siguientes adjetivos, aterciopelada, lanosa, funiculosa y fasciculada, característica que depende de la disposición de los conidióforos (Soriano, 2007; Bibek y Arun, 2010). *Penicillium chrysogenum* produce colonias aterciopeladas verdosas con una corona radial ancha y blanca, el reverso es habitualmente amarillento o cremoso. Es el moho productor de penicilina más conocido.

Las especies del género *Aspergillus* son mayoritariamente ubicuas, aislándose de diferentes sustratos, aunque con mayor frecuencia de climas cálidos. Las colonias de las especies de este género se desarrollan en general de forma rápida en Agar Papa Dextrosa y presentan diversas tonalidades: blanquecinas, amarillentas, negruzcas, marrón negruzcas. Están formadas por densas agrupaciones de conidióforos sobre los que se encuentran las células conidiógenas que son las que originarán las esporas asexuales o conidios. Las colonias de *Aspergillus niger* tienen coloración negruzca porque sus conidios son negros (Soriano, 2007), reverso incoloro y sus colonias densas.

La mayoría de las levaduras necesitan mayor humedad que los mohos para crecer y en sustratos que contienen elevadas concentraciones de solutos. Las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en Agar Papa Dextrosa son de apariencia húmeda, algo mucosas, cremosas, blandas, glabras y el color de las colonias es blanco (Camacho *et al.*, 2009).

Métodos convencionales para el recuento de microorganismos

Los métodos de referencia para el análisis microbiológico de los alimentos, (incluyendo, materias primas agropecuarias, alimentos para animales, aditivos y muestras de procesamiento y manejo de alimentos), se estandarizan a nivel internacional a través de la *International Organization for Standardization* (ISO) y a nivel europeo por el *European Committee for Standardization* (CEN). Los procesos de estandarización consisten en el establecimiento de documentos de referencia en concordancia con todos los países e instituciones involucradas. Estos métodos de referencia tiene su base principal en la microbiología convencional o tradicional, y aseguran la característica principal de las normas internacionales: el mayor consenso y la más amplia aplicabilidad en todo el mundo. La aplicación de los métodos de referencia requiere de personal hábil, con una intensa labor que consume tiempo, debido a la preparación de medios de cultivo y al tiempo necesario para el crecimiento de los microorganismos (Lombard y Leclercq, 2011).

En México, los métodos de referencia se encuentran en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), que tienen como principal objetivo prevenir riesgos a la salud, la vida y el patrimonio, por lo que son de observancia obligatoria (Alanís, 2014).

Una NOM establece de manera general:

- definición del producto, servicio o proceso,
- especificaciones que éste debe cumplir,
- métodos de prueba con los que se puede verificar que cumplan y
- autoridades que vigilarán el cumplimiento, lo cual es muy relevante ya que las NOM no servirían de mucho si no se vigilara su aplicación (Alanís, 2014).

En México la “NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos” indica que el Agar Papa Dextrosa es el medio de cultivo indicado para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos; este medio se encuentra disponible comercialmente en forma deshidratada o se puede preparar

a partir de una infusión de papa. Los carbohidratos que contiene favorecen el crecimiento de hongos y levaduras, al igual que de bacterias; para conferir selectividad al medio para inhibir bacterias y que desarrollen los hongos y las levaduras, se acidifica. El pH se disminuye a 3.5 ± 0.1 con ácido tartárico al 10%. La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos mohos (Camacho *et al.*, 2009).

Métodos rápidos para el recuento de microorganismos

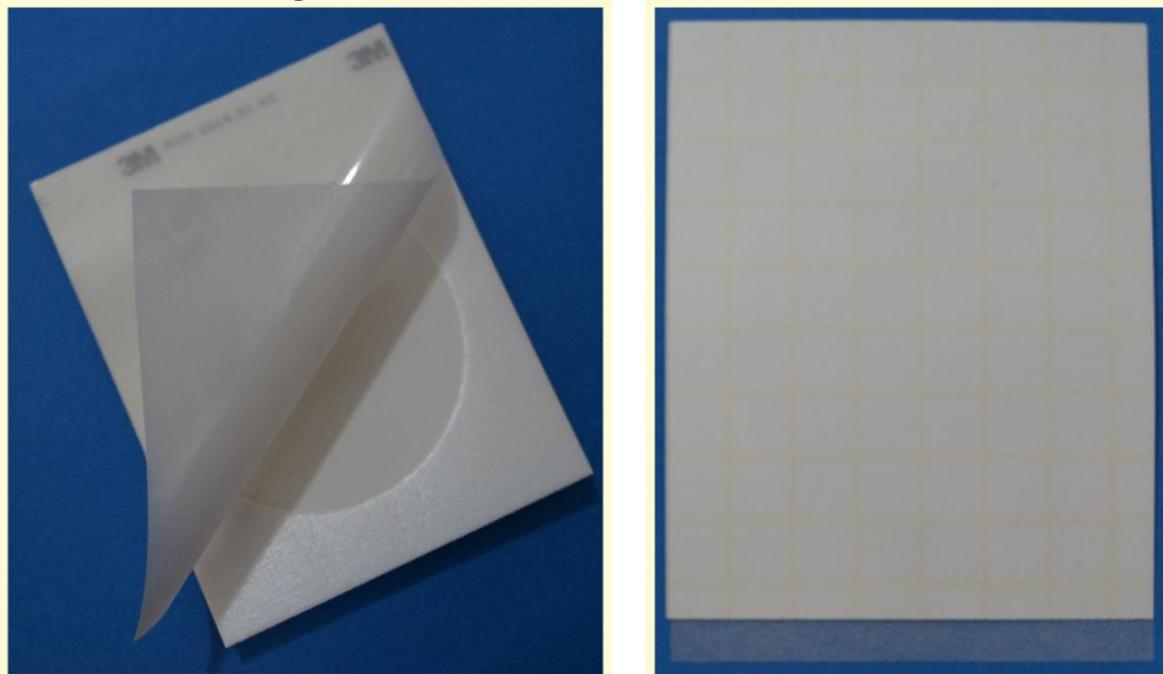
El desarrollo de los métodos rápidos empezó a mediados de los años sesenta, en respuesta a la necesidad de realizar los análisis microbiológicos de manera más eficiente y rápida. Empezó la era de los métodos alternativos a la microbiología convencional y con el paso de los años, las premisas iniciales fueron cambiando; se incluyeron requerimientos adicionales como incrementar la especificidad y la sensibilidad facilitar la lectura, reducir los residuos, entre otros (Tanús, 2014). Como resultado de la creciente conciencia de los consumidores por la inocuidad de los alimentos, la industria de alimentos que confirma la seguridad y la calidad de sus productos mediante pruebas de laboratorio, comenzó a utilizar estas nuevas tendencias y a implementar los métodos alternativos (Montville y Matthews, 2010).

Para lograr resultados en tiempos cortos y, algunas veces, con un desempeño mejor, se han desarrollado los métodos rápidos en microbiología de alimentos, que difieren de los métodos “tradicionales”, que tienen su base en la microbiología convencional. Una de las tecnologías que han permitido generar métodos rápidos es el uso de sustratos cromogénicos que facilitan el reconocimiento visual de los microorganismos objetivos, en tiempos más cortos, precisamente por el color en las placas (Lombard y Leclercq, 2011).

Placas Petrifilm RYM de 3M™

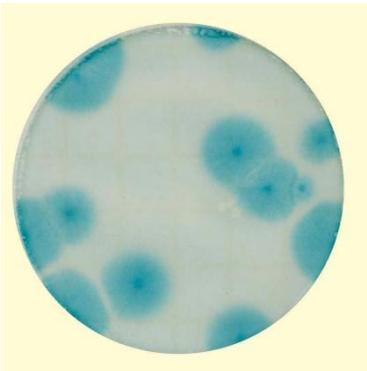
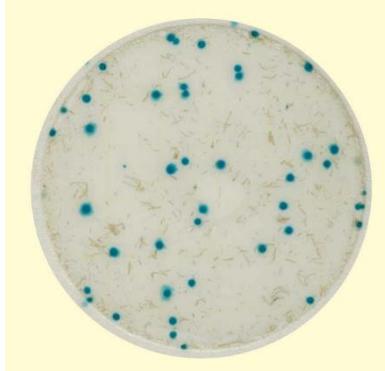
Las placas Petrifilm RYM, por sus siglas en inglés “rapid yeast and mold”, consisten en dos películas de plástico unidas por el lado superior, recubiertas con nutrientes deshidratados, con antibióticos, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador que facilita la enumeración de mohos y levaduras. (3M, 2015). La película superior es delgada y transparente para permitir el conteo de las colonias y la película inferior es más gruesa porque consta de un área circular determinada para colocar en ella la muestra, esta película también tiene incorporada una cuadrícula para facilitar el recuento. Las películas se hidratan al colocar la muestra, una vez hidratadas se adhieren al entrar en contacto, inmobilizando a las células microbianas y evitando la deshidratación del medio durante la incubación. Las placas Petrifilm RYM fueron desarrolladas por la compañía 3M y designadas (Jay, 2006). La figura 1 muestra la placa Petrifilm RYM.

Figura 1. Placa Petrifilm RYM de 3M™



Fuente: Sanabria, 2015

Las colonias de mohos y levaduras se diferencian en las placas RYM de acuerdo con las características señaladas en la tabla 4.

Tabla 4. Características de mohos y levaduras en placas Petrifilm RYM		
Morfología colonial	Mohos	Levaduras
Tamaño	Grandes	Pequeñas
Bordes	Difusos	Definidos
Color	Azul o azul verdoso que se intensifica con incubación prolongada	Beige, rosado, canela o verde-azulado
Elevación	Planas	Elevadas
Otros	Centro más oscuro	Color uniforme
Ejemplos		

Fuente: elaboración de la autora a partir de 3M, 2015; Fotos: Sanabria, 2015

Utilización de placas 3 M Petrifilm RYM™

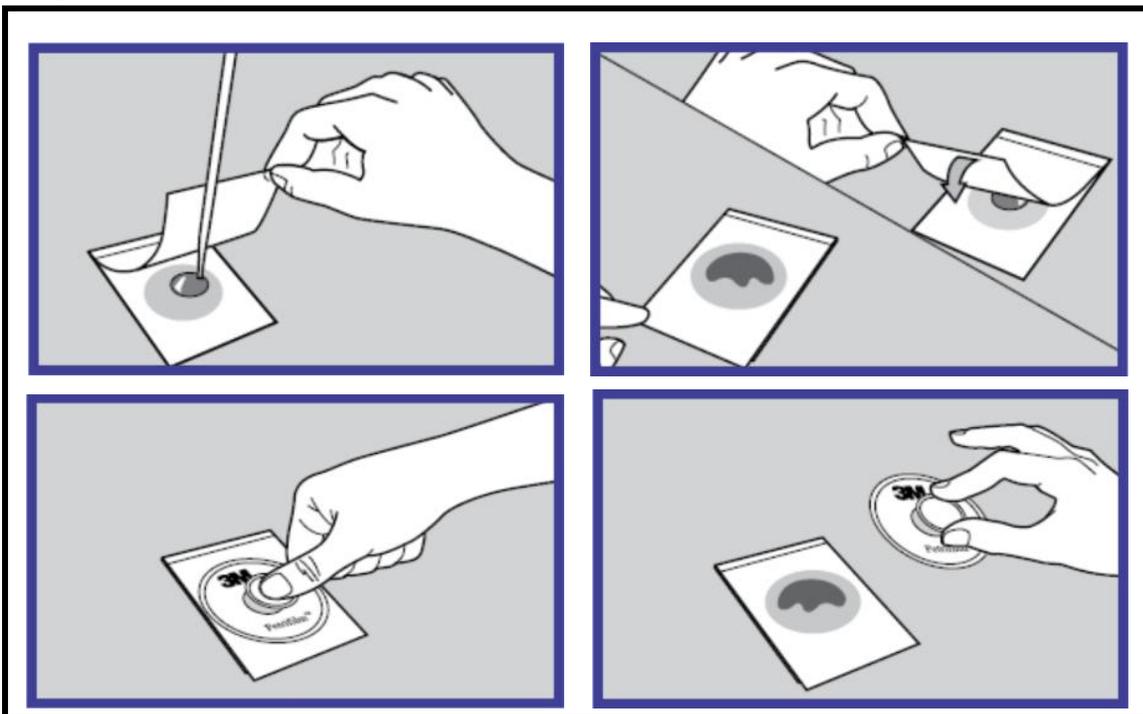
Una de las ventajas de estas placas es que son muy fáciles de usar.

Se parte de diluciones decimales en un diluyente adecuado, como en la mayoría de los análisis microbiológicos de alimentos. Una vez marcadas las placas, se forma un pequeño pliegue en la pestaña inferior de éstas, para levantar la cubierta. Se transfieren alícuotas de 1 ml de las diluciones de prueba, a cada una de las placas 3M Petrifilm RYM. La película superior se baja con cuidado para no atrapar aire, y se extiende la alícuota con el difusor (una placa de plástico especial para esto).

Las placas se dejan en reposo durante un minuto y se incuban durante 48 ± 2 horas a $25-28 \pm 1$ °C en posición horizontal cara arriba, apiladas en no más de 20 placas. Las colonias típicas se enumeran y reportan como ufc/g. el intervalo de lectura para placas 3M Petrifilm RYM es de 10-150 colonias (3M Petrifilm, s.f).

La figura 2 esquematiza el proceso.

Figura 2. Esquema de inoculación de placas Petrifilm



Fuente: 3M, s.f.

Ventajas y Desventajas de 3M Petrifilm RYM™

Ventajas

Las placas 3M Petrifilm RYM son tan confiables como el método tradicional en Agar Papa Dextrosa acidificado (APD); se pueden utilizar con alimentos de actividad acuosa baja y alta. Además del hecho de que se eliminan las etapas de preparación de medios de cultivo y disposición de los medios usados, que ocupan tiempo de trabajo considerable, eliminan la necesidad de ajustar el pH del medio. Tampoco es necesario agregar antibióticos, pero las dos ventajas más importantes son que la estandarización del medio es excelente, por lo que elimina variaciones y errores originados en la preparación y acidificación del medio; da resultados en sólo 48 ± 2 h, a diferencia del método tradicional que requiere de 72 a 120 h.

Además, la lectura se facilita gracias a la cuadrícula de la placa y al indicador que contiene y que facilita notablemente la diferenciación de colonias y de partículas de alimento. También permite la recuperación de las colonias, levantando la cubierta superior, se toma la colonia del gel de ésta y se puede observar al microscopio, cultivar, identificar o conservar.

Finalmente, ahorra mucho espacio en la incubadora, tanto por su pequeño tamaño como por la incubación mucho más corta.

Desventajas

Aunque en realidad es un método muy conveniente, ocasionalmente las matrices de alimentos pueden mostrar interferencias en la placa RYM, por ejemplo, algunos alimentos que contienen altos niveles de enzimas pueden causar un color azul uniforme de fondo (3M Petrifilm, s.f.). En especial la fosfatasa, presente en todas las células vivas, y que hace virar el indicador de las placas para facilitar el recuento de colonias, puede estar presente en algunos alimentos crudos o procesados que contienen células vivas (y por tanto, fosfatasa). Cuando esto sucede, la fosfatasa provoca el vire del indicador a un color azul uniforme en todo

el medio o en puntos azules intensos, de forma irregular, debido a las partículas del alimento (3M Petrifilm, s.f.).

La reacción de color por la fosfatasa natural en un producto se puede distinguir y/o minimizar de la reacción causada por las colonias de levaduras y mohos mediante las siguientes técnicas (3M Petrifilm, sin año):

- 1) Dilución: Si es posible, una mayor dilución eliminará el color azul del medio, o se reducirá el número de puntos azules.
- 2) Sedimentación de las diluciones: Después de homogeneizar la muestra, reposar 3 a 5 minutos para eliminar partículas grandes del alimento, especialmente cuando causan reacciones de color de tipo puntiforme.
- 3) Control de la temperatura de incubación: Como la fosfatasa reacciona más rápido a mayor temperatura, si las placas se incuban a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, la reacción será más lenta y permitirá detectar las ufc de mohos y levaduras, antes de que la fosfatasa de la matriz haga virar todo el indicador.

Desde luego, estas variantes sólo se recomiendan cuando no es posible hacer la determinación en las condiciones normales del método.

Validación

La validación es el proceso de determinar si un método es adecuado para los fines previstos (AOAC, 2012).

La validación de un método alternativo consiste en demostrar que los resultados obtenidos con el método alternativo son comparables con los resultados que se habrían obtenido con el método de referencia. La palabra 'comparable' se puede entender como 'al menos equivalente' (Lombard y Leclercq, 2011).

Un método de validación confirma, mediante la experimentación y generación de evidencia objetiva, que se cumplan los requisitos particulares para un uso específico previsto.

En un laboratorio, el “uso específico previsto” implica conocer el por qué y el para qué de los análisis a las muestras, así como el propósito para el cual se usarán los datos que resulten.

Para la evidencia objetiva, los laboratorios necesitan tener o referirse a estudios de validación. Para la confirmación, los laboratorios tienen que comparar la información obtenida de los estudios de validación con los requisitos del cliente (Lombard y Leclercq, 2011).

Validación de métodos microbiológicos

Existen varias organizaciones como la *ISO*, la *International Dairy Federation* (FID) y la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) que validan la efectividad de los métodos de análisis para alimentos y existen organizaciones como la *Food and Drug Administration* (FDA) y el *United States Department of Agriculture* (USDA) que a pesar de no validar, disponen de manuales donde incorporan métodos rápidos a los protocolos de análisis de alimentos (Matthews & Montville, 2009).

En general, las prácticas actuales en microbiología de los alimentos se validan por comparación con un estándar, típicamente un método oficial o regulatorio, tales como los de AOAC internacional *Official Method of Analysis*, método de la FDA *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), de USDA *Microbiological Laboratory Guidebook* (MLG) o con el método de *ISO* (Brunelle, 2008). En México, los métodos de referencia están en las Normas Oficiales Mexicanas o NOM.

Tipos de validación

La validación de un método se puede llevarse a cabo en un solo laboratorio, por ejemplo el laboratorio general del desarrollador de método; se denomina “Validación en laboratorio individual” o en inglés *Independent Validation ó Single Laboratory validation*. El estudio de validación independiente verifica tradicionalmente la repetibilidad en las manos de un usuario especializado independiente (AOAC, 2012).

Pero también puede llevarse a cabo entre varios laboratorios, trabajando colaborativamente; esto permite corroborar los resultados analíticos obtenidos por el desarrollador del método y proporcionar los datos de varios laboratorios individuales adicionales. Esta modalidad se denomina “Validación de laboratorios colaborativos” o en inglés *Collaborative Laboratory Validation*. Esta forma de validación permite verificar repetibilidad entre usuarios e instalaciones independientes (AOAC, 2012).

El estudio colaborativo es un requisito formal presentación de métodos de AOAC *Official Methods of Analysis* (OMA). El propósito del estudio colaborativo es estimar la reproducibilidad y determinar el desempeño del método candidato entre los colaboradores (AOAC, 2012).

La validación de un método microbiológico para alimentos incluye, generalmente, pruebas de inclusividad y exclusividad para establecer la selectividad del método analítico para el microorganismo objetivo. En otras palabras, el método es *inclusivo* con el microorganismo objetivo, y es *exclusivo* para microorganismos no objetivos (*non-target*), pero relacionados estrechamente con el microorganismo objetivo. Tales pruebas se hacen con cultivos puros para establecer el alcance analítico del método (Brunelle, 2008).

Además de dichas pruebas, el método se pone a prueba con una gama de matrices alimentarias artificial o naturalmente contaminadas para establecer:

- 1) que las matrices de alimentos no interfieren ya sea con el crecimiento del organismo o con su detección, y
- 2) que la microbiota de acompañamiento encontrada naturalmente en los alimentos, no suprime el enriquecimiento o detección del organismo objetivo (*target organism*).

Es por estas razones que un método se debe considerar validado solamente para aquellos alimentos o tipos de alimentos que han sido probados con éxito en el estudio de validación (Brunelle, 2008).

Cabe recordad que los microorganismos en los alimentos procesados suelen estar estresados pero que un medio de cultivo con condiciones adecuadas de incubación, permite la reparación de lesiones por el estrés (AOAC, 2012).

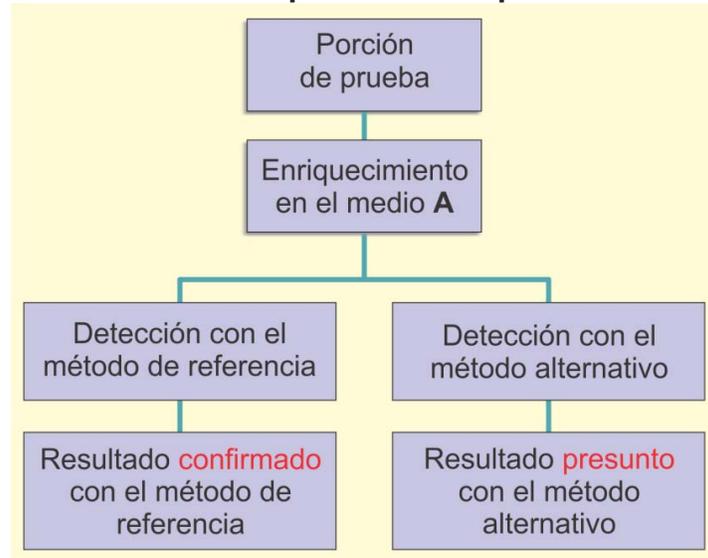
Diseño de la validación

El diseño del método de validación puede ser de dos tipos: diseño de muestras pareadas y diseño de muestras no apareadas. Un diseño de muestra apareada es aquél en el que una sola porción de muestra se enriquece (o se diluye, según requiera el método) y esta porción de muestra se analiza tanto por el método alternativo (método que se está validando) como por el método de referencia (el método oficial o método de regulación). Este diseño aplica bajo un esquema de enriquecimiento común para los dos métodos.

Cuando las condiciones de enriquecimiento o de dilución difieren entre los dos métodos, se usa un diseño de muestras no apareadas. En este caso, dos porciones de la misma muestra se enriquecen o diluyen, de acuerdo con lo establecido por los métodos respectivos y cada una se analiza siguiendo el método correspondiente. De acuerdo al tipo de diseño del método, los datos pueden ser analizados estadísticamente para determinar si hay o no una diferencia significativa entre los métodos (Brunelle, 2008).

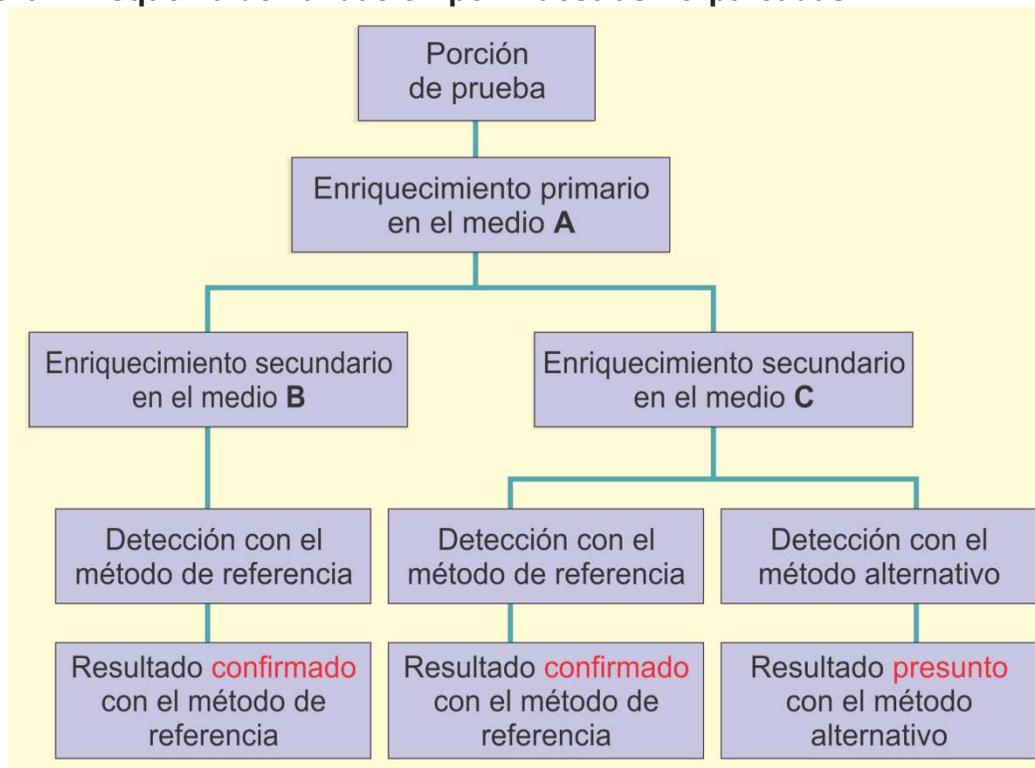
Las figuras 3 y 4 esquematizan, a continuación, las dos formas de diseño de la validación.

Figura 3. Esquema de validación por muestras pareadas



Fuente: Brunelle, 2008

Figura 4. Esquema de validación por muestras no-pareadas



Fuente: Brunelle, 2008

Algunos de los nuevos métodos analíticos disponibles, usan productos innovadores y un requisito esencial para la estandarización de estos productos es que debe ser “abierto” en sus descripciones como composición del medio de cultivo, con el fin de evitar exclusividad en el estándar para un fabricante. Pero entre sus inconvenientes, el principal era que la validación para múltiples usos, es un proceso lento, especialmente cuando se hace bajo estándares europeos e internacionales, ya que el proceso lleva hasta tres años, un ritmo que no facilita la compatibilidad con el desarrollo de nuevas tecnologías. Dada esta situación, los sistemas para la validación de métodos innovadores contra los métodos de referencia se establecieron en la década de 1990, para facilitar el reconocimiento más rápido de estos métodos alternativos y al mismo tiempo proteger el “know-how” (“saber cómo” o tecnología) de las pruebas fabricadas. El método puede validarse como una “caja negra”. Además, estos esquemas de validación, operados por terceras organizaciones independientes de los fabricantes, conjuntan las necesidades de los usuarios de los métodos (de la industria de alimentos, laboratorios públicos y privados, autoridades públicas, cuerpos de acreditación), quienes requieren de garantías para su desempeño. Tales métodos innovadores tienen patentes sobre su tecnología, pero pueden validarse de esta manera (Lombard y Leclercq, 2011).

Estadística empleada

Los datos cuantitativos de pruebas microbiológicas que abarcan múltiples diluciones, a menudo no muestran una distribución estadística normal, es decir, una distribución estadística Poisson ni una distribución estadística Gaussiana. Cuando el mecanismo físico subyacente permite la "agrupación", típicamente una transformación logarítmica normalizará los datos (AOAC, 2012), como sigue:

$$Y = \log_{10} [\text{CFU/unit}]$$

Donde CFU/unit, corresponde a las unidades formadoras de colonia (UFC en español) por unidad reportada de la muestra, por ejemplo g o mL.

Análisis estadístico: *t-Student*

La prueba estadística *t de Student pareada* determina si las medias de la evaluación de dos muestras pertenecen o no a una misma población, e indica si las diferencias encontradas pueden declararse como significativas con un cierto nivel de confiabilidad (Walpole *et al.*, 2012); esto la hace la prueba más apropiada para los objetivos de este trabajo.

Cuando se tienen muestras no pareadas, la prueba *t independiente* se puede usar para la comparación de las medias con los dos métodos y se puede hacer un análisis de varianza de una vía (ANOVA) si se han de comparar más de dos métodos (Walpole *et al.*, 2012).

La prueba *t pareada* se desarrolla calculando la diferencia de las medias entre las muestras pareadas y de aquí el error estándar de la diferencia. La división de la diferencia de las medias entre el error estándar de la diferencia de las medias da el estadístico *t* que tiene distribución *t* con *n-1* grados de libertad. Así,

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / \sqrt{s^2/n},$$

Donde:

\bar{x}_1 es la media del primer método,

\bar{x}_2 es la media del segundo método,

s^2 es la varianza y

n es el tamaño de la muestra

El valor de *t* que resulta se puede comparar con una tabla de valores críticos de la distribución *t* para determinar si la diferencia es o no significativa al nivel de significancia α . Con $\alpha = 0.05$, si el valor calculado es menor que el que se encuentra en las tablas, entonces la diferencia no es significativa al nivel del 5%. Alternativamente, se puede usar la función de la prueba *t* que se encuentra para obtener un valor de *P*. Si $P < 0.05$, entonces se acepta generalmente a la diferencia como significativa (Brunelle, 2008).

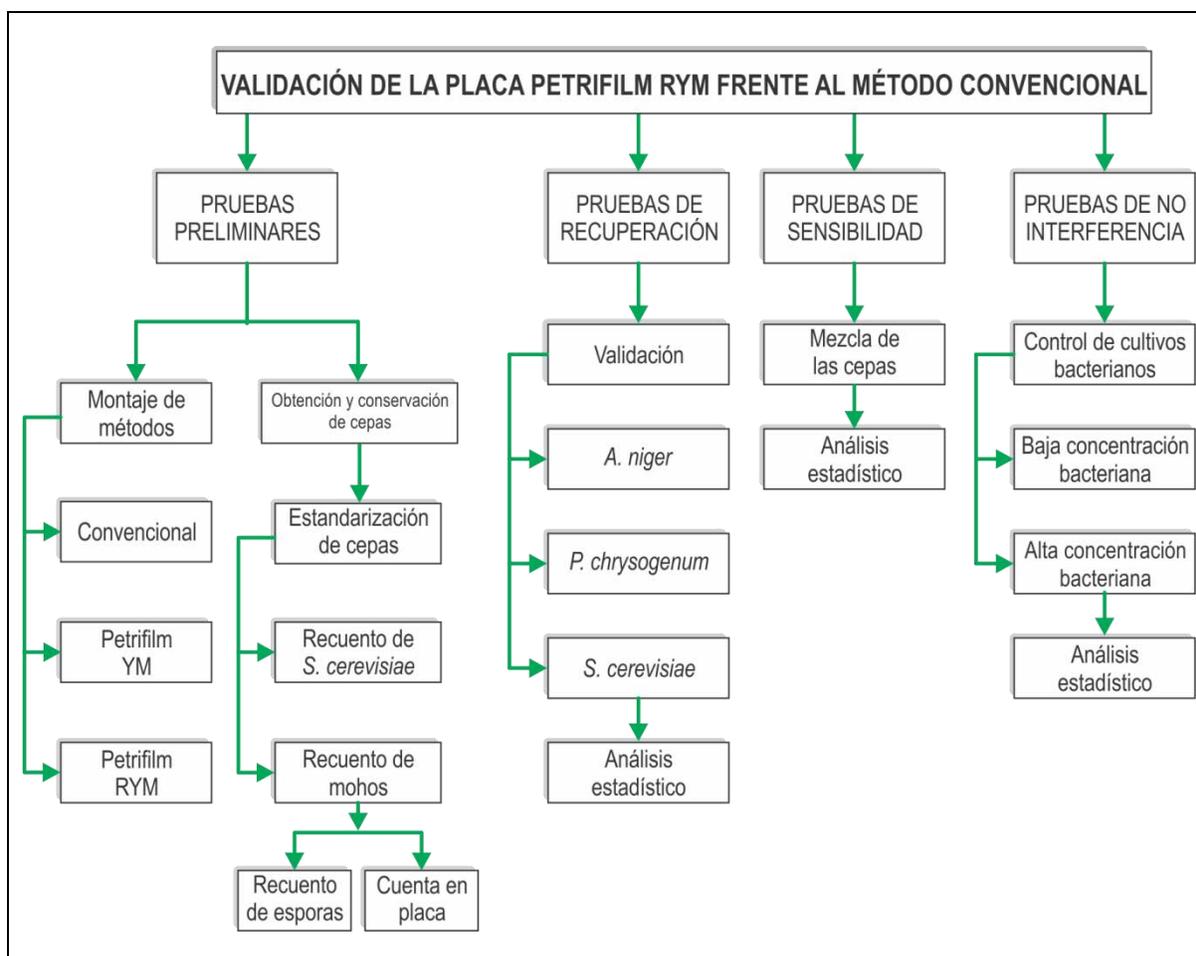
En la prueba *t de Student* el planteamiento de una hipótesis estadística permite obtener una conclusión con base en evidencia experimental. Una hipótesis estadística es una afirmación o conjetura acerca de una o más poblaciones. La estructura de la hipótesis se formula utilizando el término de hipótesis nula. Esto es, cualquier hipótesis que se desee probar y se representa con H_0 . El rechazo de H_0 da como resultado la aceptación de una hipótesis alternativa, que se representa por H_1 (Walpole *et al.*, 2012).

El registro gráfico de los datos proporciona una “imagen” y resume un conjunto de datos experimentales. El uso de gráficos no reemplaza el procedimiento de la prueba, sin embargo, como una herramienta de la prueba, los gráficos proporcionan mayor información o información visual para guiar al analista en la toma de decisiones; con frecuencia el gráfico es el mejor medio para comunicar la evidencia. De manera semejante, una figura aclara el porqué se encuentra o no diferencia significativa. Para la comparación de medias, las graficas de caja y bigote proporcionan información visual concreta. Este tipo de graficas exhiben el percentil 25, el percentil 75 y la mediana de un conjunto de datos (Walpole *et al.*, 2012).

Para el análisis estadístico se utilizó el software libre R, tanto para calcular *t de Student* como para obtener los gráficos de caja y bigote.

Metodología

Figura 5. Esquema general de metodología



La metodología se llevó a cabo en las siguientes etapas:

1 Pruebas preliminares.

1.1 Obtención y conservación de las cepas. Las cepas puras utilizadas fueron: *Aspergillus niger* CFQ-H-18-3, *Penicillium chrysogenum* CFQ-H-63-1 y *Saccharomyces cerevisiae* CFQ-L-26-3; todas fueron proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Se conservaron en medio inclinado de agar-papa-dextrosa (APD) en refrigeración. Los cultivos de trabajo se obtuvieron mediante resiembra en medio inclinado de APD, incubados a 28°C por 5 a 7 días para la

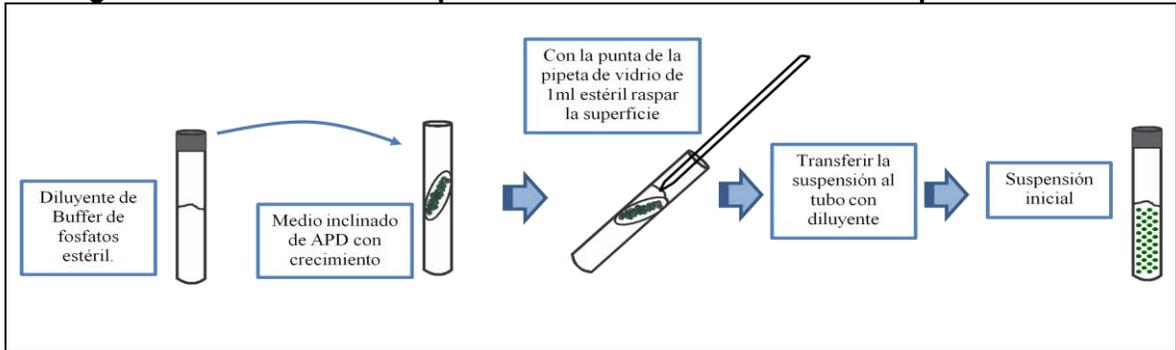
formación abundante de esporas, en el caso de los hongos. Las levaduras se resembraron igual y se incubaron a 28°C por 48h, para obtener un crecimiento abundante.

1.2 Montaje de métodos. Incluyó las placas Petrifilm YM (*yeast & mold*), placas RYM y las placas tradicionales de APD, para obtener resultados consistentes para la analista en cada uno de los métodos (NOM-111-SSA1-1994; 3M Placas Petrifilm^{MR}, 2003). Por otro lado, las cepas se estandarizaron mediante su recuento en cada uno de los métodos.

1.3 Estandarización de cepas. Se llevó a cabo para establecer qué diluciones son necesarias para inocular cantidades conocidas de los microorganismos, dentro de los intervalos de lectura, en las muestras para la validación.

1.3.1 Para la levadura: A partir del crecimiento de un cultivo de 48 h en APD inclinado, se realizó una cosecha con buffer de fosfatos y raspando con la punta de una pipeta de vidrio. Esta es la suspensión inicial (ver Figura 6), a partir de la cual se hicieron diluciones decimales en buffer de fosfatos, desde 10^{-1} hasta 10^{-9} . Después se tomó 1 mL de cada una de las diluciones decimales y se inoculó en las placas RYM y YM de PetrifilmTM, de acuerdo con la técnica de 3M (3M, 2003); también se inocularon cajas Petri para hacer placas vertidas con APD estéril, fundido, acidificado y a 45°C, conforme a lo descrito en la NOM-111-SSA-1994. Todo el procedimiento se realizó con material estéril y en el área aséptica. Una vez inoculadas las placas se incubaron a 28°C por 48 h para las placas RYM y por 5 días para las placas de APD y YM. Finalmente se hizo el recuento de las unidades formadoras de colonia ó UFC.

Figura 6. Obtención de suspensión inicial de levadura o de esporas.



Fuente: Elaboración de la autora

1.3.2 Para los mohos: A partir del crecimiento de un cultivo de 5 días en APD inclinado, se realizó una cosecha con buffer de fosfatos y raspando las esporas con la punta de una pipeta de vidrio. Esta es la suspensión inicial de esporas (ver Figura 6). En este caso se hizo un recuento directo de esporas por el método de Breed; se colocaron 50 μL (microlitros) de la suspensión inicial en el centro del portaobjetos limpio y después se colocó el cubreobjetos limpio y el volumen se distribuyó uniformemente; dadas las medidas del cubreobjetos, el área ocupada por el volumen de la muestra es de 484 mm^2 . Esta preparación se examinó con el microscopio con 1000 para contar las esporas por campo. Se contaron 25 campos diferentes distribuidos por la preparación y se calculó el promedio de esporas por campo. Previamente se determinó el área del campo microscópico, midiendo el diámetro con el objetivo micrométrico. Conociendo el área de la muestra y el área del campo es posible calcular el número de campos presentes; a continuación se calcula la cantidad de esporas por mililitro aplicando las siguientes relaciones:

$$\# \text{ campos} = \frac{\text{área de la muestra}}{\text{área del campo microscópico}} \quad (\text{a})$$

$$\left(\frac{\# \text{ campos}}{\text{volumen de la muestra}} \right) \left(\frac{\text{promedio de esporas}}{1 \text{ campo}} \right) = \frac{\text{esporas}}{\text{mL}} \quad (\text{b})$$

Considerando que cada espora es una UFC, se establecieron las diluciones necesarias para inocular entre 10 y 150 UFC en las placas RYM y en las cajas Petri a las que se vertió el APD. Se incubaron a 28°C por 48 h y 5 días respectivamente. Al término de la incubación se hizo el conteo de UFC.

1.4 Recuento de *S. cerevisiae*. Con base en los resultados de la estandarización de la cepa, se eligió la dilución decimal en donde se tuviesen 10 a 150 UFC/mL, así como una dilución inferior y una superior con el objetivo confirmar la consistencia de los resultados. Las diluciones elegidas se inocularon en placas Petrifilm RYM, en placas Petrifilm YM y en las placas vertidas de APD. Transcurridas 48 horas de incubación, se hizo el recuento de las placas RYM; el recuento en YM y APD se hizo a los 5 días de incubación.

1.5 Recuento de mohos. Con base en los resultados de estandarización de las cepas, se eligieron la dilución decimal con 10 a 150 esporas /mL, la inferior y la superior. Se inocularon en placas Petrifilm RYM, en placas Petrifilm YM y en las placas vertidas de APD. Transcurridas 48 horas de incubación, se hizo el recuento de las placas RYM; el recuento en YM y APD se hizo a los 5 días de incubación.

2 Pruebas de recuperación.

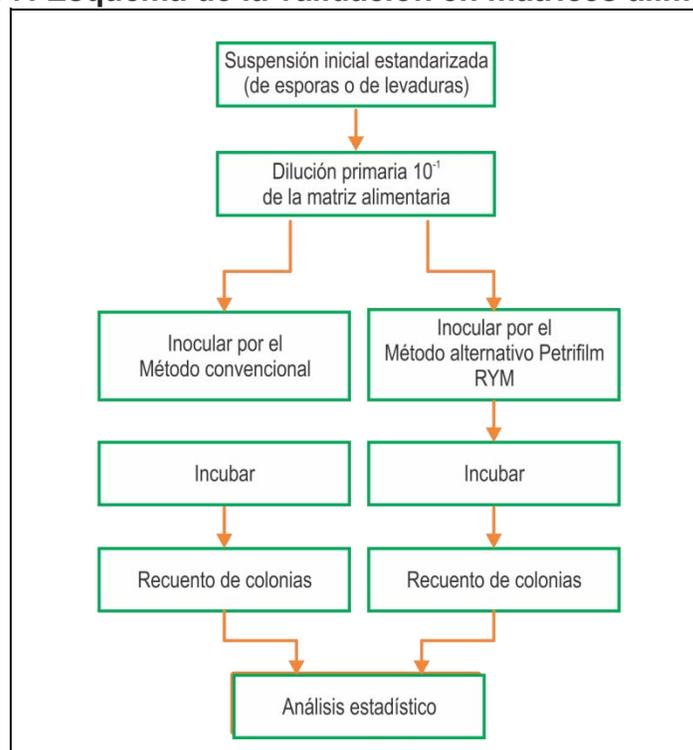
2.1 La prueba de recuperación se aplicó para cada una de las cepas de trabajo para hacer la validación. Con las cepas de los mohos, a partir de la estandarización, se determinó en qué dilución se podían obtener 40 a 60 esporas/mL. Se inocularon por duplicado, placas Petrifilm RYM y convencionales. Se incubaron a 28°C por 48 h y 5 días respectivamente y se contaron. Se hicieron 33 placas de cada método para cada uno de los microorganismos en estudio y se aplicó el análisis estadístico.

2.2 Para la levadura se procedió a elegir el factor de dilución que permitía tener de 100 a 120 UFC/mL. Se inocularon 33 réplicas por duplicado, en placas RYM y convencionales; se incubó y se contaron UFC como se ha descrito anteriormente. Se aplicó el análisis estadístico.

2.3 La validación de las placas con cada una de las matrices alimentarias se hizo mediante la prueba de recuperación. Las matrices utilizadas fueron: tortillas de maíz y fécula de maíz, éstas fueron inoculadas con cada una de las cepas de trabajo.

Se preparó la primera dilución decimal de matriz tortilla y ésta se inoculó con el microorganismo de prueba, con 100 a 120 UFC/mL de levadura y 40 a 60 esporas/mL de moho. En este caso se hicieron 33 réplicas de cada matriz, por duplicado, con cada uno de los microorganismos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*. Se incubaron a 28°C por 48 h y 5 días respectivamente y finalmente se contaron. La figura Figura 7 resume estas operaciones.

Figura 7. Esquema de la validación en matrices alimentarias



3 Pruebas de sensibilidad.

Este atributo del método se determinó a partir de la mezcla de las tres cepas, en donde se procedió de igual manera. Se prepararon diluciones decimales con concentraciones adecuadas para el recuento (100 a 120 UFC/mL de levadura y 40 a 60 esporas de mohos), se inocularon 33 placas por duplicado de cada uno de los métodos y se incubó a 28°C/48 h y 5 días respectivamente. Finalmente se hizo el recuento. Esta prueba permitió verificar si al estar juntas, todas las cepas crecían en las cantidades inoculadas, y establecer que ninguna de ellas es inhibida o no deja de detectarse, por la presencia de competidores del mismo grupo (mohos y levaduras).

La prueba de sensibilidad se repitió con cada una de las matrices alimentarias, inoculadas con la mezcla de las tres cepas para confirmar que la matriz tampoco interfiriera con el crecimiento de las cepas de acuerdo a lo mencionado.

4 Pruebas de no interferencia.

Para establecer si el método detecta únicamente los microorganismos de interés (mohos y levaduras) y no de falsos positivos por la presencia limitada o abundante de los otros contaminantes comunes en los alimentos, se mezclaron las tres cepas junto con bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se utilizó cultivo de *E. coli* (ATCC 11229) como bacteria Gram negativa y cultivo de *S. aureus* (ATCC6538) como bacteria Gram positiva. Primero se hizo el control de los cultivos bacterianos, las cepas se cultivaron en caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37°C/24 h. Se determinaron las diluciones que permitirían tener de 100 a 125 UFC/mL.

A continuación, se mezclaron estas dos cepas con las diluciones de la levadura y los hongos, de acuerdo a lo descrito anteriormente. Las placas de APD y RYM fueron inoculadas e incubadas 28°C, al finalizar el tiempo de incubación se hizo el recuento.

Para esta prueba se corrió un blanco para *E. coli* y *S. aureus*, que consistió en inocular por duplicado placas Petrifilm AC™ (*Aerobic Count*). Se inocularon con 1 mL de las diluciones de prueba y se incubaron a 28°C por 24 h. Este procedimiento se realizó con cada una de las matrices alimentarias.

RESULTADOS

Los resultados encontrados se muestran en dos etapas; en la primera están los resultados de la validación de las placas RYM Petrifilm inoculadas con cada una de las cepas de trabajo. En la segunda etapa se muestran los resultados de la validación de las placas RYM Petrifilm utilizando matrices alimentarias de tortilla y fécula de maíz, inoculadas con las cepas de trabajo.

El planteamiento de la hipótesis nula (H_0) y de la hipótesis alternativa (H_1) es:

H_0 : El recuento promedio de hongos y levaduras por el método RYM Petrifilm® es igual al recuento promedio por el método convencional.

H_1 : El recuento promedio de hongos y levaduras por el método RYM Petrifilm® es diferente al recuento promedio por el método convencional.

Es decir, las hipótesis a probar son:

$$\mathbf{H_0: \mu = \mu_0}$$

$$\mathbf{H_1: \mu \neq \mu_0}$$

ETAPA 1. Validación de las placas con las cepas de trabajo

A continuación se integran en una tabla, los parámetros descriptivos de la prueba estadística, con las 3 cepas utilizadas.

Tabla 5. Parámetros descriptivos en la prueba de <i>t-Student</i> utilizando cultivos puros						
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	RYM Petrifilm	Conven-cional	RYM Petrifilm	Conven-cional	RYM Petrifilm	Conven-cional
Media	7.074	7.049	7.482	7.434	7.692	7.648
Varianza	0.009	0.008	0.0072	0.0086	0.003	0.003
Observaciones	30	30	30	30	30	30
Desviación estándar	0.114		0.128		0.083	
Grados de libertad	29		29		29	
Estadístico t	1.202		2.068		2.970	
Valor p	0.2391		0.048		0.006	
Valor crítico de t	2.045		2.045		2.045	
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	NO HAY (p>0.05; α=0.05)		SI HAY (p<0.05; α=0.05)		SI HAY (p<0.05; α=0.05)	

Como se aprecia en la Tabla 5, la prueba *t-Student* indica que no hay diferencia significativa, con un nivel de confianza del 5%, entre Petrifilm RYM y método convencional para *A. niger*; en este caso, los datos no proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Con los cultivos de *P. chrysogenum* y *S. cerevisiae* si hay diferencia significativa, con un nivel de confianza del 5%, los datos proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula en el caso de estas dos cepas.

Las figuras 8, 9 y 10 muestran los diagramas de caja y bigote para las 3 cepas probadas. Dichos diagramas hacen evidente que la dispersión de los datos es ligeramente mayor para las placas convencionales, lo cual se aprecia en la longitud de los bigotes. A pesar de la cercanía de las medias, las placas RYM de Petrifilm mostraron tener igual o mejor eficiencia en la recuperación de los mohos, en comparación con el método convencional. Para la levadura, se puede comprobar visualmente que la dispersión de los datos en ambos métodos es igual.

Figura 8. Diagrama de caja y bigote para recuperación de *A. niger*.

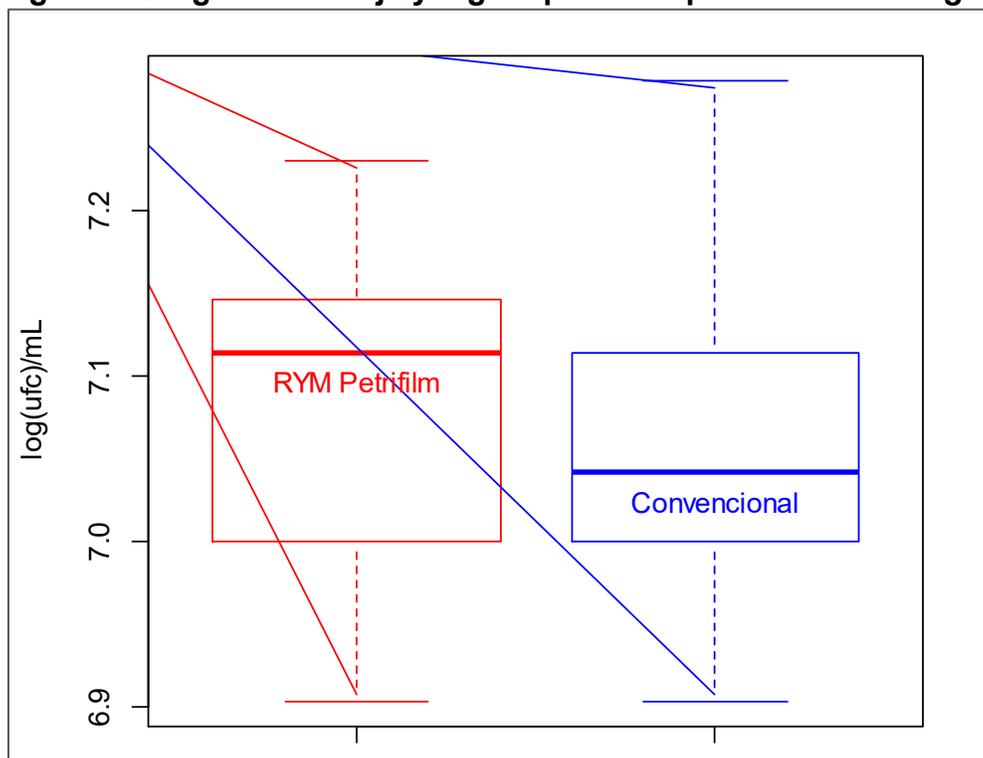


Figura 9. Diagrama de caja y bigote para recuperación de *P. chrysogenum*

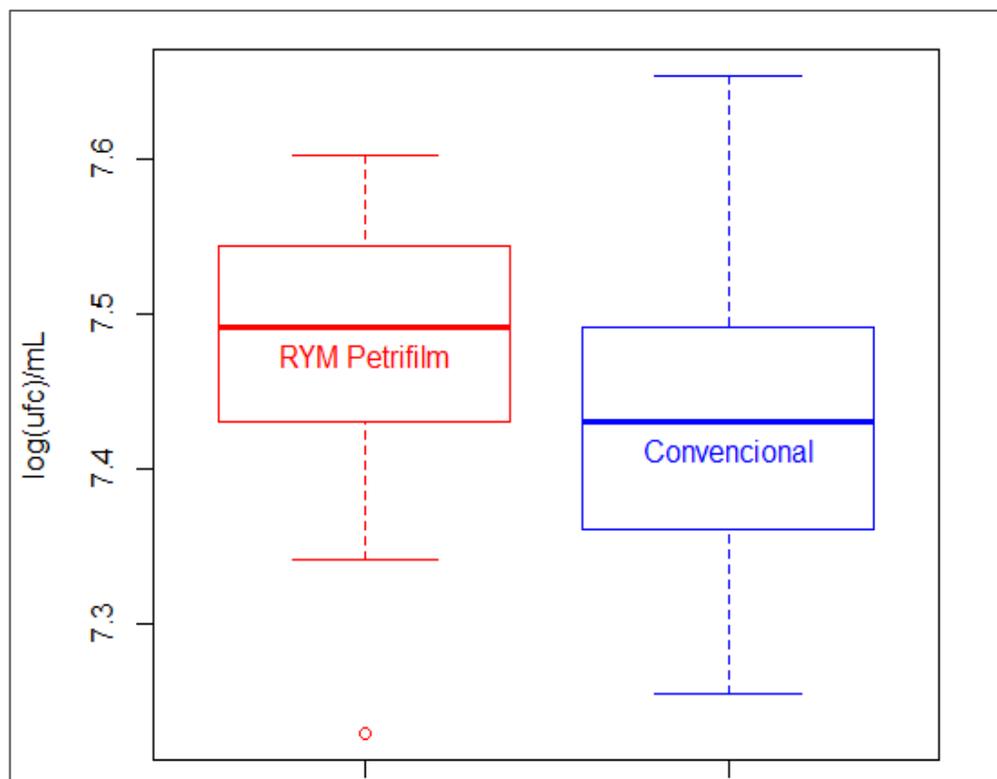
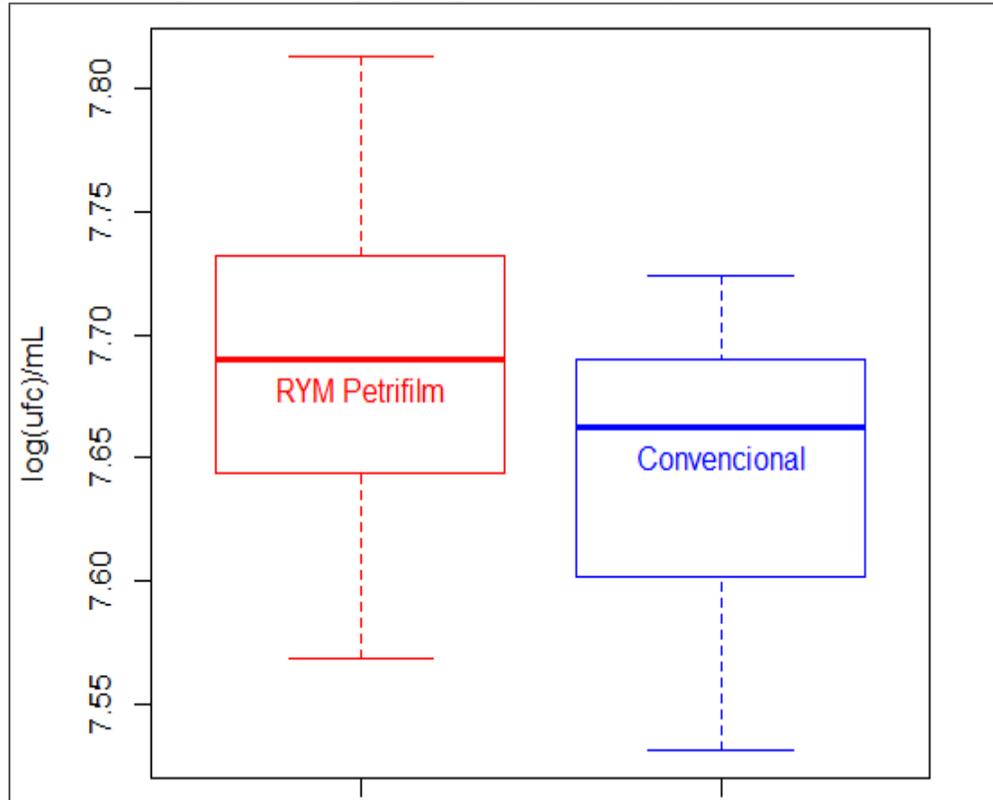
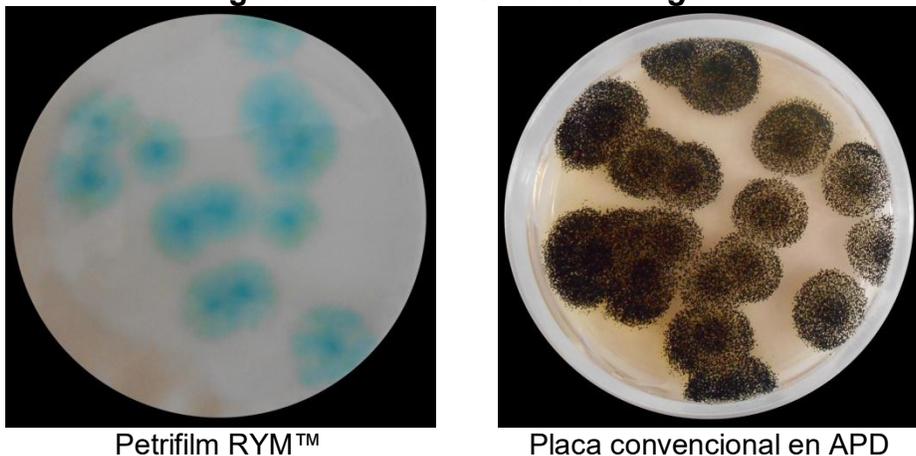


Figura 10. Diagrama de caja y bigote para recuperación de *S. cerevisiae*



Cabe recordar que una ventaja de Petrifilm es que facilita la lectura de las placas al diferenciar claramente las colonias de las partículas de alimentos. Las figuras 10, 11 y 12 muestran las placas de ambos métodos, con el crecimiento de las cepas en estudio.

Figura 11. Crecimiento de *A. niger*.

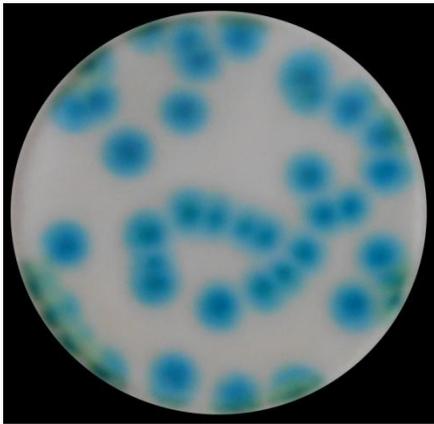


Petrifilm RYM™

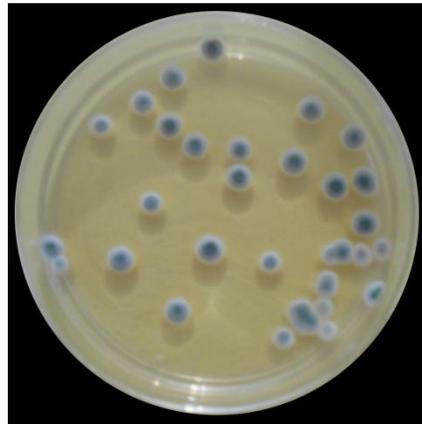
Placa convencional en APD

Fotos: Sanabria, 2015

Figura 12. Crecimiento de *P. chrysogenum*.



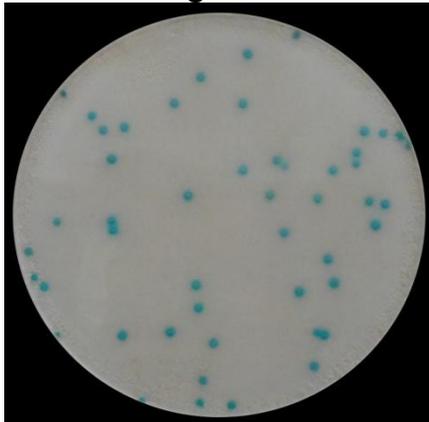
Petriefilm RYM™



Placa convencional en APD

Fotos: Sanabria, 2015

Figura 13. Crecimiento de *S. cerevisiae*.



Petriefilm RYM™



Placa convencional en APD

Fotos: Sanabria, 2015

Prueba de sensibilidad del Método con cultivos puros

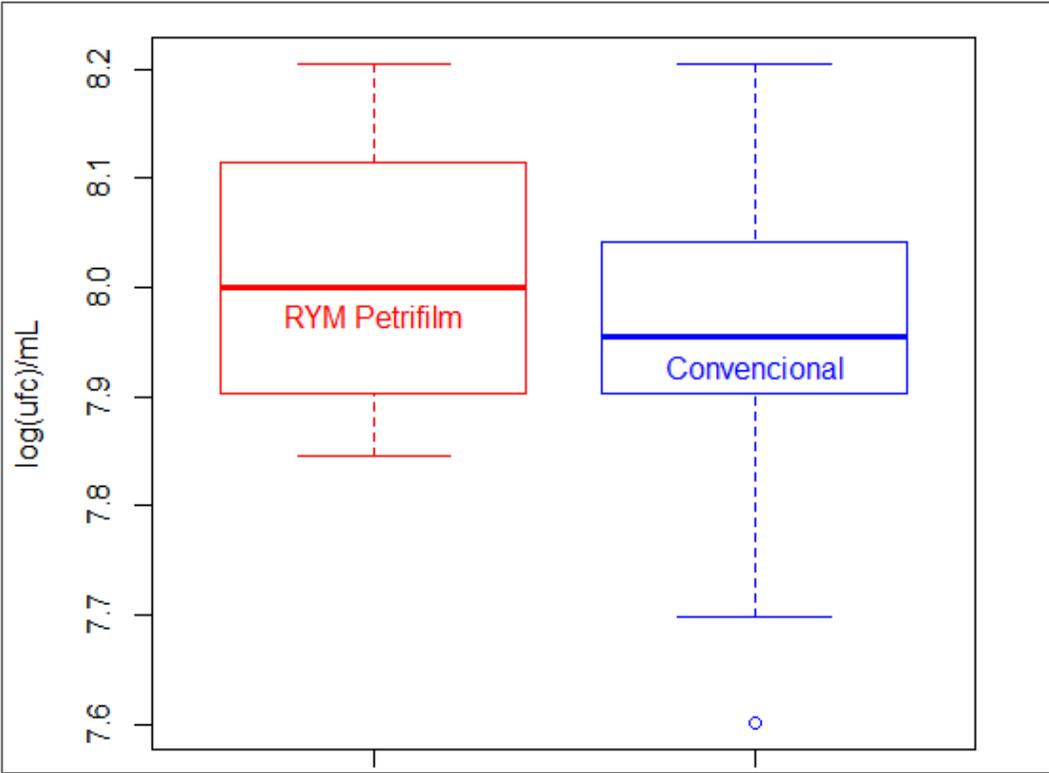
Como se señaló en la metodología, también se realizaron pruebas de sensibilidad del método, con una mezcla de las 3 cepas de prueba, para verificar si, al estar juntas, todas las cepas de interés crecen en las cantidades inoculadas, y descartar efectos de inhibición por la presencia de competidores del mismo grupo (mohos y levaduras). La tabla 6 muestra los datos del análisis estadístico y la figura 13 presenta el Diagrama de caja y bigote para dicha prueba.

Tabla 6. Parámetros descriptivos en la prueba de <i>t-Student</i> para prueba de sensibilidad del método		
Pruebas con mezcla de <i>A. niger</i>, <i>P. chrysogenum</i> y <i>S. cerevisiae</i>, en cultivos puros		
	RYM Petrifilm	Convencional
Media	8.007	7.949
Varianza	0.014	0.021
Observaciones	30	30
Desviación estándar		0.186
Grados de libertad		29
Estadístico t		1.708
Valor p		0.098
Valor crítico de t		2.045
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	NO HAY ($p > 0.05$; $\alpha = 0.05$)	

Como se puede apreciar, no hay diferencia significativa, con un nivel de confianza del 5%, los datos no proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

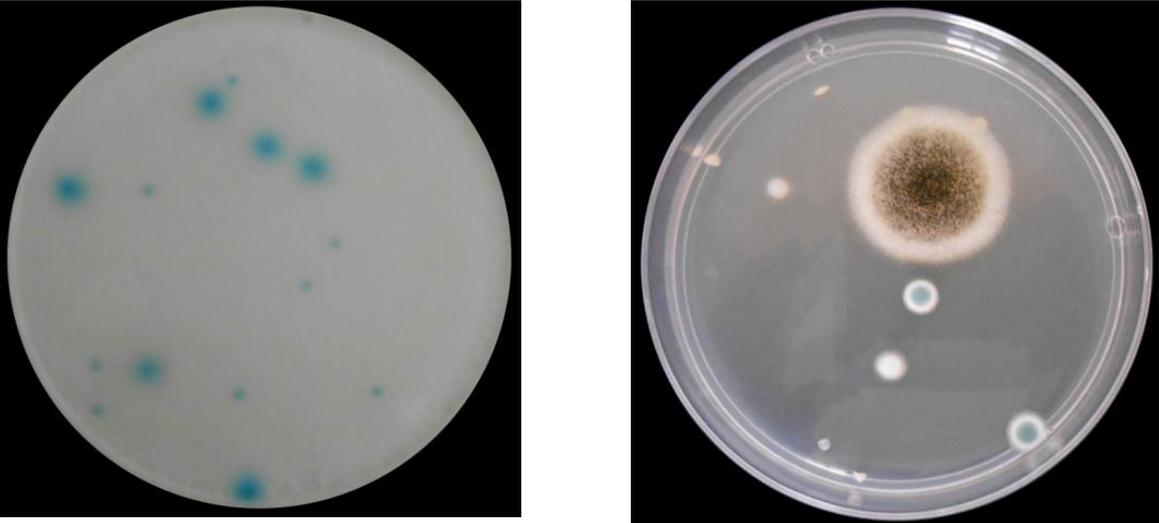
En la Figura 14, el diagrama de cajas muestra que la dispersión de los datos es mayor para el método convencional, las medias son muy cercanas, sin embargo, la media del método RYM Petrifilm es mayor que la media del método convencional, lo que indica una mejor recuperación de las cepas bajo estudio.

Figura 14. Diagrama de caja y bigote para prueba de sensibilidad del método



La figura 15 muestra el crecimiento de las cepas en ambos métodos.

Figura 15. Crecimiento de la mezcla de cepas



Petrifilm RYM™

Placa convencional en APD

Fotos: Sanabria, 2015.

Pruebas de No-interferencia

En estas pruebas se utilizaron las mismas cepas de mohos y levadura: *A. niger*, *P. chrysogenum* y *S. cerevisiae* respectivamente, mezcladas con una bacterias Gram positiva (*S. aureus*) y Gram negativa (*E. coli*).

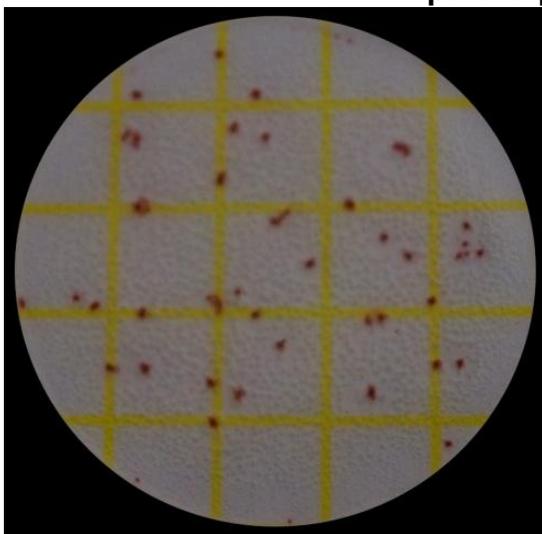
La prueba determinó que no hay interferencia del grupo microbiano ajeno (bacterias). Ninguno de los métodos tuvo crecimiento de las bacterias. Los datos que presenta la tabla 7, corresponden al recuento de colonias de mohos y levaduras que crecieron a partir de esta mezcla de mohos y levadura con bacterias. El análisis estadístico se realizó con la finalidad de saber si existe diferencia significativa entre los métodos cuando hay una alta competencia entre microorganismos del mismo tipo (mohos y levaduras) y microorganismos de diferente tipo (bacterias Grampositivas y Gramnegativas).

Tabla 7. Parámetros descriptivos en la prueba de t-Student, para determinación de no-interferencia		
	RYM Petrifilm	Convencional
Media	8.260	8.114
Varianza	0.046	0.029
Observaciones	30	30
Desviación estándar		0.303
Grados de libertad		29
Estadístico t		2.608
Valor p		0.014
Valor crítico de t		2.045
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	SI HAY ($p < 0.05$; $\alpha = 0.05$)	

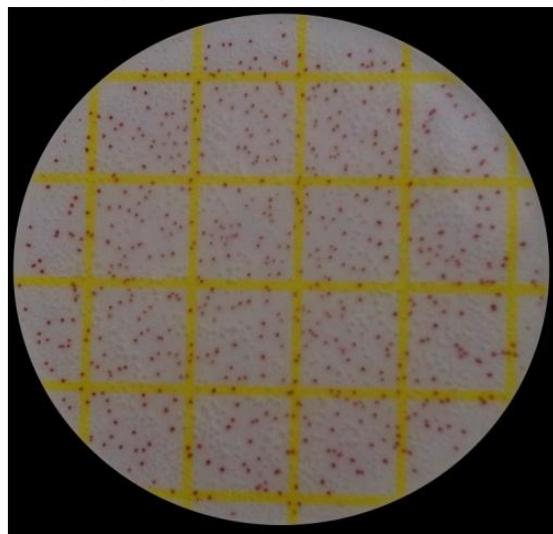
La tabla 7 muestra el resultado del análisis estadístico. Existe diferencia significativa con un nivel de confianza del 5%, los datos proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

En la Figura 16 se muestran las imágenes de los controles para el crecimiento de las bacterias, que se corrieron al mismo tiempo que la prueba; se puede ver el crecimiento típico de estas bacterias en las placas de Petrifilm AC™ para el recuento de mesófilos aerobios.

Figura 16. Crecimiento de las bacterias utilizadas en la mezcla para la prueba de sensibilidad



S. aureus en placas Petrifilm AC™

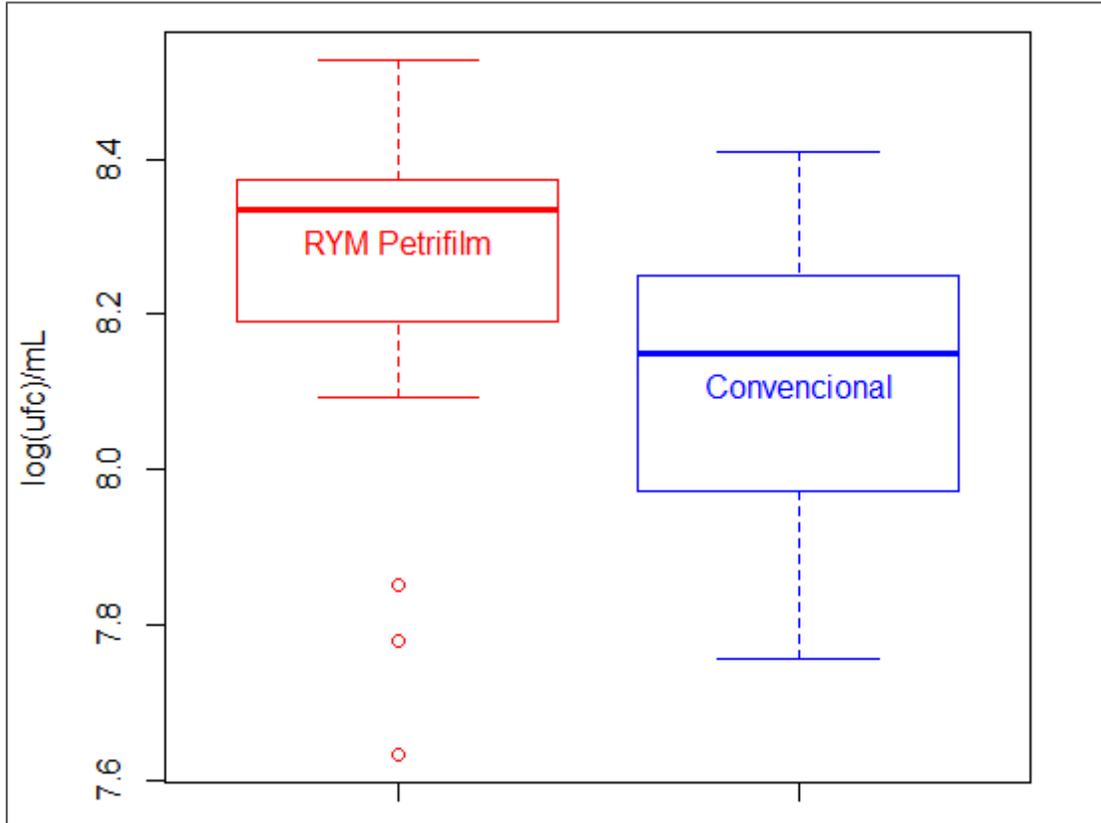


E. coli en placas Petrifilm AC™

Fotos: Sanabria, 2015.

En la Figura 17 se muestra el diagrama de cajas, donde se puede comprobar visualmente que la dispersión de los datos en ambos métodos es semejante, sin embargo las medias son diferentes, la media del método RYM Petrifilm es ligeramente mayor que la media del método convencional. La dispersión, en cambio es mayor en el método convencional.

Figura 17. Diagrama de cajas de la prueba de no interferencia.



ETAPA 2. Validación de las placas con las matrices alimentarias e inóculo

En virtud de los resultados anteriores, en esta etapa se trabajó con sólo dos cepas: *A. niger* y *S. cerevisiae*. Como matrices alimentarias se utilizaron tortilla de maíz y fécula de maíz; se inocularon ambas con inóculos conocidos de las cepas de prueba.

La tabla 8 muestra los datos de la prueba de *t-Student* en las matrices alimentarias inoculadas.

Tabla 8. Parámetros descriptivos en la prueba de *t-Student* en matrices alimentarias inoculadas

Parámetro	MATRIZ ALIMENTARIA: Tortilla de maíz				MATRIZ ALIMENTARIA: Fécula de maíz			
	<i>A. niger</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>A. niger</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	RYM Petrifilm	Conven- cional	RYM Petrifilm	Conven- cional	RYM Petrifilm	Conven- cional	RYM Petrifilm	Conven- cional
Media	6.916	6.724	7.577	7.526	6.853	6.671	7.549	7.409
Varianza	0.002	0.004	0.008	0.007	0.002	0.004	0.112	0.018
Observaciones	30	30	30	30	30	30	30	30
Desviación estándar	0.088		0.145		0.086		0.155	
Grados de libertad	29		29		29		29	
Estadístico t	11.894		1.939		11.588		4.926	
Valor p	1.12X10 ⁻¹²		0.062		2.106X10 ⁻¹²		3.119X10 ⁻⁵	
Valor crítico de t	2.045		2.045		2.045		2.045	
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	SI HAY (p<0.05; α=0.05)		NO HAY (p>0.05; α=0.05)		SI HAY (p<0.05; α=0.05)		SI HAY (p<0.05; α=0.05)	

En la tabla 8 se puede apreciar que, en la matriz tortilla, existe diferencia significativa entre los métodos, para la recuperación del mohos, con un nivel de confianza del 5%, los datos proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula. Pero no hay diferencia significativa entre ambos métodos para la recuperación de *S. cerevisiae*; con un nivel de confianza del 5%, los datos no proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

En la matriz fécula, en la recuperación del mohos, si hay diferencia significativa con un nivel de confianza del 5%, los datos proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula. Y lo mismo sucede en fécula, para la levadura: hay diferencia significativa con un nivel de confianza del 5%, los datos proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

A continuación, se muestran los Diagramas de cajas y bigotes para las pruebas de recuperación de moho y levadura en las matrices estudiadas.

Figura 18. Diagrama de caja y bigote para recuperación de *A. niger* y *S. cerevisiae* en matriz tortilla, inoculada.

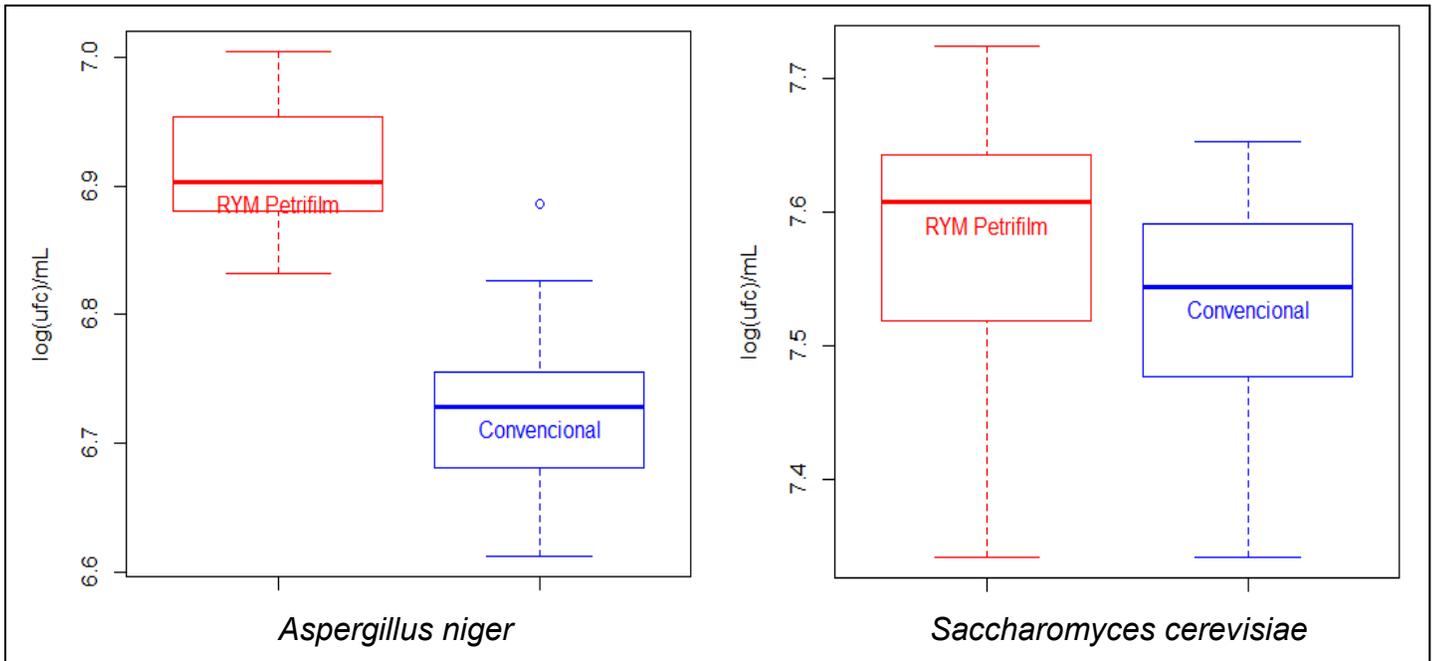
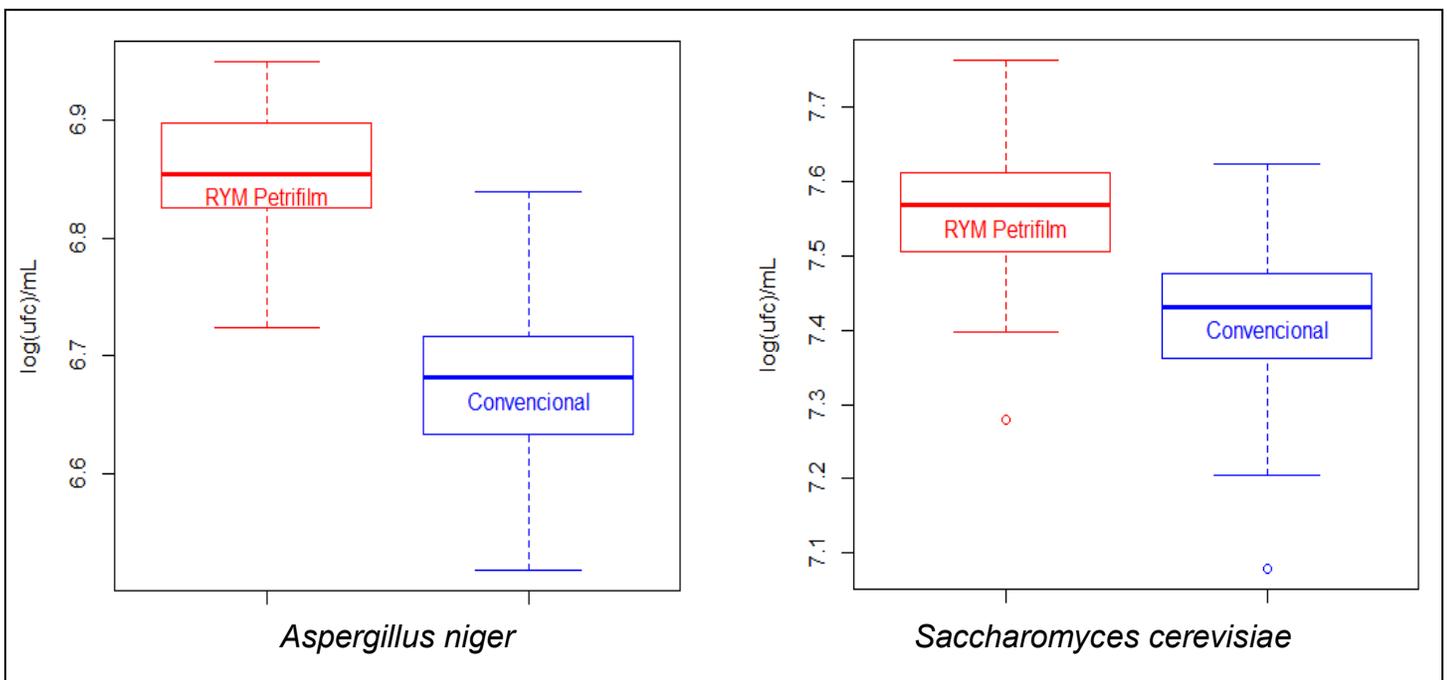


Figura 19. Diagrama de caja y bigote para recuperación de *A. niger* y *S. cerevisiae* en matriz fécula de maíz, inoculada.



El efecto visual de estos diagramas es muy claro. En la matriz tortilla (Figura 18), la recuperación del moho es mejor en Petrifilm RYM respecto a método convencional, con menor dispersión de datos; esto es muy útil para analizar tortilla, ya que el principal problema de deterioro microbiológico son los hongos, no las levaduras. La recuperación de levadura también es mayor por Petrifilm RYM, aunque tiene mayor dispersión de datos.

En la fécula (figura 19), los resultados en Petrifilm RYM muestran mejor recuperación y menor dispersión que el método convencional para los dos microorganismos de prueba.

La Figura 20 muestra las imágenes del análisis de la matriz tortilla, inoculada con los microorganismos de prueba, por ambos métodos.

Figura 20. Crecimiento de microorganismos de prueba por ambos métodos, en el análisis de la matriz tortilla, inoculada



Fotos: Sanabria, 2015

Como puede apreciarse en la foto de la extrema derecha, las partículas de tortilla se pueden distinguir mejor en las placas Petrifilm, por la coloración de las colonias, lo que facilita la diferenciación de éstas y fragmentos del alimento.

En el trabajo cotidiano y en el manejo de gran número de muestras, se aprecia mucho la facilidad que brinda el colorante, para la interpretación y para el recuento.

Prueba de sensibilidad del Método con matrices inoculadas

Esta prueba se realizó con las cepas de *A. niger* y *S. cerevisiae* juntas, en ambas matrices.

La tabla 9 muestra los resultados del análisis estadístico de este experimento.

Tabla 9. Parámetros descriptivos en la prueba de *t-Student* para la prueba de sensibilidad, con matrices alimentarias inoculadas

Las matrices fueron inoculadas con una mezcla de *A. niger* y *S. cerevisiae*

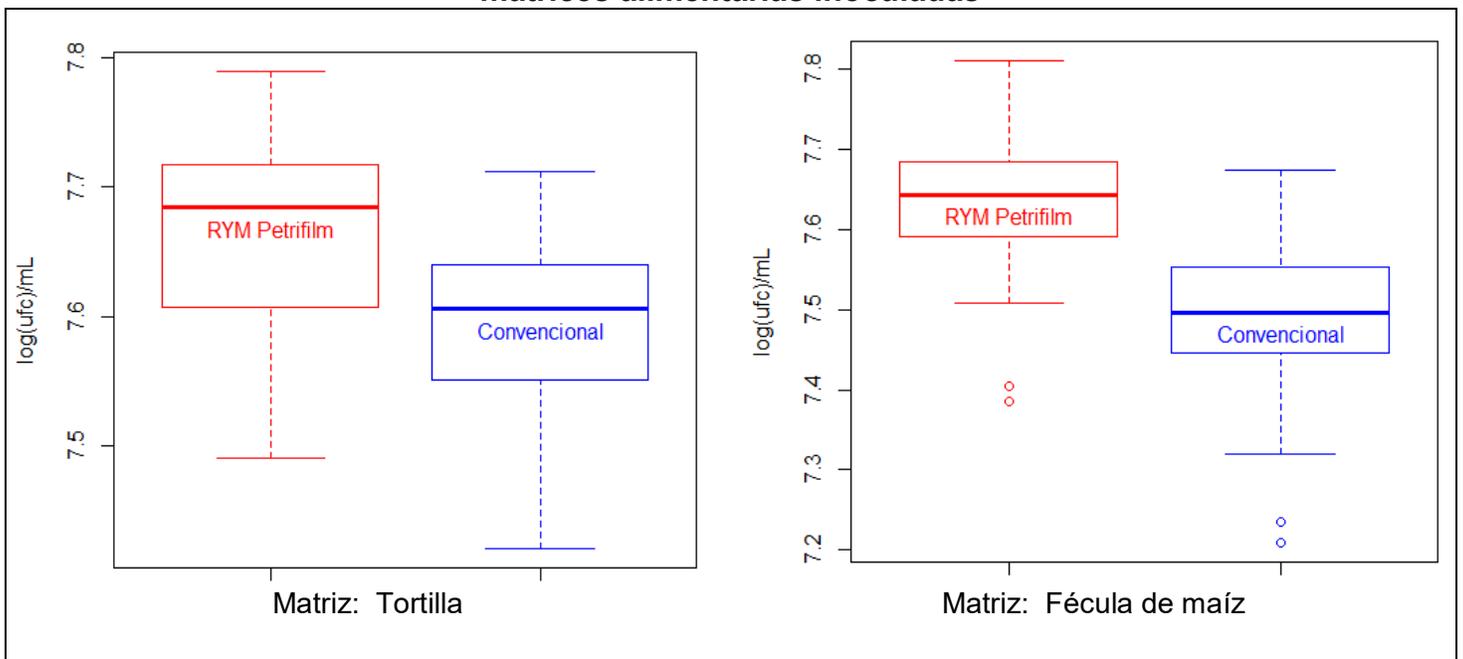
MATRIZ ALIMENTARIA	Tortilla de maíz		Fécula de maíz	
	RYM Petrifilm	Conven- cional	RYM Petrifilm	Conven- cional
Media	7.644	7.591	7.630	7.486
Varianza	0.006	0.005	0.008	0.012
Observaciones	30	30	30	30
Desviación estándar	0.122		0.131	
Grados de libertad	29		29	
Estadístico t	3.303		6.055	
Valor p	0.002		1.369X10 ⁻⁶	
Valor crítico de t	2.045		2.045	
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	SI HAY (p<0.05; α=0.05)		SI HAY (p<0.05; α=0.05)	

En la Tabla 9 se aprecia que para ambas matrices, si hay diferencia significativa entre los métodos, con un nivel de confianza del 5%, los datos proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Los datos que aparecen en la Tabla 9 corresponden al recuento de colonias de mohos y levaduras que crecieron a partir de esta mezcla, sin embargo se realizó el análisis estadístico con la finalidad de saber si existe diferencia significativa entre los métodos cuando existe una alta competencia entre microorganismos del mismo tipo (mohos y levaduras) cuando están presentes en las matrices bajo estudio.

A continuación se muestra el diagrama de caja con bigotes para la prueba de sensibilidad, en la figura 21.

Figura 21. Diagrama de cajas y bigotes para la prueba de sensibilidad en matrices alimentarias inoculadas



En la Figura 21 se aprecia que el método Petrifilm RYM tiene mejor recuperación, con menor dispersión de datos en ambas matrices. Esta prueba de sensibilidad demostró que las placas Petrifilm tienen mayor sensibilidad cuando se utiliza la mezcla del moho *A. niger* y la levadura *S. cerevisiae* en ambas matrices. Petrifilm tienen mayor sensibilidad cuando hay competencia de microbiana en las matrices, tanto tortilla como fécula de maíz.

Prueba de No-interferencia

Ésta se llevó a cabo en ambas matrices, inoculando con la mezcla de mohos y levadura (*A. niger* y *S. cerevisiae*) más la mezcla de bacterias, una Gram positiva y una Gram negativa (*S. aureus* y *E. coli*).

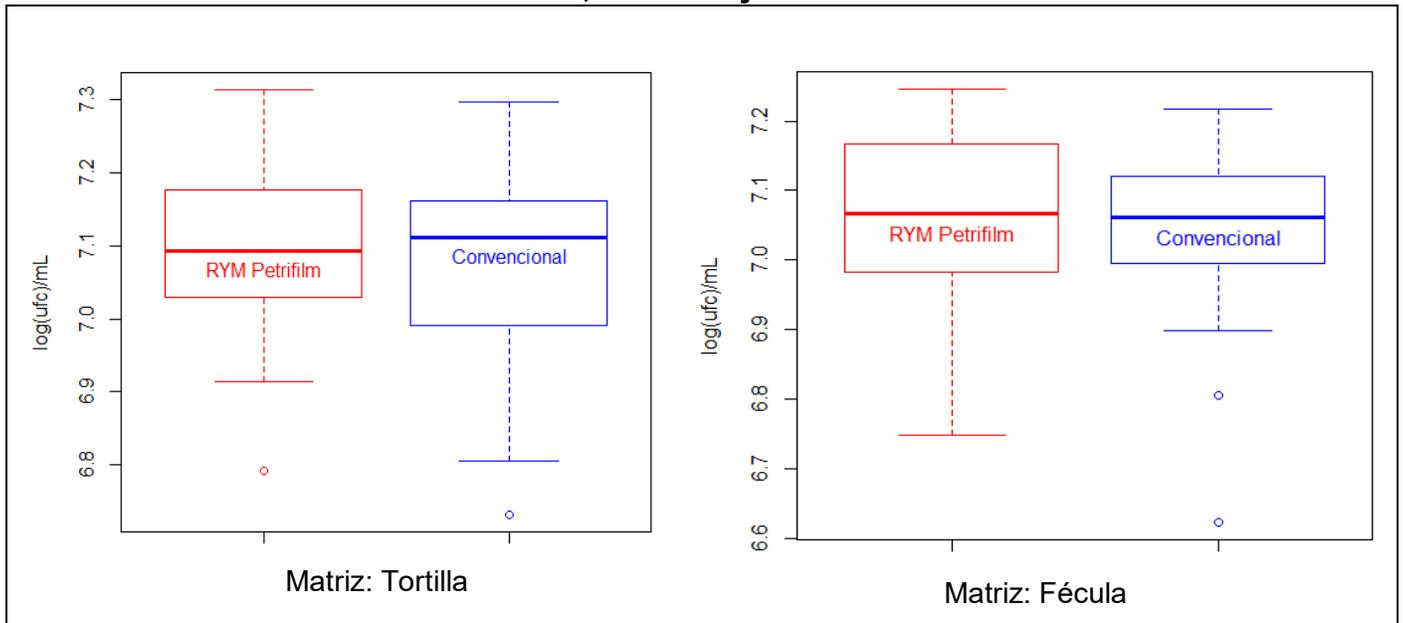
Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros descriptivos en la prueba de <i>t-Student</i> para la prueba de no-interferencia en matrices alimentarias inoculadas con mohos, levadura y mezcla de bacterias				
Parámetro	Matriz: tortilla		Matriz: Fécula de maíz	
Media	7.102	7.077	7.064	7.045
Varianza	0.015	0.020	0.014	0.015
Observaciones	30	30	30	30
Desviación estándar	0.183		0.186	
Grados de libertad	29		29	
Estadístico t	0.747		0.564	
Valor p	0.461		0.577	
Valor crítico de t	2.045		2.045	
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	NO HAY (p>0.05; α=0.05)		NO HAY (p>0.05; α=0.05)	

En la prueba de no-interferencia, no hay diferencia significativa entre métodos, para ninguna de las matrices; con un nivel de confianza del 5%, los datos no proporcionan evidencia suficiente para rechazar las hipótesis nulas.

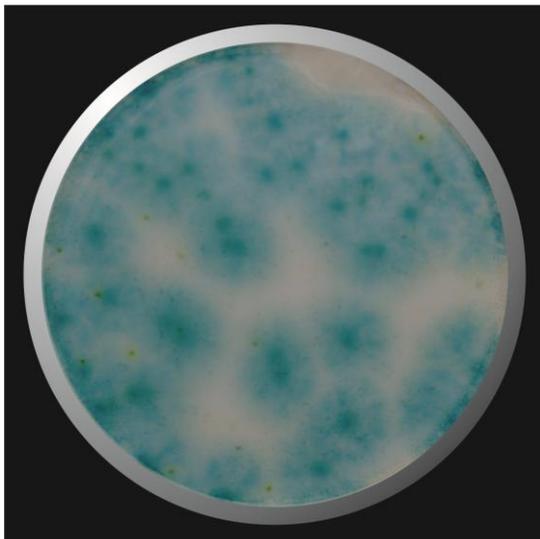
En el diagrama de caja con bigotes de la Figura 22, se puede ver que las medias de cada método están muy cercanas, que la dispersión de datos es mayor para el método convencional y la recuperación de microorganismos es igual de eficiente en ambos métodos. En fécula se puede comprobar visualmente que la dispersión de los datos es mayor para el método Petrifilm, aunque las medias son muy parecidas. La recuperación de microorganismos es semejante para ambos métodos con ambas matrices.

Figura 22. Diagrama de cajas y bigotes para la prueba de no-interferencia, en matrices inoculadas con moho, levadura y bacterias

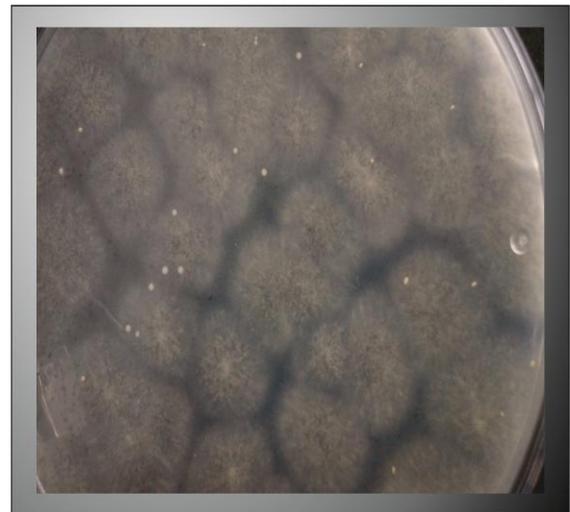


Las Figuras 23 y 24 muestran las placas de esta prueba; se puede apreciar que no hay crecimiento bacteriano.

Figura 23. Crecimiento de mohos y levaduras en pruebas de no-interferencia en matriz tortilla



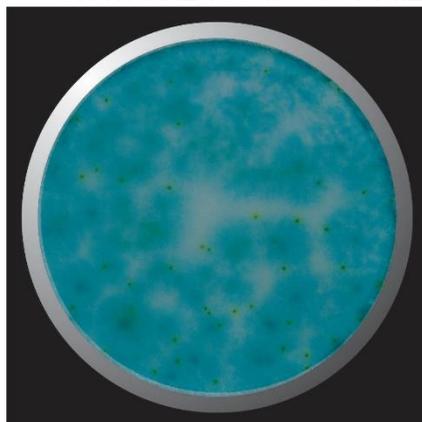
Petrifilm RYM



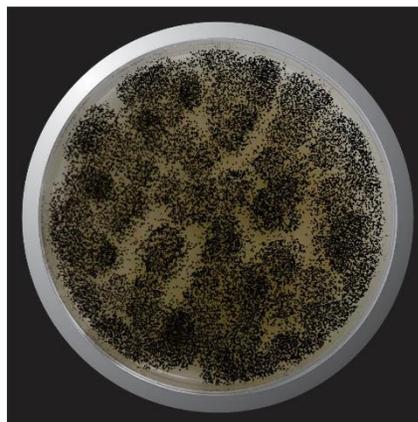
Reverso placa convencional

Fotos: Sanabria, 2015.

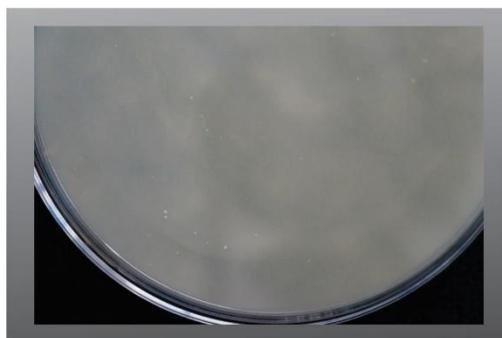
Figura 24. Crecimiento de mohos y levaduras en pruebas de no-interferencia en matriz fécula de maíz



Petrifilm RYM



Placa convencional



Reverso de la placa convencional

Fotos: Sanabria, 2015.

A continuación se presenta la tabla 11 que muestra los resultados de manera condensada, para todas las pruebas de *t-Student* realizadas en el presente trabajo; también se incluyeron las razones por las cuales hay diferencias significativas, cuando es el caso, para que sea posible considerar si el método es elegible en casos específicos.

Tabla 11. Validación de las placas Petrifilm vs. placas convencionales. Resultados de diferencia significativa mediante prueba *t-Student* pareada.

Prueba	Inóculos puros	Sin matriz alimentaria	Con matriz tortilla	Con matriz fécula de maíz
Recuento	<i>A. niger</i>	NO	SI	SI
	<i>P. chrysogenum</i>	SI	N.A.	N.A.
	<i>S. cerevisiae</i>	SI	NO	SI
Sensibilidad		NO	SI	SI
No interferencia		SI	NO	NO

N. A. No aplica

Finalmente, la diferencia significativa implica que los resultados no son equivalentes. En la tabla 12 se ha agregado el desempeño de Petrifilm RYM respecto al método convencional, en cuanto a:

- recuperación de los microorganismos inoculados y
- dispersión de datos

Cabe recordar que es muy notable la forma en que Petrifilm RYM facilita la lectura de placas en comparación con el método tradicional, al diferenciar las colonias de los fragmentos de alimentos y, desde luego, el tiempo de obtención de resultados: 48 h contra 120 del método tradicional.

Tabla 12. Validación de las placas Petrifilm vs. placas convencionales. Diferencia significativa y Resultados de desempeño de Petrifilm RYM.

Prueba	Inóculos puros	Sin matriz alimentaria	Con matriz tortilla	Con matriz fécula de maíz
Recuento	<i>A. niger</i>	NO	SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación Menor dispersión de datos	SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación Menor dispersión de datos
	<i>P. chrysogenum</i>	SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación Menor dispersión de datos	N.A.	N.A.
	<i>S. cerevisiae</i>	SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación	NO	SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación
Sensibilidad		NO	SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación	SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación Menor dispersión de datos
No interferencia		SI Desempeño Petrifilm RYM: Mejor recuperación Menor dispersión de datos	NO	NO

N. A. No aplica

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la validación del método Petrifilm RYM™ frente al método convencional en placas de APD.

Las pruebas de recuento, sensibilidad y no interferencia en donde no se encontró diferencia significativa indican que las placas RYM Petrifilm pueden ser utilizadas con la misma eficiencia que las placas convencionales al hacer el recuento de mohos y levaduras en las matrices alimentarias de tortilla o de fécula de maíz.

Las pruebas de recuento, sensibilidad y no interferencia en donde hay una diferencia significativa muestran que las placas RYM Petrifilm tienen un desempeño superior al de las placas convencionales. Por lo que su utilización en la numeración y detección de mohos y levaduras es más eficiente específicamente cuando la matriz alimentaria es tortilla o fécula de maíz.

La presente validación de las placas RYM en estas matrices alimentarias permite aprovechar las ventajas que se obtiene al utilizar este método alternativo, donde el tiempo de análisis, el consumo de energía, la preparación de medios de cultivo, el espacio y tiempo de incubación son menores; a nivel industrial este método proporciona excelente estandarización, gran confiabilidad en los resultados y notable comodidad para su utilización en los laboratorios de análisis de alimentos.

La sensibilidad de las placas RYM Petrifilm es igual que la sensibilidad del método convencional cuando se utilizan cultivos puros, ya que no muestra diferencias significativas. En las matrices alimentarias estudiadas, si hay diferencia significativa, pero Petrifilm RYM™ tiene mayor recuperación.

En las pruebas de no interferencia no hubo diferencia significativa entre métodos, en ninguna de las dos matrices. Es decir que el alto contenido de microorganismos inoculados en las muestras, ya sea del mismo tipo o para microorganismos de otro grupo, como el caso de las bacterias, no afecta la detección de los microorganismos *target* por el método alternativo; fue igual de eficiente que el método convencional.

Dentro de las ventajas de Petrifilm RYM™, la más destacada para la presente analista, fue que las partículas de la matriz alimentaria no interfieren con la detección de las colonias, ya que se distinguen y discriminan más fácilmente, especialmente en matrices con pequeño tamaño de partícula, como harina o fécula. Otras ventajas importantes son: la facilidad de inocular, el mínimo espacio necesario en incubadora, el tiempo para la obtención de resultados y la facilidad para disposición final.

La presente validación de las placas RYM Petrifilm en matrices alimentarias específicas de tortilla de maíz y fécula de maíz sirve como referencia para llevar a cabo futuras validaciones de métodos alternativos relacionados a los alimentos de acuerdo a la “NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas”, que entró en vigor el pasado 23 de diciembre de 2015 y que probablemente, en un futuro cercano se ampliará para la detección de otros microorganismos presentes en alimentos.

Las placas RYM Petrifilm ya han sido validadas previamente por AOAC; este trabajo permite ampliar el rango de matrices alimentarias en las que es aplicable, y se verifica que en todas funcionan correctamente.

Los métodos alternativos constituyen un recurso de mucha utilidad para la detección de microorganismos de interés en muestras de diferentes orígenes. Las validaciones de estos constituyen, sin duda, un proceso complejo y minucioso, donde debe existir, sobre todo, una buena organización del estudio. Sus resultados pueden contribuir a la utilización de nuevos métodos más rápidos y seguros en una amplia variedad de aplicaciones con un impacto importante.

El tema de validación de métodos alternativos sigue en constante desarrollo, y hasta la actualidad se han validado gran cantidad de métodos que hoy se comercializan mundialmente y que favorecen a la industria alimentaria y, sobre todo, al consumidor.

Bibliografía

- Alanís Villalón, R. 2014. *¿Qué es la NOM del tu producto? Para qué sirve y cómo identificarla.* Blog de UNITEC. México. Disponible a través de Internet en: <http://blogs.unitec.mx/vida-universitaria/emprendedores/que-es-para-que-sirve-y-cual-es-la-nom-de-tu-producto>
- Andino, F., Castillo, Y., 2010. **Curso de microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria.** Ed. UNI: Nicaragua (Estelí). pp. 35-37 y 44-45.
- AOAC, 2012. *Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces.* Approved by AOAC Official Methods Board. Disponible a través de Internet en: www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/AOAC_Validation_Guidelines_for_Food_Microbiology-Prepub_version.pdf
- Arroyo G., G. 2015. **Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Presentación en el Foro Internacional de Alimentos Sanos.** Cofepris, Secretaría de Salud. Aguascalientes, Ags. México.
- Bibek, R., Arun, B. 2010. **Fundamentos de microbiología de los alimentos.** 4ª edición. Mc Graw Hill: México. pp. 9, 10, 74, 152, 199, 200, 311, 312.
- Brunelle, Sh. 2008. *Validation of Microbiological Methods for Food.* In Anon (2003) *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*, ISO16140:2003. Chapter 13, 2nd edition. Academic Press, U.K. [En línea]. [doi: 10.1016/B978-0-444-53039-4.00013-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53039-4.00013-3)
- Camacho, A., et al. 2009. **Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos.** 2ª edición. Ed. Facultad de Química, UNAM: México. pp. 60, 63.
- FDA, 2015. *FDA Globalization. International Programs. Food and Drug Administration, USDA.* Disponible a través de Internet en: <http://www.fda.gov/InternationalPrograms/FDABeyondOurBordersForeignOffices/default.htm>
- FDA, 2016. *Microbiological Detection Methods. About the Bacteriological Analytical Manual. Laboratory Methods.* Food and Drug Administration, USDA. Disponible a través de Internet en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm07>

Fragoso-Sánchez, H. 2013. *Aplicación en sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción de alimentos agropecuarios en México*. SENASICA. [En línea] (Actualizado el 2 octubre de 2013). Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?idDocumento>

García, U., P., (2012). ***La alimentación de los mexicanos. Cambios sociales y económicos, y su impacto en los hábitos alimenticios***. Cámara Nacional de la Industria de la Transformación: México, D. F. p. 17.

Greco, M., V., Franchi, M., L., Rico, G., S., L., Pardo, A., G., Pose, G., N., (2014), Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. ***The Scientific World Journal*, 2014**, 1-10.

Hayes, J.C., J.G. Laffey, B. McNeil & N. J. Rowan. 2012. Relationship between growth of food-spoilage yeast in high-sugar environments and sensitivity to high-intensity pulsed UV light irradiation. ***International Journal of Food Science and Technology*, 47**: 1925–1934

Hashmi, F. M. H., y Ghaffar, A. (2006). Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. ***Pakistan Journal of Botany*, 38 (1)**, 185-192.

International Agency for Research on Cancer (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food. ***IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 56-15**, 398-492.

Jay, J. 2000. ***Modern Food Microbiology***. 6^a ed. Aspen Publishers, Inc. EE.UU. (Gaithersburg). p.185.

Lombard, B. y Leclercq, A. 2011. Validation of Innovative Food Microbiological Methods According to the EN ISO 16140. ***Standard Food Anal. Methods* 4**:163–172.

Manning, B., B., Abbas, H., K., (2012). The effect of Fusarium mycotoxins deoxynivalenol, fumonisins, and moniliformin from contaminated mouldy grains on aquaculture fish. ***Toxin Reviews*, 31**, 11-15.

- Montville, T., Matthews, K. 2009. **Microbiología de los alimentos. Introducción**. 2ª edición. Acribia, S.A. España (Zaragoza). pp. 3, 5-8, 85, 86, 283-288.
- Noots, I., J.A Delcour & C.W. Michiels. 1999. From Field Barley to Malt: *Detection and Specification of Microbial Activity*. *Critical Reviews in Microbiology*. 25, 2: 121-153. Disponible a través de RedUNAM en: <http://eds.b.ebscohost.com.pbidi.unam.mx:8080/eds/detail/detail?sid=20d1ba5f-97aa-4e14-8097-18372b7ca49c@sessionmgr102&vid=1&hid=103&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ==#AN=78542855&db=edb>
- Oliveira. P. M., Mauch, A., Jacob, F., Waters, D. M., y Arendt, E. K. (2012). Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. ***International Journal of Food Microbiology***, 156, 32-43.
- Piacentini, K. C., Savi, G. D., Pereira, M., E., V., Scussel, V., M. (2015-b). Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). ***Food Chemistry***, 187, 204-209.
- Piacentini, K., C., Savi G., D., Olivo, Scussel V., M., (2015-a). Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. ***Food Control***, 50, 925-929.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., T., Agosti, B., y Donaldini, G. (2010). Transfer of aflatoxin B1 and Fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. ***Food Additives & Contaminants A.***, 27(10), 1431-1439.
- Pietsch, C., Bucheli, T. D.; Wettstein, F., E.; Burkhardt-Holm. 2011. Frequent biphasic cellular responses of permanent fish cell cultures to deoxynivalenol (DON). ***Toxicology & applied Pharmacology***, 256, 24-34.
- SAGARPA. 2012. *Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en México*. Colpos. [En línea]. Disponible en: http://www.colpos.mx/wb_pdf/Panorama_Seguridad_Alimentaria.pdf
- Schenzel, J., Forrer, H., Vogelgsang, S., Hungerbühler, K. and Bucheli, T. 2012. Mycotoxins in the environment: I. Production and emission from an agricultural test field. ***Environmental Science & Technology***. 46, 24:13067-13076.

- Smith, A. 2005. *History of the Agar Plate*. Laboratory News. Features. [En línea]. Disponible a través de Internet en: <http://www.labnews.co.uk/features/history-of-the-agar-plate-01-11-2005/>
- Soriano, J. 2007. ***Micotoxinas en alimentos***. Ed. Díaz de Santos: España. pp. 16, 31, 32, 65-67.
- Tanús, A. 2014. Métodos rápidos en microbiología de alimentos. ***CarneTec***. **21**, 1:26-30.
- Walpole, R., Myers, R., Myers, S., Ye, K. 2012. ***Probabilidad y estadística***. 9^a edición. Ed. Pearson Educación de México: México. P. 319-321, 354, 355.
- Wonzy, M., Krazimierz, O., Jakimiuk, E., Gusiatin, M., Brzuzan, P., (2013) Zearalenone contamination in rainbow trout farms in north-eastern Poland, ***Aquaculture***, **2013**, 416-417, 209-211.
- 3M México. 2015. *Placa Rápida para recuento de mohos y levaduras*. 3M Multimedia [En línea]. Disponible en: <http://multimedia.3m.com/mws/media/899862O/3m-petrifilm-rapid-yeast-and-mold-count-plate.pdf>
- 3M México. 2011. *Noti Food. Indicadores rápidos*. 3M Solutions. Food Safety [En línea] (Actualizado marzo de 2011). Disponible en: http://solutions.3m.com.ar/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1343020034000&locale=es_AR&assetType=MMM_Image&assetId=1319234101632&blobAttribute=ImageFile
- 3M Petrifilm. S.f. Guías de interpretación. Productividad maximizada de los técnicos. 3M Solutions. Food Safety. [En línea]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf