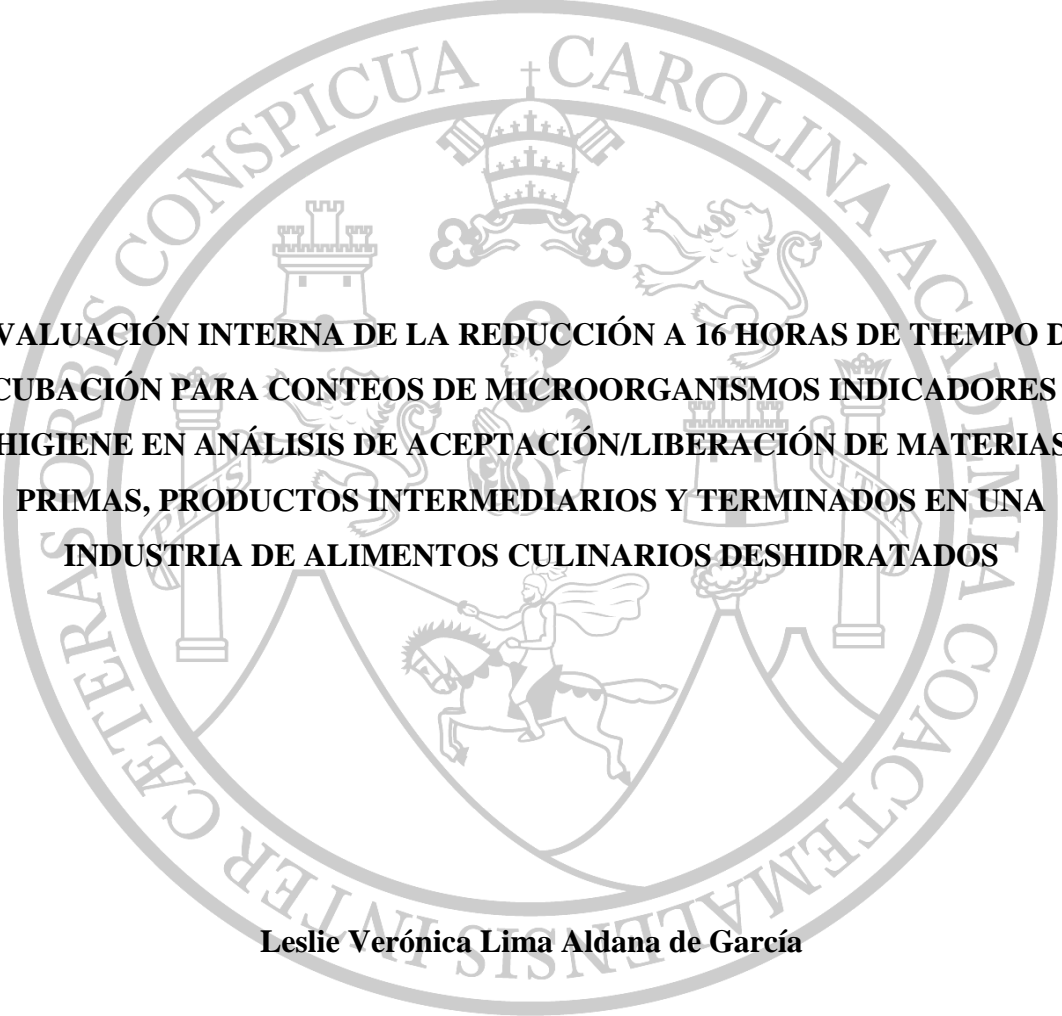


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a figure on horseback, a castle, and a lion. The shield is surrounded by a circular border containing the Latin motto "SICUT ERAT IN TERRA COACTEMALENSIS INTER CETERAS CONSPICUA CAROLINA ACQUINATA".

**EVALUACIÓN INTERNA DE LA REDUCCIÓN A 16 HORAS DE TIEMPO DE  
INCUBACIÓN PARA CONTEOS DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE  
HIGIENE EN ANÁLISIS DE ACEPTACIÓN/LIBERACIÓN DE MATERIAS  
PRIMAS, PRODUCTOS INTERMEDIARIOS Y TERMINADOS EN UNA  
INDUSTRIA DE ALIMENTOS CULINARIOS DESHIDRATADOS**

**Leslie Verónica Lima Aldana de García**

**Química Biológica**

**Guatemala, mayo de 2021.**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**EVALUACIÓN INTERNA DE LA REDUCCIÓN A 16 HORAS DE TIEMPO DE  
INCUBACIÓN PARA CONTEOS DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE  
HIGIENE EN ANÁLISIS DE ACEPTACIÓN/LIBERACIÓN DE MATERIAS  
PRIMAS, PRODUCTOS INTERMEDIARIOS Y TERMINADOS EN UNA  
INDUSTRIA DE ALIMENTOS CULINARIOS DESHIDRATADOS**

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**Leslie Verónica Lima Aldana de García**

**Para optar al título de**

**Química Bióloga**

**Guatemala, mayo de 2021**

## **JUNTA DIRECTIVA**

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovanni Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merari Caceros Castañeda	Vocal V
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria

## ACTO QUE DEDICO

**Dios**, quien me ha dado la vida y me ha acompañado en cada etapa de mi vida.

**Mis padres**, mi ejemplo y motivación para ser la persona que soy.

**Mi esposo**, mi amor y mi amigo en las buenas y en las malas.

**Mis hijos**, frutos de mi amor e inspiración para ser cada día mejor persona.

**Mis hermanos, cuñados, sobrinos, tíos, primos y abuelitas**, quienes han sido parte de mi historia, me han regalado su amor y ahora disfrutan este momento conmigo.

**Mis amigos**, seres especiales que Dios me ha enviado.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Universidad de San Carlos y Escuela de Química Biológica**, por todos los conocimientos recibidos, las experiencias vividas, por el cariño y apoyo de su personal, especialmente de Eugenia Garzaro.

**Centro de Aseguramiento de la Calidad Nestlé**, por permitirme realizar mi trabajo de tesis, por ser mi segunda universidad y el lugar en el que me he realizado profesionalmente por más de una década.

**Lic. Ivo Santizo**, mi asesor y amigo, quien ha creído en mi capacidad profesional.

**Licda. María del Carmen Bran y Dra. Karin Herrera**, mis revisoras, por su soporte y por ser mujeres profesionales ejemplares.

**Licda. Cinthia Alvizurez**, amiga y motivadora para finalizar esta etapa de mi vida.

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	1
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>III.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
	A. Generalidades de microorganismos en alimentos	3
	1. Microorganismos indicadores de higiene	3
	2. Microorganismos patógenos	4
	3. Métodos de laboratorio	4
	B. Microorganismos indicadores de higiene en alimentos culinarios deshidratados	4
	1. Microorganismos aerobios	4
	2. <i>Enterobacteriaceae</i> en alimentos	6
	C. Métodos para análisis microbiológicos de los alimentos	7
	1. Microbiología convencional o tradicional	7
	a. Métodos basados en desarrollo de UFC	7
	b. Métodos de dilución en tubo	8
	2. Métodos alternativos	8
	a. Automatización de métodos convencionales	8
	b. Métodos rápidos	9
	D. Principales factores que afectan el crecimiento y recuperación de los microorganismos en alimentos	9
	1. Temperatura de incubación	9
	2. Actividad de agua	10
	3. pH	11
	E. Ciclo de crecimiento de los microorganismos	
	1. Fase Lag o de adaptación	12
	2. Fase exponencial o logarítmica	12
	3. Fase estacionaria	12
	4. Fase de declinación o muerte	13
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	15
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	16
<b>VI.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	17
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18

A. Universo y muestra	18
B. Recursos	18
C. Materiales	18
D. Métodos	20
1. Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos	21
2. Procedimiento de análisis de <i>Enterobacteriaceae</i> (EB)	24
3. Uso de controles positivos certificados y verificación de desempeño de medios de cultivo	26
E. Análisis de datos	27
<b>VIII. RESULTADOS</b>	28
<b>IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	31
<b>X. CONCLUSIONES</b>	32
<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	33
<b>XII. REFERENCIAS</b>	34
<b>XIII. ANEXOS</b>	38

## I. RESUMEN

En este estudio se evaluó la reducción de tiempo de incubación (a 16 horas), en análisis microbiológicos de indicadores de higiene, en materias primas, productos intermediarios y productos terminados relacionados con la fabricación de culinarios deshidratados.

Se analizaron 1,853 muestras con las metodologías estandarizadas ISO 4833-1:2013 para Microorganismos aerobios mesófilos (48 horas de incubación) e ISO 21528-2:2017 para *Enterobacteriaceae* (24 horas de incubación).

La evaluación consistió en la comparación de los resultados logarítmicos obtenidos de dos recuentos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g) por cada metodología, realizándose la primera lectura a las 16 horas de incubación y la segunda al concluir las horas de incubación indicada en cada metodología estandarizada.

Las poblaciones de *Enterobacteriaceae* a las 24 y 16 horas de incubación a 37°C brindan resultados iguales en términos logarítmicos (diferencia menor a 0.00 LOG).

Las poblaciones de microorganismos aeróbios mesófilos a las 48 y 16 horas de incubación a 37°C brindan resultados equivalentes en términos logarítmicos, presentando una diferencia menor a 0.48 LOG.

Por lo anterior, se evaluó la reducción de tiempo de incubación para ambos parámetros, ya que el criterio de equivalencia microbiológico indica que dos resultados microbiológicos se consideran equivalentes al estar dentro del mismo logaritmo o tener una diferencia máxima de una unidad logarítmica (Blake, 2009).

Esta técnica de reducción de tiempo de incubación puede considerarse como una ayuda para establecer un panorama de calidad microbiológica de manera temprana y para la toma de decisiones a nivel de producción en productos culinarios deshidratados.



## II. INTRODUCCIÓN

La necesidad de obtener productos de calidad es un reto que día a día se impone en las industrias de alimentos; estas industrias buscan estandarizar la calidad de sus productos, para lo cual es fundamental el control microbiológico sobre la materia prima, productos intermediarios y productos terminados (Pascual, 1989).

Los controles microbiológicos que se realizan, son inspecciones que permiten en forma certera valorar microbiológicamente la calidad del producto o insumo que se desea producir o utilizar para la cadena de producción. La rapidez con la que se realicen estas determinaciones influye en la productividad y tiempo de disponibilidad del producto terminado en el mercado, por lo cual, resultados en un período de tiempo más corto, ayudan a establecer un panorama de calidad microbiológica de manera temprana, influyendo directamente en la toma de decisiones sobre las posibles brechas en la higiene de algunas de las fases de la cadena productiva, antes que el producto sea embalado y liberado al mercado (Harrigan & McCance, 1979).

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue la evaluación interna de reducción de tiempo de incubación en el análisis de microorganismos aerobios mesófilos y *Enterobacteriaceae* para componentes de la cadena de producción de alimentos deshidratados, tales como, materias primas, productos intermediarios y producto terminado, utilizando como referencia las metodologías de la organización internacional de estandarización (ISO, por sus siglas en inglés) ISO-4833-1:2013 e ISO-21528-2:2017 (International Organization for Standardization [ISO] 4833, 2013; ISO 21528, 2017).

Para dicha evaluación se realizó una comparación logarítmica entre el conteo de microorganismos aerobios mesófilos y *Enterobacteriaceae* y se utilizaron lentículas de microorganismos certificados en presentación cuantitativa de marca comercial BioMérieux (BioBalls Single-shot, media de 30 UFC por BioBall)), como controles positivos, tales como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, y tres serotipos de *Salmonella spp.*, que son microorganismos de importancia para la matriz de alimentos culinarios deshidratados requeridos por el Reglamento Técnico Centroamericano, normas de países a donde se comercializan los productos terminados y las normas internas de calidad de la industria de alimentos culinarios deshidratados (Anexo 1).

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades de microorganismos en alimentos

Cuando se evalúa el riesgo microbiológico asociado a un alimento específico todos los microorganismos transmisibles a través de los alimentos deben ser considerados. La principal fuente de alimentos que consumimos es de origen vegetal y animal y se encuentran naturalmente asociados a microorganismos (Brackhousen, 1999).

Los microorganismos elegidos para la elaboración de criterios microbiológicos deben ser relevantes para el alimento y circunstancias particulares, tales como producto crudo o listo para consumir (Madigan, Martinko, Parker & Brock, 1997).

Es importante considerar que la tolerancia para un determinado microorganismo en un alimento depende de su tratamiento previo, es decir, para un alimento cocido o listo para consumir la tolerancia para un determinado microorganismo es cero, mientras que sí se trata de un alimento crudo se puede permitir la presencia del mismo microorganismo (dentro de ciertos niveles) si éste fuera sometido a un tratamiento previo a su consumo (International Commission on Microbiological Specification for Foods [ICMSF], 1983).

Dentro de los microorganismos que componen un criterio microbiológico se pueden distinguir dos tipos:

#### 1. Microorganismos indicadores de higiene

Para la evaluación de la inocuidad microbiológica de los alimentos, la utilización de organismos indicadores es muy frecuente, el análisis microbiológico de alimentos para la búsqueda de estos microorganismos suele utilizar técnicas que permiten evaluar la calidad de la materia prima, problemas de almacenamiento, exceso de temperatura, vida útil (Recuento de microorganismos aerobios mesófilos), potencial contaminación fecal o posible presencia de patógenos (*Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Coliformes fecales), contaminación por manipulación humana (*Staphylococcus coagulasa positiva*), contaminación post tratamiento térmico (*Enterobacteriaceae*, coliformes, *Staphylococcus coagulasa positiva*, estreptococos fecales) o productos metabólicos de patógenos que indican un peligro para la salud (termonucleasa). Los microorganismos mencionados

anteriormente se utilizan para revelar las condiciones a las que ha sido expuesto el producto que pudieran implicar un posible peligro (Brackhousen, 1999).

## **2. Microorganismos patógenos**

Son aquellos microorganismos que pueden encontrarse en los alimentos, convirtiéndolos en potencial vehículo de enfermedad para quien los consuma, por ejemplo, *Salmonella* spp. (Brackhousen, 1999).

## **3. Métodos de laboratorio**

Los métodos de laboratorio utilizados para la detección o recuento de microorganismos forman parte del criterio microbiológico. La elección del método a utilizar debe favorecer a aquellos métodos estandarizados y de alta sensibilidad que hayan sido validados por organismos internacionales/nacionales de referencia. En los últimos años ha habido avances significativos en el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección y la separación de microorganismos de los alimentos. El desarrollo de técnicas moleculares (PCR) e inmunológicas (ELISA) brinda ventajas sobre los métodos tradicionales, específicamente en lo que refiere a velocidad, pero su uso todavía no se ha generalizado (Richardson, 2004; Pisabarro, 2007).

## **B. Microorganismos indicadores de higiene en alimentos culinarios deshidratados**

### **1. Microorganismos aerobios mesófilos**

En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse entre el rango de temperaturas de microorganismo mesófilos en las condiciones establecidas. En este recuento se estima la carga microbiana del alimento sin especificar tipos de microorganismos (Young, 2001).

Los términos conteo de aerobios mesófilos (AMC, Aerobic Mesophilic Count), conteo aerobio en placa (APC, Aerobic Plate Count), conteo estándar en placa (SPC, Standard Plate Count), o conteo total viable (TVC, Total Viable Count) son términos equivalentes utilizados para expresar conteos de microorganismos aerobios mesófilos (ISO 4833, 2013).

Un recuento bajo de microorganismos aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de microorganismos patógenos (Speck, 2002).

Un recuento elevado, dependiendo del origen de la muestra puede significar: deficiente manipulación durante el proceso/ recolección, la posibilidad de que existan patógenos o la posibilidad de alteración de cualidades organolépticas de la materia prima o producto terminado (Pascual, 1989).

Se conocen 5 metodologías para investigar el número total de microorganismos (Speck, 2002):

- a. Recuento en placa (TPC) para la determinación del número de células viables.
- b. Método del número más probable (MPN) de microorganismos como cálculo estadístico del número de células viables.
- c. Técnicas de reducción de colorantes para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora.
- d. Recuento microscópico directo (DMC) tanto para células viables como para las no viables. ej. Citometría de flujo

Los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de muestra e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas. En estos recuentos son susceptibles de conteo aquellos microorganismos capaces de crecer en las condiciones establecidas. Se puede conseguir una amplia gama de condiciones variando la temperatura, la atmósfera, la composición del medio y el tiempo de incubación (Richardson, 2004).

El control de las condiciones higiénicas se puede realizar mediante un recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, el cual se expresa como el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo o por mililitro (UFC/g o UFC/ml) (ISO 4833, 2013).

El análisis de microorganismos aerobios mesófilos no representa un riesgo a la salud si se realiza con buenas prácticas de laboratorio (Speck, 2002).

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos refleja la calidad microbiológica general de la muestra analizada. Dentro de la industria es utilizado como indicador de higiene en materias primas, materiales procesados y no procesados, monitoreo de la eficiencia de procesos térmicos en

líneas producción; asimismo provee un panorama general de la carga microbiana que el alimento procesado posee al final de la fabricación (Colwell & Morisetti, 1969).

## 2. *Enterobacteriaceae* en alimentos

*Enterobacteriaceae* son microorganismos que generalmente se utilizan como indicadores de contaminación ambiental o fecal. En los alimentos calentados, congelados o deshidratados pueden encontrarse células de la familia *Enterobacteriaceae* patógenas como son las del género *Salmonella* sp. (Pascual, 1989).

En materia prima, productos intermediarios y productos terminados, los recuentos de *Enterobacteriaceae* superiores a 10 UFC/g pueden indicar un deficiente proceso tecnológico o la presencia de una contaminación posterior al mismo (Pascual, 1989).

La determinación de *Enterobacteriaceae* de forma general como microorganismos indicadores de contaminación ambiental y fecal presenta la ventaja, frente a la determinación de *E. coli* u otros coliformes, en que esta familia presenta una gama más amplia de microorganismos, entre los cuales, el grupo de coliformes, así como *E. coli* se encuentran incluidos, convirtiéndose en un parámetro más exigente al momento de evaluar prácticas higiénicas (Pisabarro, 2007).

También esta familia *Enterobacteriaceae* incluye especies como *Erwinia* y *Serratia* que están asociados con vegetales y no indican una contaminación fecal. El grupo de coliformes incluyen todos los bacilos que se observan color rosado en la coloración de Gram (gramnegativos), aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de gas en 24 – 48 horas a 37°C (Doyle, 1996).

Los géneros que incluyen este grupo son: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Siendo *Escherichia* y *Klebsiella* estrictamente de origen fecal, ya que su hábitat natural es el tracto entérico del hombre y animales (Food and Drug Administration [FDA], 1995).

*Enterobacteriaceae* son definidos como microorganismos que fermentan glucosa y muestran reacción negativa a la oxidasa después de ser aislados con la metodología según ISO 21528 (ISO 21528, 2017).

El empleo de las *Enterobacteriaceae* (coliformes y no coliformes) como microorganismos indicadores, monitorea las Buenas Prácticas de Fabricación, evaluando los procesos de limpieza y sanitización. Por esto, la presencia de altos valores de *Enterobacteriaceae* en materias primas, productos intermediarios y productos terminados, son un claro indicador de fallos en el proceso de fabricación (Pisabarro, 2007).

En los alimentos que han recibido un proceso de fabricación para garantizar su inocuidad, la presencia de niveles considerables de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* indica: tratamiento térmico o manipulación inadecuada o contaminación posterior al tratamiento térmico, más frecuentemente a partir de materias primas, ambientes y equipos sucios o manejo no higiénico o almacenamiento inadecuado que ha permitido la multiplicación microbiana (Speck, 2002).

En la mayoría de los casos estudiados se ha comprobado que el recuento de *Enterobacteriaceae* supone una garantía suficiente de calidad microbiológica; en cualquier caso, los resultados son más fiables que cuando se utilizan como indicadores sólo los recuentos de coliformes porque éstos últimos suelen ser más bajos y, por lo tanto, más sujetos a error (Pisabarro, 2007).

El recuento de estos microorganismos se realiza en un medio selectivo como el agar Violeta Rojo con Bilis y Glucosa (VRBG) en el que las colonias típicas presentan una coloración violeta-rosa y están rodeadas de un halo de precipitación del mismo color (Merck, 2005).

Actualmente se reconocen 31 géneros de *Enterobacteriaceae*, que incluyen más de 134 especies diferentes. Atendiendo a su poder patógeno se dividen en dos grupos: Enterobacterias patógenas (*E. coli* enteropatógeno, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*) y enterobacterias oportunistas (*E. coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Providencia* y *Morganella*) (Murray, Baron, Jorgensen, Landry & Pfaller, 2007; Madigan, et al., 1997).

## **C. Métodos para análisis microbiológicos de los alimentos**

### **1. Microbiología convencional o tradicional (Jordano, 2008)**

**a. Métodos basados en el desarrollo de Unidad Formadora de Colonia en medios sólidos:** Se fundamentan en el desarrollo de una colonia visible a partir de una unidad viable.

**b. Métodos de dilución en tubo:** Detección de crecimiento mediante turbidez, producción de ácido o gas.

## **2. Métodos alternativos**

Se ha visto la necesidad de desarrollar métodos alternativos debido a la implementación de sistemas de análisis de puntos críticos de control en las industrias alimenticias, utilización de planes de muestreo basados en la estadística que requieren analizar un gran número de muestras, necesidad de obtener resultados con la mayor rapidez posible y aplicación de las medidas correctivas necesarias con prontitud y ahorro de recursos (Jordano, 2008).

Los métodos alternativos a la microbiología tradicional pueden concentrarse en grupos o categorías, tales como:

### **a. Automatización de métodos convencionales**

Estos consisten, por ejemplo, en métodos como Petrifilm® series 2000 coliformes y Sistema TEMPO (Recuento de microorganismos aerobios mesófilos, *E. coli*, levaduras y mohos) los cuales proporcionan resultados en menos tiempo (Jordano, 2008).

El principio del Petrifilm® es la recuperación de bacterias por medio de recuento en film de medio listo para su uso, su equivalencia con el método estándar ha sido demostrada. El principio del Sistema Tempo es la recuperación bacteriana en medio líquido, es un número más probable miniaturizado y automatizado (3 x 16 tubos). Realiza la enumeración de recuento total, *E. coli* y coliformes en productos lácteos (Devulder, Mou & Dolean, s.f.)

Esta automatización de métodos convencionales ofrece ventajas y desventajas; las ventajas: reducción del uso de material y del tiempo necesario para prepararlo e incremento de cantidad de muestras que pueden analizarse (en comparación con el método estándar en placas); desventajas: no se reduce significativamente el tiempo preciso de incubación de cada ensayo y en cuanto al Sistema Tempo requiere de inversión de los módulos que lo comprenden (Jordano, 2008).

## **b. Métodos rápidos**

Entre estos se describen los métodos de impedancia, que facilitan los resultados entre 6 a 12 horas, se basan en la detección de la actividad metabólica en un medio de cultivo. Los cambios de impedancia se detectan cuando la concentración microbiana excede de un umbral determinado. Los sistemas de impedimetría disponibles son: Rabit, Bactometer, Malthus 2000 y Bactrac, entre otros. Existen métodos tan rápidos que proveen resultados en menos de una hora, dentro de estos se encuentra el sistema VIDAS, que es un inmunoensayo automatizado. Estas metodologías no han sido diseñadas para recuento de microorganismos indicadores de higiene (Jordano, 2008).

Es necesario que en estos métodos se evalúen los siguientes aspectos: precisión, resolución, facilidad de uso, rápida generación de datos, aceptabilidad y validación internacional, costo analítico y amortización de la instrumentación, disponibilidad de espacio, soporte del proveedor, mantenimiento técnico, versatilidad y posibilidad de evolución (Jordano, 2008).

## **D. Principales factores que afectan el crecimiento y recuperación de los microorganismos en alimentos**

Varios factores ambientales afectan la recuperación de los microorganismos en los medios de cultivo. Se deben examinar en detalle las condiciones que se proveen a los microorganismos para su crecimiento, ya que estos pueden alterar el control de los mismos. Entre los principales factores están: temperatura de incubación, actividad de agua y pH, entre otros (Abbey, Heaton, Golden & Beuchat, 1988).

### **1. Temperatura de incubación**

Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. El aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina coeficiente de temperatura a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de la temperatura. En términos generales, la



velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10°C la temperatura a la que tienen lugar (Colwell, et al., 1969).

La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento psicrófilos, psicrotrofos, mesófilos y termófilos. Las temperaturas de incubación afectan el crecimiento de los microorganismos (Pisabarro, 2007).

### **1. Actividad de agua ( $a_w$ )**

Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del sustrato de cultivo ( $P$ ) y la presión de vapor de agua del agua pura ( $P_0$ ). El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa (HR) (Jordano, 2008).

El valor de la actividad de agua nos da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente. Por ejemplo, comparemos el agua pura donde todas las moléculas de agua están libremente disponibles para reacciones químicas con el agua presente en una disolución saturada de sal común (NaCl) donde una parte importante de las moléculas de agua participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta. En este último caso, la actividad de agua es mucho menor que en el primero, conforme aumenta la cantidad de solutos en el medio, disminuye su actividad de agua (Jordano, 2008).

El agua es un sustrato en muchas reacciones bioquímicas (proteasas y lipasas, por ejemplo). Cuando no hay agua disponible, estas reacciones se detienen y el metabolismo se para. Esta falta de agua también detiene muchas de las enzimas que podrían degradar las estructuras biológicas (Abbey, et al., 1988).

Es decir, cuando un microorganismo se encuentra en un sustrato con actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. En el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada (Abbey, et al., 1988).

La gran mayoría de los microorganismos requiere valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. Los valores mínimos de actividad para diferentes tipos de microorganismos son los siguientes: bacterias  $a_w > 0.90$ , levaduras  $a_w > 0.85$ , hongos filamentosos  $a_w > 0.80$  (Nguyen & Carlin, 1994).

La actividad de agua en alimentos culinarios deshidratados es  $< 0.65$  (Nguyen & Carlin, 1994).

En función de su tolerancia a ambientes con baja  $a_w$ , los microorganismos que pueden crecer en estas condiciones se clasifican en halotolerantes, halófilos y xerófilos según toleren o requieran condiciones salinas o hipersalinas, respectivamente (Lara, Nazario, Almeida, Pregnolato & Rebocho, 1976).

La reducción de la actividad de agua para limitar el crecimiento bacteriano tiene importancia aplicada en industria alimentaria. La utilización de almíbares, salmueras y salazones reduce la actividad de agua del alimento para evitar su deterioro bacteriano (Penteado & Leita, 2004).

### **3. pH**

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de iones a ambos lados de la membrana citoplásmica (FDA, 1995; Hocking & Pitt, 1980).

El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6.0 a 8.0. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a  $\text{pH}=1.0$  y otros alcalófilos que toleran  $\text{pH}=10.0$ . Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la disminución del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros competidores. Por todo ello es importante el detalle del pH en los medios de cultivo y de las soluciones que estén relacionadas con los microorganismos de interés (Richardson, 2004).

## E. Ciclo de crecimiento de los microorganismos

En un cultivo bacteriano en medio líquido o sólido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

1. **Fase lag o de adaptación:** Fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones del medio de incubación al que han sido transferidas. Las células no crecen inmediatamente sino después de este tiempo de latencia. Las células son metabólicamente activas, se adaptan al medio y eventualmente lo modifican. Para un mismo inóculo, esta fase de latencia varía dependiendo del medio al que se transfieren y de las condiciones de incubación (Speck, 2002; Abbey, et al., 1988).
2. **Fase exponencial o logarítmica:** en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima (Speck, 2002).
3. **Fase estacionaria:** en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias. No hay incremento neto del número de células, el número de células que se originan es igual al número de las que mueren (Speck, 2002).

Los microorganismos pueden entrar en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio, por la acumulación de productos de desecho tóxicos que provocan que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento (Nguyen & Carlin, 1994).

La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales (Abbey, et al., 1988).

4. **Fase de declinación o muerte:** se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo (Nguyen & Carlin, 1994).

Desde hace varias décadas se han buscado opciones para la optimización de los tiempos de incubación y se ha combinado este factor con otras condiciones con el fin de obtener resultados confiables. Algunos han tenido éxito con reducción de tiempos de incubación de los microorganismos de interés, mientras que otros no están de acuerdo con esto por los hallazgos obtenidos al respecto (Nguyen & Carlin, 1994).

A continuación, se describen algunos estudios relevantes relacionados con el tema de interés de esta investigación, todos ellos en el ámbito de microorganismos en alimentos:

El estudio más relacionado a este tema de investigación fue el realizado por Priego, Medina y Jordano (2000) en el que realizaron comparaciones de tiempos de incubación en la misma placa inoculada en diferentes horas de incubación. La comparación fue realizada en diferentes matrices de alimentos, obteniendo una equivalencia de crecimiento de colonias de coliformes en Petrifilm® entre las 10 y 14 horas de incubación, contra las 24 horas de incubación establecidas para este método.

Mossel (1970), realizó comparaciones de tiempos de incubación en la revitalización de células de *Enterobacteriaceae* dañadas y subletales en alimentos deshidratados. Evidenció que la recuperación de este tipo de microorganismos en caldo triptona soya durante 1 a 6 horas es más efectivo que en caldo buferado con glucosa durante 24 horas.

Kafel (1977), determinó mediante la combinación de factores como medios de enriquecimiento, tiempos, temperaturas y atmósferas de incubación la eficacia en la recuperación de diferentes serovariedades de *Salmonella* de filtrado de carne. Los tiempos de incubación utilizados fueron de 24 y 48 horas. Encontrando ventajas estadísticamente significativas en las combinaciones realizadas.

Rodríguez (1997), demostró en un estudio de *B. cereus* en leche en polvo reconstituida, que se obtienen recuentos bacterianos similares al aumentar la temperatura de incubación y disminuir el tiempo de incubación de la misma. Este es un estudio en el que la relación temperatura - tiempo es efectiva en la recuperación microbiológica de concentraciones conocidas de microorganismo.

Korsten (1997), logró la optimización de crecimiento de *B. subtilis* bajo diferentes condiciones de cultivo. El límite de tiempo de crecimiento esperado era de 24 a 72 horas, obteniéndose resultados satisfactorios entre 32-48 horas de incubación.

Penteado (2003), determina el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en pulpa de melón, sandía y papaya a diferentes tiempos y temperaturas de incubación, observándose tiempos de generación de *Listeria* en horas, dato interesante, por tratarse de un microorganismo de crecimiento lento.

Cabrera (2005), realizó determinaciones con recuentos de hongos utilizando un medio de cultivo con distintas actividades de agua, temperaturas y tiempos de incubación. La evidencia que encontraron en cuanto a recuentos fue nula, concluyendo que el único factor que varió fue el diámetro de las colonias aisladas de *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. Níger*.

D'Arrigo (2006), realizó la medición indirecta de la distribución de la fase Lag de células individuales de *Listeria innocua* a partir de la medición de la fase Log en caldos de enriquecimiento de *Listeria* spp por medio de densidad óptica. En este estudio estresan a cantidades conocidas de *Listeria* spp por medio de tratamiento térmico a diferentes tiempos. De lo cual se obtuvo mayor tiempo Lag para células tratadas térmicamente a mayores temperaturas.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Para controlar la calidad higiénica de los alimentos es indispensable realizar recuentos de microorganismos indicadores de higiene, ya que la calidad del producto final depende en la mayoría de los casos de la carga microbiana presente en materias primas y en productos intermediarios.

La rapidez con la que se realicen estas determinaciones influye en la productividad y tiempo de disponibilidad del producto terminado en el mercado, por lo cual, resultados en un período de tiempo más corto, ayudan a establecer un panorama de calidad microbiológica de manera temprana, influyendo directamente en la toma de decisiones sobre las posibles brechas en la higiene de algunas de las fases de la cadena productiva, antes que el producto sea embalado y liberado al mercado.

Por tal razón, este proyecto se propuso evaluar la disminución de tiempo de incubación de microorganismos indicadores de higiene como microorganismos aerobios mesófilos y *Enterobacteriaceae* a nivel interno y realizar comparaciones de los resultados logarítmicos obtenidos mediante incubaciones de 16 horas contra los tiempos de incubación establecidos, implementados y validados por las normas internacionales, obteniendo así resultados en períodos de tiempo más cortos, que ayudan a establecer un panorama de calidad microbiológica de manera temprana, para la toma de decisiones a lo largo de la cadena de producción.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Evaluar la reducción de tiempo de incubación a 16 horas para conteos de microorganismos aerobios mesófilos y *Enterobacteriaceae* en análisis de aceptación de materias primas, productos intermediarios y terminados en una industria de alimentos culinarios deshidratados.

### B. Específicos

Determinar que la población microbiana de aerobios mesófilos incubados por 16 horas es equivalente a los incubados por 48 horas a 37°C.

Determinar que la población microbiana de *Enterobacteriaceae* incubados por 16 horas es equivalente a los incubados por 24 horas a 37°C.

## VI. HIPÓTESIS

- A. Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos en 48 y 16 horas de incubación a 37°C brindan resultados equivalentes en términos logarítmicos de unidades formadoras de colonia por gramo de alimento.
  
- B. Los recuentos de *Enterobacteriaceae* a las 24 y 16 horas de incubación a 37°C brindan resultados equivalentes en términos logarítmicos de recuentos de unidades formadoras de colonia por gramo de alimento.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo y muestra

#### 1. Universo

Alimentos culinarios deshidratados

#### 2. Muestra

1,800 Materias primas, productos intermediarios (semielaborados) y productos terminados de una industria de alimentos culinarios deshidratados.

### B. Recursos

#### 1. Humanos

##### a. Asesor

Lic. Ivo Mahelly Santizo Rodas Q.B.

##### b. Investigador

Br. Leslie Lima de García

#### 2. Institucionales

Laboratorio de Microbiología del Centro de Aseguramiento de la Calidad Nestlé situado en una industria de alimentos culinarios deshidratados.

### C. Materiales

#### 1. Equipo de laboratorio

- Baño María Labline modelo 18012 (46 $\pm$  1°C)
- Incubadora Thermoscientific B6420 (37 $\pm$  1°C)
- Autoclave Fedegari FVA
- Lector de Ampollas Attest Reader

- Estufa eléctrica Tramontina de dos hornillas
- Equipo de desmineralización de agua de Ósmosis inversa General Electric
- Instrumento triturador de alimentos Seward 400 Circulator (Stomacher)
- Instrumento de medición de pH Mettler Toledo MP 120 (pHmetro)
- Electrodo Mettler Toledo Inlab 410
- Hornilla calefactora y agitadora con magnetos Lauda
- Pipeta electrónica 3M Electronic pipetor II 100-5000  $\mu$ L
- Termómetros digitales calibrados EBRO TFX 392 L
- Termómetros de máximos para autoclave VWR (Josten, 2004)

## 2. Reactivos

- Agar para recuento en placa (PCA, Plate Count Agar) Merck 105463.0500 (Marugg, 2006)
- Agar Violeta Rojo Bilis Dextrosa (VRBD, Violet Red Bile Dextrose) Merck 110275.0500 (Campbell, 2012)
- 2,3,5-trifeniltetrazolium Merck 108380.0010 (Marugg, 2006)
- Solución Tampón pH 4 Trazable a NIST Merck 109435.4000
- Solución Tampón pH 7 Trazable a NIST Merck 109439.4000
- Peptona de caseína Merck 107213.1000
- Cloruro de sodio Merck 106404.1000
- Hidróxido de sodio (1mol/L) Merck 109137.4000
- Ampollas Attest 1292 3M (control de esterilidad en autoclave) (Josten, 2004)

## 3. Instrumentos

- Vasijas de acero inoxidable
- Cucharas estériles de acero inoxidable
- Tips 3M para pipeta electrónica
- Cajas de Petri plásticas y estériles de 15 x 100 mm
- Mascarillas N95 3M (para polvos)

## 4. Cristalería

- Pipetas de 2 mL

- Pipetas de 10mL
- Beacker 25 mL
- Botellas de vidrio 1000 mL
- Botellas de vidrio 100 mL
- Tubos pyrex

## 5. Materiales de referencia

- *S. aureus* ATCC 25923 B-SA10788-30-20 Bioball Single-shot
- *B. cereus* ATCC 11778 B- BC7464-30-20 Bioball Single-shot
- *E.coli* NCTC 12923 ATCC 8739 B-EC12923-30-20 Bioball Single-shot
- *S. abaeetuba* NCTC 8244 ref 56041 B-SA8244-30-20 Bioball Single-shot
- *S. salford* IMVS 1710 ref 56043 B-SS 1710-30-20 Bioball Single-shot
- *S. abony* ACN5080 NCTC ref 56042 B-SA5080-30-20Bioball Single-shot
- Masas patrón Mettler Toledo tipo E2 de 2, 20 y 200 g (Richardson, 2002)

## D. Métodos

La metodología utilizada está basada en las normas ISO-4833:2013 para microorganismos aerobios mesófilos e ISO-21528-2:2017 para *Enterobacteriaceae* con las modificaciones de la fábrica de alimentos culinarios deshidratados (Marugg, 2006; Campbell, 2012). Se utilizó controles positivos de cepas Bioball SingleShot (marca BioMeriéux) de los microorganismos de interés listados en la sección de materiales de referencia. Las muestras analizadas fueron productos terminados, materias primas y productos intermediarios, es decir, mezclas semielaboradas antes de ser embaladas.

## 1. Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos

### a. Elaboración de medio de cultivo agar para conteo en placa (Caseína-peptona, Dextrosa, extracto de levadura)

El medio de cultivo utilizado contiene los elementos listados en el anexo 2.

### b. Preparación

- Previo a realizar cualquier actividad de pesaje, se realizó el ajuste interno de la balanza. El ajuste externo se realizó con las masas patrón tipo E2 de 2, 20 y 200 g (Richardson, 2002).
- Se utilizó mascarilla N95 3M (para polvos) para realizar el pesaje del medio de cultivo en polvo como buena práctica de laboratorio (Achenson, 2015).
- Se suspendió 22.5 g de medio de cultivo en polvo por litro de agua desmineralizada (obtenida por un sistema de ósmosis inversa).
- El polvo fue suspendido inicialmente en una tercera parte del total del agua a utilizar, homogeneizando bien el medio y luego se agregó el resto del agua necesaria (Richardson, 2002).
- Se calentó mezclando constantemente hasta disolver completamente.
- Se midió el pH del medio con el pHmetro con el electrodo con compensación de temperatura y se ajustó el pH cuando fue necesario (pH:  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ).
- Se sometió a proceso de esterilización por autoclave durante 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .
- Como parte de los controles utilizados, se verificó la temperatura que alcanzaron los ciclos de esterilización con un termómetro de autoclave y se colocó en el lector Attest Reader 3M la ampolla Attest 1292 sometida al proceso de esterilización junto al medio de cultivo para evidenciar después de 1 min – 3 horas que el proceso de esterilización fue efectivo (Josten, 2004).
- Al finalizar el ciclo de esterilización se colocaron los frascos que contenían el agar en el baño maría a  $46 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la que se utilizaron los mismos (Marugg, 2006).
- La temperatura del baño maría fue verificada con los termómetros EBRO calibrados cada vez que se usaba el equipo (Richardson, 2002).

### c. Rotulación

- Para la rotulación de las muestras, se ordenaron de la siguiente manera: productos terminados, productos intermediarios y materias primas, para evitar contaminación cruzada de la muestra con menor carga bacteriana a la muestra con mayor carga bacteriana (Achenson, 2015).
- Se numeraron adecuadamente las muestras, correlacionando lo indicado en la etiqueta con la descripción de la solicitud de análisis.
- Se rotularon las cajas de Petri previo a la siembra con los siguientes datos: fecha y hora de siembra, medio de cultivo, número de muestra, y dilución de la misma (Josten, 2004).

### d. Pesaje y homogeneización

- Previo a realizar cualquier actividad de pesaje, se realizó el ajuste interno de la balanza y el ajuste externo con las masas patrón tipo E2 de 2, 10 y 100 g (Richardson, 2002).
- Se encendieron los mecheros Bunsen de boca ancha, para mayor flujo de gas y mayor diámetro de área estéril alrededor del mismo.
- Se pesaron 10.00 gramos de alimento en 90.00 ml de diluyente precalentado a 37°C (dilución 1:10). Se permitió que el producto se dispersara o re-hidratara en el diluyente a temperatura ambiente sin agitación (Blake, 2009).
- Después de un período de 30 minutos de remojo, se mezcló por inversión el producto en polvo en la botella de dilución o se colocó en el Stomacher el producto no pulverulento en bolsa plástica estéril por 1-2 minutos para homogeneizar el producto en el líquido (Blake, 2009).

### e. Siembra

- Se homogeneizó de nuevo la muestra manualmente.
- Se tomó 1 ml de la muestra (1:10) a inocular dentro del lapso de 15 -30 minutos después de remojada la muestra en el diluyente, para evitar proliferación o inhibición bacteriana (Josten, 2004).
- Se colocó en un tubo con 9 ml de diluyente 1 ml de dilución 1:10 y homogeneizándose posteriormente en vortex, (dilución 1:100).
- Se colocó en un segundo tubo con 9 mL de diluyente 1 ml de la dilución (1:100) para realizar la dilución 1:1000.

- Luego de homogeneizar esta última dilución en vortex se colocó 1 ml en la caja de Petri rotulada (Josten, 2004).
- Se vertieron 10 ml de agar PCA a  $46 \pm 1^\circ \text{C}$  (Marugg, 2006).
- Se homogeneizó la muestra con el agar mezclando en forma circular realizando movimientos circulares hacia la derecha e izquierda y movimientos rectos hacia arriba y hacia abajo en el lugar en el que se dejó la placa (Josten, 2004).
- Se esperó a que solidificara la primera capa de agar con la muestra.
- Se vertieron entre 5- 10 ml de agar PCA en una segunda capa, para evitar colonias esparcidas (Marugg, 2006).
- Se dejó que solidificara esta segunda capa (Marugg, 2006).

#### **f. Incubación**

- Las placas se colocaron en la incubadora a  $37^\circ \text{C}$  (Marugg, 2006).
- El máximo de placas apiladas fue de 6 cajas para que la temperatura fuera homogénea (Marugg, 2006; Josten, 2004).

#### **g. Lectura**

- Las placas fueron leídas por primera vez a las 16 horas de incubación con ayuda de la cámara de Quebec y en el caso que se consideró necesario del estereoscopio (Josten, 2004).
- Las colonias fueron marcadas con marcador indeleble alrededor de las mismas.
- Se regresaron las placas a la incubadora a  $37^\circ \text{C}$  hasta concluir con las 48 horas de incubación estandarizadas (Marugg, 2006).
- Las Unidades Formadoras de Colonias contadas en la primera y en la segunda lectura fueron los datos que fueron alimentando la base de datos que generó los resultados del estudio, datos de resultados obtenidos al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria (Abbey, et al., 1988; Nguyen & Carlin, 1994), por los resultados obtenidos.

## **2. Procedimiento de análisis de *Enterobacteriaceae* (EB)**

### **a. Elaboración de medio de cultivo agar VRBD (Violeta Rojo Bilis Dextrosa)**

El medio de cultivo utilizado contiene los elementos listados en el anexo 2.

### **b. Preparación**

- Previo a realizar cualquier actividad de pesaje, se realizó el ajuste interno de la balanza y el ajuste externo se realizó con las masas patrón tipo E2 de 2, 20 y 200 g (Richardson, 2002).
- Se utilizó mascarilla N95 3M (para polvos) para realizar el pesaje del medio de cultivo en polvo como buena práctica de laboratorio (Achenson, 2015).
- Suspendió 39.5 g de medio de cultivo en polvo por litro de agua desmineralizada estéril (obtenida por un sistema de ósmosis inversa y posterior esterilización en autoclave).
- El polvo fue suspendido inicialmente en una tercera parte del total del agua a utilizar, homogeneizando bien el medio y luego se agregó el resto del agua necesaria (Richardson, 2002).
- Se calentó mezclando constantemente hasta disolver completamente.
- No se permitió la ebullición del medio por más de dos minutos (Campbell, 2012).
- Por recomendación del fabricante este medio no se esteriliza por autoclave, ni se sobrecalienta (a temperatura de ebullición por más de media hora) (Merck, 2005).
- Se midió el pH del medio con el pHmetro con el electrodo con compensación de temperatura y se ajustó el pH cuando fue necesario (pH:  $7.3 \pm 0.2$  a  $25^\circ \text{C}$ ).
- El medio preparado mostraba coloración rojo oscuro y apariencia traslucido (Campbell, 2012).
- Se colocaron los frascos que contenían el agar en el baño maría a  $46 \pm 1^\circ \text{C}$ , temperatura a la que se utilizaron los mismos (Marugg, 2006).
- La temperatura del baño maría fue verificada en cada uso del equipo con los termómetros EBRO calibrados (Richardson, 2002).

### **c. Rotulación**

- Para la rotulación de las muestras, se ordenaron de la siguiente manera: productos terminados, productos intermediarios y materias primas, para evitar contaminación cruzada, de la muestra con menor carga bacteriana a la muestra con mayor carga bacteriana (Achenson, 2015).

- Se numeraron adecuadamente las muestras, correlacionando lo indicado en la etiqueta con la descripción de la solicitud de análisis.
- Se rotularon las placas Petri previo a la siembra con los siguientes datos: fecha y hora de siembra, medio de cultivo, número de muestra, y dilución de la misma (Josten, 2004).

#### **d. Pesaje y homogeneización**

- Previo a realizar cualquier actividad de pesaje, se realiza el ajuste interno de la balanza y el ajuste externo con las masas patrón tipo E2 de 2, 10 y 100 g (Richardson, 2002).
- Se encendieron los mecheros bunsen de boca ancha, para mayor flujo de gas y mayor diámetro de área estéril alrededor del mismo.
- Se pesaron 10.00 gramos de alimento en 90.00 ml de diluyente precalentado a 37°C (dilución 1:10). Se permitió que el producto se dispersara o re-hidratara en el diluyente a temperatura ambiente sin agitación (Blake, 2009).
- Después de un período de 30 minutos de remojo, se mezcló por inversión el producto en polvo en la botella de dilución o se colocó en el Stomacher el producto no pulverulento en bolsa plástica estéril por 1-2 minutos para distribuir el producto en el líquido (Blake, 2009).

#### **e. Siembra**

- Se homogeneizó de nuevo la muestra manualmente.
- Se tomó 1 ml de la muestra (1:10) a inocular dentro del lapso de 15 -30 minutos después de remojada la muestra en el diluyente, para evitar proliferación o inhibición bacteriana (Josten, 2004).
- Se colocó 1 ml en la caja de Petri rotulada (Campbell, 2012).
- Se vertieron 10 ml de agar VRBD a 46 +/- 1° C.
- Se homogeneizó la muestra con el agar mezclando en forma circular realizando movimientos circulares hacia la derecha e izquierda y movimientos rectos hacia arriba y hacia abajo en el lugar en el que se dejó placa (Josten, 2004).
- Se esperó a que solidificara la primera capa de agar con la muestra.
- Se vertieron entre 5- 10 ml de agar VRBG en una segunda capa, para evitar colonias esparcidas.
- Se dejó que solidificara esta segunda capa (Campbell, 2012).



#### **f. Incubación**

- Las placas se colocaron en la incubadora a 37° C (Campbell, 2012).
- El máximo de placas apiladas fue de 6 cajas para que la temperatura fuera homogénea (Josten, 2004; Marugg, 2006).

#### **g. Lectura**

- Las placas fueron leídas por primera vez a las 16 horas de incubación con ayuda de la cámara de Quebec y en el caso que se consideró necesario del estereoscopio (Josten, 2004).
- Las colonias fueron marcadas con marcador indeleble alrededor de las mismas.
- Se regresaron las placas a la incubadora a 37°C hasta concluir con las 24 horas de incubación estandarizadas (Campbell, 2012).
- Las Unidades Formadoras de Colonias contadas en la primera y en la segunda lectura fueron los datos que fueron alimentando la base de datos que generó los resultados del estudio, datos que están comprendidos al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria (Abbey, et al., 1988; Nguyen & Carlin, 1994), por los resultados obtenidos.

### **3. Uso de controles positivos certificados y verificación de desempeño de medios de cultivo**

Los medios de cultivo PCA y VRBG, fueron inoculados como controles positivos en cada serie de análisis del estudio con cepas cuantitativas BioBall Single-Shot de: *S. aureus* y *B. cereus* para el conteo de microorganismos aerobios mesófilos; y las cepas de *E. coli*, *Salmonella abaetetuba*, *Salmonella salford* y *Salmonella abony* para el conteo de *Enterobacteriaceae*, utilizando el método tradicional de vertido en placa. Dentro de los certificados de calidad de las cepas incluye el tiempo recomendado para la lectura de las mismas, que es de 14 a 24 horas de incubación a 37°C, obteniendo los mismos resultados en ambas lecturas.

Para la verificación del desempeño de los medios de cultivo se basó en la metodología de la norma ISO/TS 11133-1 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media con las modificaciones de la fábrica de alimentos culinarios deshidratados (Debherges, 2006).

## **E. Análisis de datos**

### **1. Diseño del estudio**

Se realizó un estudio experimental con muestreo por conveniencia.

### **2. Tamaño de la muestra**

Basado en 1,800 muestras que incluyen: materias primas, productos intermedios y productos terminados.

### **3. Análisis estadístico**

La variable de interés fue la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia por gramo (UFC/g) de alimento medida a las 16 y 24 horas para *Enterobacteriaceae* y a las 16 y 48 horas para microorganismos aerobios mesófilos, traducida a términos logarítmicos. Se realizó una prueba de equivalencia entre las dos variaciones de la técnica. Como la variable es un recuento bacteriano, se transformó la respuesta a logaritmo base 10. De igual manera se realizó la prueba “Z” para dos poblaciones con un nivel de significancia:  $\alpha = 0.01$  y con un nivel  $\beta = 0.01$  (poder = 99%), a fin de determinar si hay o no diferencia en las coincidencias de lectura en los intervalos de tiempos establecidos en el estudio.

## VIII. RESULTADOS

A continuación, se presentan las tablas y figuras de resultados obtenidos para ambos parámetros de medición. En la tabla 1 se presenta la cantidad y porcentaje de categorías de muestras analizadas, mostrando que los productos intermediarios (semi-elaborados) incluidos corresponden a un 48% de las 1,853 muestras analizadas.

**Tabla 1.** Cantidad y porcentaje de muestras analizadas por categoría

<b>Categoría</b>	<b>Cantidad de muestras</b>	<b>%</b>
Producto terminado	416	22
Productos intermediarios	883	48
Materia prima	554	30
<b>Total de muestras analizadas</b>	<b>1,853</b>	<b>100</b>

### A. Resultados de conteo de microorganismos aerobios mesófilos en placa

En la tabla 2 se observa que el 73% de las muestras analizadas (1,315 muestras), para el parámetro de microorganismos aerobios mesófilos en placa, presentó 0 Unidades Formadoras de Colonia por gramo (UFC/g) de diferencia entre ambos conteos, por lo tanto la diferencia entre logaritmos del recuento a las 16 y 48 horas fue cero también. En el 27% restante se muestra la frecuencia con la que tuvo diferencia logarítmica menor a un logaritmo entre las dos lecturas y todos los casos fueron menor a un logaritmo.

**Tabla 2.** Diferencia logarítmica en categorías de 1,800 muestras analizadas para conteo de microorganismos aerobios mesófilos en placa

<b>Diferencia LOG<sup>1</sup></b>	<b>PT *</b>	<b>PI **</b>	<b>MP ***</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
<b>0.00</b>	347	619	349	1315	73
<b>0.01 – 0.10</b>	39	189	111	329	18
<b>0.11 – 0.20</b>	18	24	21	63	3
<b>0.21 – 0.30</b>	19	23	18	60	3
<b>0.31 – 0.50</b>	2	1	30	33	2
<b>Totales</b>	<b>415</b>	<b>856</b>	<b>529</b>	<b>1,853</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> LOG: Logaritmo base 10

\* PT: Producto terminado

\*\* PI: Productos intermediarios

\*\*\* MP: Materia prima

En la tabla 3 se muestra el resumen estadístico de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas utilizando los resultados logarítmicos de microorganismos aerobios mesófilos.

**Tabla 3.** Resumen estadístico de recuento aerobio mesófilos a las 16 y 48 horas de incubación

Datos estadísticos	16 h	48 h
Media	3.30	3.33
Desviación estándar	0.54	0.54

\* Intervalo de confianza al 99% -0.036 – 0.026

En la tabla 4 se observa la Z de proporciones para el número de acuerdos en conteo de microorganismos aerobios mesófilos que indica que el 72% de los resultados son iguales, con una hipótesis nula de  $p=1$ .

**Tabla 4.** Z de proporciones para el número de acuerdos en conteo de microorganismos aerobios mesófilos

Proporción	0.72
%	72
n (Cantidad de muestras)	1800
Ho*	$p = 1.0$

\* Ho: Hipótesis nula

En la tabla 5 se muestra la inferencia sobre una proporción en conteo de microorganismos aerobios mesófilos en placa en la que se contrastan el 100 % de los resultados, evidenciándose nuevamente un 72% de resultados iguales, en un intervalo de confianza del 95%.

**Tabla 5.** Inferencia sobre una proporción de microorganismos aerobios mesófilos en placa

Número de casos	1296
Tamaño de muestra	1800
Valor a contrastar	100 %
Nivel de confianza	99 %

### A. Resultados de conteo de *Enterobacteriaceae* en placa

Para el parámetro de conteo de colonias de *Enterobacteriaceae* el 100 % de las muestras analizadas (1,800), presentó 0 Unidades Formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de diferencia, por lo tanto entre logaritmos del recuento a las 16 y 24 horas también fue cero.

En la tabla 6 se muestra el resumen estadístico de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas tomando en cuenta los resultados en LOG de determinación de *Enterobacteriaceae*.

**Tabla 6.** Resumen estadístico de recuento de *Enterobacteriaceae* a las 16 y 24 horas de incubación

Datos estadísticos	16 h	48 h
Media	0.045	0.045
Desviación estándar	0.30	0.30

\* Intervalo de confianza a 199% -0.0 – 0.0

En la tabla 7 se observa la Z de proporciones para el número de acuerdos en conteo de *Enterobacteriaceae* que indica que el 100% de los resultados son iguales, con una hipótesis nula de  $p=1.0$ .

**Tabla 7.** Z de proporciones para el número de acuerdos en determinación de *Enterobacteriaceae*

Proporción	1.0
%	100
n (Cantidad de muestras)	1800
Ho*	$p = 1.0$

\* Ho: Hipótesis nula

En la tabla 8 se observa la inferencia sobre una proporción en conteo de *Enterobacteriaceae* en la que se evidencia que el 100% de los resultados son iguales.

**Tabla 8.** Inferencia sobre una proporción de determinación de *Enterobacteriaceae*

Número de casos	1800
Tamaño de muestra	1800
Valor a contrastar	100 %
Nivel de confianza	99 %

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo de este estudio era evidenciar que no existe diferencia significativa en los recuentos microbiológicos en tiempos estandarizados y tiempos reducidos. Las pruebas t de Student y la prueba de proporciones, indican que para la metodología de *Enterobacteriaceae* ( $p=1.0$ ), tanto la prueba t de Student como la prueba de proporciones indican que no existe diferencia entre los recuentos a los tiempos analizados. Para el parámetro de microorganismos aerobios mesófilos, el 73% de los resultados son iguales y el 27% son equivalentes (diferencia  $<0.5$  LOG (UFC/g) y el límite aceptable de equivalencias microbiológicas es hasta 1 LOG(UFC/g) (Blake, 2009).

Dentro de las ventajas detectadas en la realización de lecturas y recuentos a menores tiempos de incubación para los microorganismos indicadores de higiene, es que se realizaron conteos en placa de forma evidente, aún en los casos que hubo presencia de colonias esparcidas, debido al menor diámetro de crecimiento de las colonias.

Se confirmó en términos microbiológicos, que la población microbiana incubada a 16 horas es equivalente a la población de 48 horas de incubación, para microorganismos aerobios mesófilos, así como las poblaciones microbianas de 16 y 24 horas de incubación de *Enterobacteriaceae* son equivalentes, resultados similares a los obtenidos por Priego, et al. (2000) en sus evaluaciones entre las 10 y 14 horas de incubación en comparación a las 24 horas estandarizadas para su microorganismo de interés.

Vale enfatizar que las especificaciones microbiológicas de este tipo de culinarios deshidratados, que requieren cocción, poseen rangos bastante amplios, en general, en muestreos de 5 unidades ( $n=5$ ) se aceptan 3 ( $C=3$ ) que se encuentran en rangos de 10,000 (m) a 100,000 (M) UFC/g, es decir, logaritmos 4 y 5, por lo tanto la diferencia que se observa entre un resultado de aerobios mesófilos de 10,500 UFC/g (4.02 LOG) a las 16 horas de tiempo de incubación y por ejemplo 12,300 UFC/g (4.08 LOG) a las 48 horas de incubación, no tiene diferencia significativa y ambos resultados se encuentran dentro de especificaciones (Blake, 2009).

Por lo expuesto anteriormente se recomienda disminuir el tiempo de incubación para ambos indicadores de higiene dentro de la rutina analítica de la fabricación de culinarios deshidratados para optimizar el tiempo de disponibilidad de los insumos dentro de toda la cadena de producción.

## X. CONCLUSIONES

1. Las poblaciones de microorganismos aeróbios mesófilos en 48 y 16 horas de incubación a 37°C brindan resultados equivalentes en términos logarítmicos.
2. Las poblaciones de *Enterobacteriaceae* a las 24 y 16 horas de incubación a 37°C brindan resultados iguales en términos logarítmicos.
3. La utilización de recuentos microbiológicos de indicadores de higiene luego de 16 horas de incubación es equivalente a los datos obtenidos en tiempos estandarizados para la evaluación microbiológica en análisis de aceptación/liberación de materia primas, productos intermediarios y productos terminados en la industria de alimentos culinarios deshidratados.

## **XI. RECOMENDACIONES**

1. Realizar la evaluación de reducción de tiempos de incubación con metodologías alternativas como Petrifilm® o Compact Dry®, ya que estas ofrecen entre otras ventajas, el ahorro de tiempo por preparación de medios de cultivo, menor espacio de almacenamiento de las placas antes y durante el análisis, así como menor volumen de residuos.
2. Realizar la evaluación de reducción de tiempos de incubación en matrices como lácteos, café, confitería, entre otros, con los indicadores de higiene que apliquen según la matriz.
3. Implementar dentro de la rutina analítica de la fabricación de culinarios deshidratados, la reducción de tiempo de incubación, para liberar en menor tiempo los resultados y así optimizar los tiempos de disposición de productos terminados.



## XII. REFERENCIAS

- Abbey, S., Heaton, E., Golden, D. & Beuchat, L. (1988). Microbiological and sensory quality changes in unwrapped and wrapped sliced watermelon. *Journal of Food Protection*, 4(7), 12-14.
- Achenson, R. (2015) GI-31.113 Nestlé good laboratory practices. Retrieved June 8, 2015, from Nestlé Operational Instructions Web site: [http://webappps1.hq.nestle.com/appl\\_Technicalinstr/idc/xyyProgram/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=31.113](http://webappps1.hq.nestle.com/appl_Technicalinstr/idc/xyyProgram/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=31.113).
- Blake, C. (2009) LI-51.336 Culinary products dehydrated – Microbiological examinations .Retrieved May 17, 2009, from Nestlé Operational Instructions Web site: [http://webappps1.hq.nestle.com/appl\\_Technicalinstr/idc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&IndexNumber=51.336](http://webappps1.hq.nestle.com/appl_Technicalinstr/idc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&IndexNumber=51.336).
- Brackhousen L. (1999). Health and consumer protection directorate general- European Commission. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on the evaluation of microbiological criteria for food products of animal of human consumption. (s.f.) Retrieved from: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out26\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out26_en.html).
- Cabrera, H. (2005). Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities time and temperatures. Sao Paulo: Instituto de tecnología de alimentos.
- Colwell, N. & Morisetti M. (1969). Microbiological techniques. *Some statistical aspects*, 5(2), 573.
- Campbell, S.(2012) LI-00.757 *Enterobacteriaceae* Enumeration-Standard. . Retrieved July 14, 2012, from Nestlé Operational Instructions Web site: <http://webappps1.hq.nestle.com/applTechnicalinstr/idc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&IndexNumber=00.757>.
- Cuesta, A. (2003) Herramientas estadísticas. Validación de los métodos microbiológicos. Proyecto TCP/RLA/3014. Presentación en Power Point 97:2003. (s.f.) Recuperado de: [http://europa.eu.int/com/MB/fs/PYTCP/scv/out97\\_en.html](http://europa.eu.int/com/MB/fs/PYTCP/scv/out97_en.html).

- Debherges, P. (2006) LI-00.703 Performance testing of culture media. Retrieved June 8, 2008, from Nestlé Operational Instructions Web site:[http://webappps1.hq.nestle.com/appl\\_Technicalinstr/idc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.703](http://webappps1.hq.nestle.com/appl_Technicalinstr/idc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.703).
- D'Arrigo, G. (2006). Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 12(8), 2533-2538.
- Devulder, G., Mou, M. & Dolean F. (s.f.) *Evaluation of the TEMPO® system versus the ISO reference methods for the enumeration of total viable count, E. coli and coliforms in a variety of dairy products BioMerioux*. Retrieved from: <http://www.biomerieux-usa.com>.
- Doyle, M. (1996). Fruit and vegetable safety microbiological considerations. *Hort Science a Review of the microbiological safety of fresh salads*, 2(3), 149.
- Food and Drug Administration [FDA]. (1995). *Bacteriological analytical manual BAM*. (8<sup>th</sup>. Ed.) Pennsylvania: Gaithersburg.
- Harrigan, W. y McCance, M. (1979). *Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*. (2<sup>a</sup>. Ed.). León: Academia León.
- Hocking, A. & Pitt, J. (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2(4), 488-492.
- International Commission on Microbiological Specification for Foods [ICMSF]. (1983). *Microorganismos de los alimentos*. (2a Ed.) Zaragoza: Acribia.
- International Organization of Standardization [ISO] 4833-1(2013) (E) Microbiology of the food chain Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate. Geneve, Switzerland.
- International Organization of Standardization [ISO] 21528-2:2017: Microbiology of food and animal feedings stuff - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - part 2: Colony-count method. (2<sup>nd</sup>. Ed.). Geneve, Switzerland.

- Jordano, R. (2008). *Técnicas alternativas para análisis microbiológico*. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Josten, H. (2004). Nestlé Research Center. LI-00.700-3 Microbiological Techniques. Retrieved December 1, 2004, from Nestlé Operational Instructions Web site:[http://webapps1.hq.nestle.com/appl\\_Technicalinstr/idc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.700](http://webapps1.hq.nestle.com/appl_Technicalinstr/idc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.700).
- Kafel, L. (1977). Effects of enrichment media and incubation conditions on isolating *Salmonella* from ground-meat filtrate. *Applied Environmental Microbiology*, 4(3), 1.
- Korsten, L. (1997). *Optimizing culturing conditions for Bacillus subtilis*. (12<sup>th</sup> Ed.) Johannesburg: Universidad de Pretoria.
- Lara, A., Nazario, G., Almeida, M., Pregolato, W. y Rebocho, D. (1976). *Métodos químicos y físicos para análisis de alimentos*. Sao Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock. (1997). *Biology of microorganism*. (14a Ed.) New Jersey: Prentice-Hall.
- Marugg, J. (2006). Nestlé Research Center. LI-00.701-2 Enumeration of aerobic mesophilic bacteria/microorganisms. Retrieved February 10, 2006, from Nestlé Operational Instructions Web site: [http://webapps1.hq.nestle.com/appl\\_Technicalinstr/dc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.703](http://webapps1.hq.nestle.com/appl_Technicalinstr/dc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.703).
- Merck. (2005). *Microbiology manual*. (12a Ed.) Darmstadt: Merck.
- Mossel A. (1970). Rapid detection of sublethally impaired cells of *Enterobacteriaceae* in dried foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 12(2), 273-275.
- Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M. & Pfaller, M. (2007). *Manual of clinical microbiology*. (12<sup>th</sup> Ed.) Washington: ASM Press.
- Nguyen, C. and Carlin, F. (1994). *Critical reviews in food science and nutrition*. (7<sup>th</sup> Ed.). Zaragoza: Acribia.

- Pascual, M. (1989). *Microbiología alimentaria* (8a Ed.). Madrid: Norma.
- Penteado, A. & Leitaõ M. (2004) International journal of food microbiology selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *Journal of Food Science*, 3(2), 362.
- Penteado, L. (2003). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *Journal of Bacteriology*, 11(2), 233-237.
- Pisabarro G. (2007). *Métodos generales de análisis microbiológico de los alimentos*. Pamplona: León.
- Priego, R., Medina, L. and Jordano, R. (2000). Evaluation of Petrifilm® Series 2000 as a possible rapid method to count coliforms in foods. *Journal of Food*, 63(8), 1137-1141.
- Richardson G. (2004). *Standard methods for the examination of dairy products*. (15<sup>th</sup> Ed.) Washington: American Public Health Association.
- Richardson, M. (2002) LI-00.702 Internal control plan for microbiologic laboratories. Retrieved September 25, 2002, from Nestlé Operational Instructions Web site: [http://webappps1.hq.nestle.com/appl\\_Technicalinstr/dc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.702](http://webappps1.hq.nestle.com/appl_Technicalinstr/dc/Program/Catalogue/Detailasp?Class=LI&Index Number=00.702)
- Rodríguez, M. (1997). Multiplicación de *Bacillus cereus* inoculado en leche en polvo reconstituida. *Revista cubana de alimentación y nutrición*, 36(12), 1-3.
- Speck M. (2002). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (2<sup>nd</sup> Ed.) Washington: American Public Health Association.
- Young, J. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in foods. WHO Food Additives Series 47, World Health Organization. Geneva: JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

## XIII. ANEXOS

## Anexo 1. Normativas aplicables a productos culinarios deshidratados (Blake, 2009)

1	CAC/GL 19-1986 Principios y guía para el intercambio de información en situaciones	45	23332 ACUERDO GUBERNATIVO 989-99 para transporte de producto guatemala
2	CXG-038e-2015 Nombre, Clase y sistema de numeración internacional para aditivos	46	Normativa del agua
3	CODEX CAC/GL 21-1987	47	Acuerdo de fortificación de la azúcar 328-3835
4	CODEX STAN 117-1981, Rev. 2-2001	48	CAC MRL 2-2015 LIMITES MAXIMOS DE RESIDUOS (LMR) Y RECOMENDACIONES SOBRE
5	CODEX 18-1981 GRASAS Y ACEITES	49	CARICOM Regional Draft Standard Specification for Labeling of prepackaged Foods
6	CODEX 33-1981 ACEITE DE OLIVA	50	Food and Drugs Act Chapter 30:01
7	CODEX 57-1981 CONCENTRADO TOMATE	51	Food and Agricultural Import Regulations and Standards - Narrative
8	CODEX 211-1989 GRASA ANIMAL	52	Weights and measures Act 1
9	CODEX 261-2008 DESNATADA	53	JS 1- Pat 20- 1988
10	CODEX 263-1988 QUESO CHEDDAR	54	JS CRS 3- 2010
11	CODEX 210-1989 ACEITE VEGETAL	55	PROYF-NMX-603-NORMEX-2003
12	CODEX STAN 240-2008	56	NOM-002-SCFI-2011
13	ADITIVOS NORMA CODEX 192-1985	57	NOM-030-SCFI-2008
14	CODEX CX GL 23-1997	58	NOM-051-SCFI/SSA1-2010
15	CODEX CAC RCP 1-1989 Rev 4-2003	59	NMX-F-058-1988
16	CODEX STAN 193-1995 Contaminantes en alimentos y piensos	60	Tolerancias Internas Declaraciones Información Nutricional y CAT - Critic
17	Pesticide and Toxic Chemicals Act 30.03.	61	REGLAMENTO DE CONTROL SANITARIO DE PRODUCTOS Y SERVICIOS
18	Guidelines on Nutrition Labelling	62	Decreto etiquetado (Diario Oficial)
19	CAC/GL 90-2017 Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the	63	Lineamientos de información a ostentar en area frontal criterios y características de distintivo
20	NB 314002	64	Matriz Legislación de contaminantes
21	NB 314004	65	DGNTI COPANIT 36-475 2008
22	NB314001_2008	66	DGNTI COPANIT No. 421-98 I
23	NB 778	67	DGNTI COPANIT No. 421-98 II
24	NB_21003_2005	68	NORDOM 238 - Caldos, Sopas y Consomes, definiciones y clasificación
25	Translation NB 314001 articles 5-6	69	NORDOM 234 - Caldos, Sopas y Consomes
26	RTCA 67.04.50.08 (Anexo de Resolución No. 243-2008)	70	FDA 21CFR101.105
27	RTCA 67.01.30.08 (Anexo 1 de la Resolución No. 176-2008)	71	NIST Handbook 133
28	RTCA 67.01.33.08 (Anexo 4 de la Resolución No. 176-2008)	72	Public Law 118 STAT 905, 907, 909, 911, 906, 910
29	RTCA 67 01 60:10	73	Food Allergen Labeling and Consumer
30	RTCA 01.01.11:08 (Anexo de la Resolución No. 291-2012)	74	21 CFR PART 110—CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICE IN MANUFACTURING,
31	RTCA 67046812	75	NIMP 002, "PRODUCTOS ENVASADOS. Contenido Neto"
32	RES 280-2012 RTCA	76	Criterios microb sopas cremas que requieren cocción
33	RES 281-2012 RTCA -	77	Fortificación de la harina
34	RES 283-2012 RTCA	78	Reglamento sanitario de los alimentos DTO. No 977/98. (Jan 2000)
35	Ley No. 5392 Norma Oficial para la sal de Calidad alimentaria	79	NCh 1650/1 Of84 and NCh 1650/2 Of84 - Contenido Neto
36	Reforma Oficial para la Sal de Calidad Alimentaria N° 30032	80	Ecuadorian Net Content legislation
37	Acuerdo gubernativo 29-2004	81	NTE INEN 2602 2011 Sopas, Caldos y Cremas
38	COGUANOR NGO 29.001	82	Decreto No. 35.099
39	COGUANOR NGO 34.160	83	Decreto No. 34.901
40	COGUANOR NGO 34.161	84	decreto_129-009_peso neto
41	COGUANOR NGO 34.176	85	Decreto No. 402/012 Información nutricional complementaria
42	Acuerdo Gubernativo Número 989-99	86	Reglamento técnico Mercosur sobre el rotulado nutricional de alimentos envasados RES No. 46/03
43	Acuerdo Ministerial Número 0291-2005 (Resolución No. 121-2004 COMIECO)	87	No. 4178/14 Aesororia Juridica
44	Norma Sanitaria para la autorización y funcionamiento de fábricas de alimentos	88	Summary Colombian legislation V2 11214
		89	SOLICITUD-DE-Licencia-Sanitaria-de-Transporte para alimentos

## **Anexo 2.** Información sobre los medios de cultivo utilizados en el estudio

### **Plate count agar (Casein-peptone Dextrose Extracto de levadura)**

Este medio de cultivo no contiene inhibidores o indicadores. La composición de este medio cumple con el Estándar Métodos para examinar aguas y con Estándar Métodos para examinar productos alimenticios (Merck, 2005).

<b>Composición típica</b>	<b>(gramo/litro)</b>
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
D (+) glucosa	1.0
Agar-agar	14.0.

### **VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar**

Agar selectivo propuesto por MOSSEL et al. (1962, 1963) para el aislamiento y enumeración de todas las especies de *Enterobacteriaceae* en alimentos.

Este medio cumple con las recomendaciones de Organización de Estandarización Internacional (ISO) (1977) y el ministerio de salud Alemana (Bundesminister für das Gesundheitswesen) (1967) y muy conforme con la Farmacopea II Europea.. HECHELMANN et al. (1973) obtuvieron Buenos resultados con este medio de cultivo. El medio también cumple con las recomendaciones alemanas (Merck, 2005).

### **Modo de acción**

El cristal violeta y las sales biliares inhiben a la microbiota contaminante. La degradación de la glucosa es acompañada por la producción de ácido que es indicado en el cambio de color a rojo y por las zonas de precipitación de los ácidos biliares que rodean las colonias. Todas las *Enterobacteriaceae* son detectadas al degradar la glucosa y producir ácido (Merck, 2005).

<b>Composición típica</b>	<b>(gramo/litro)</b>
Peptona de carne	7.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de sodio	5.0
D (+) glucosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.002
Agar agar	13.0

**Br. Leslie Verónica Lima Aldana de García**  
**AUTOR**

**Lic. Ivo Mahelly Santizo Rodas**  
**ASESOR**

**Licda. María del Carmen Bran**  
**REVISORA**

**Dra. Karin Herrera**  
**REVISOR**

**MSc. Osberta Isaac Morales Esquivel**  
**DIRECTOR**

**M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto**  
**DECANO**