

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

APLICACION DE METODOS RAPIDOS PARA LA DETECCION DE COLIFORMES AL CONTROL DE PUNTOS CRITICOS EN UNA INDUSTRIA EMBOTELLADORA.

TRABAJO ESCRITO VIA CURSO DE EDUCACION CONTINUA QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA DE ALIMENTOS PRESENTA: MA. ELENA LOMBARDEO VENTURA

293442



MEXICO, D. F

2001



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

FACULTAD DE QUÍMICA

**APLICACIÓN DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA
LA DETECCIÓN DE COLIFORMES AL
CONTROL DE PUNTOS CRÍTICOS EN UNA
INDUSTRIA EMBOTELLADORA.**

**TRABAJO ESCRITO VIA CURSO
DE EDUCACIÓN CONTINUA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MA. ELENA LOMBARDEO VENTURA

MÉXICO, D.F.

2001

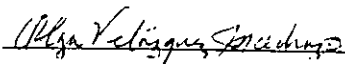
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Pedro Valle Vega
VOCAL: Olga Velázquez Madrazo
SECRETARIO: Zoila Nieto Villalobos
1er. SUPLENTE: Federico Galdeano Biezobas
2do. SUPLENTE: Josefina Viades Trejo


SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Facultad de Química.

NOMBRE Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

Olga Velázquez Madrazo.  _____

NOBRE Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

María Elena Lombardero Ventura.  _____

DEDICACIÓN

A Dios por todo lo que me ha dado.

Le dedico esta tesis a mis seres más queridos; Mis Padres, por que día a día me otorgan incondicionalmente su tiempo, amor y constante dedicación. Así por el hecho de que NOS BRINDARON SU PROTECCIÓN Y SUS SUEÑOS DESDE QUE FUIMOS PEQUEÑOS, SIENDO UN EJEMPLO DE SUPERACIÓN.

AGRADEZCO.

A mis hermanos por la ayuda que siempre me han otorgado, en especial a Mary y a Julieta que me ayudaron cuando lo necesité para lograr este objetivo.

A mis sobrinos, Tony, Bogar, Anabel, Karen, Stefania, Andrea, Greta, Omar, Aron, Moncerrat, Paulina, Diego y por los que estarán con nosotros, por hacerme reir y dar alegría Y UNA ESPERANZA a los hogares de mis hermanos; a ellos, los invité que tomen el camino del aprendizaje, por que el ser humano será grande entre los grandes por su constante aprendizaje.

Sin olvidarme Jamás de darles las gracias a mis grandes amigas y compañeras de la Universidad "Maguie" y "Lilia" por que juntas solíamos darnos apoyo y comprensión. Así como a todas aquellas personas que estuvieron compartiendo momentos lindos en mi vida.

A la Universidad y a todos los maestros que que han dedicado su tiempo y corazón por la enseñanza de México.

AGRADECIMIENTOS A TODOS MIS AMIGOS.

EL ARBOL DE LOS AMIGOS

Jorge Luis Borges.

Existen personas en nuestras vidas que nos hacen felices por la simple casualidad de haberse cruzado en nuestro camino.

Algunas recorren el camino a nuestro lado, viendo muchas lunas pasar, mas otras apenas vemos entre un paso y otro.

A todas las llamamos amigos y hay muchas clases de ellos.

Tal vez cada hoja de un árbol caracteriza uno de nuestros amigos. El primero que nace del brote es nuestro amigo papá y nuestra amiga mamá, que nos muestran lo que es la vida.

Después vienen los amigos hermanos, con quienes dividimos nuestro espacio para que puedan florecer como nosotros.

Pasamos a conocer a toda la familia de hojas a quienes respetamos y deseamos el bien.

Mas el destino nos presenta a otros amigos, los cuales no sabíamos que irían a cruzarse en nuestro camino.

A muchos de ellos los denominamos amigos del alma, de corazón.

Son sinceros, son verdaderos. Saben cuando no estamos bien, saben lo que nos hace feliz. Y a veces uno de esos amigos del alma estalla en nuestro corazón y entonces es llamado un amigo enamorado. Ese da brillo a nuestros ojos, música a nuestros labios, saltos a nuestros pies.

Mas también hay de aquellos amigos por un tiempo, tal vez unas vacaciones o unos días o unas horas. Ellos acostumbran a colocar muchas sonrisas en nuestro rostro, durante el tiempo que estamos cerca.

Hablando de cerca, no podemos olvidar a amigos distantes, aquellos que están en la punta de las ramas y que cuando el viento sopla siempre aparecen entre una hoja y otra.

El tiempo pasa, el verano se va, el otoño se aproxima y perdemos algunas de nuestras hojas, algunas nacen en otro verano y otras permanecen por muchas estaciones.

Pero lo que nos deja más felices es que las que cayeron continúan cerca, alimentando nuestra raíz con alegría. Son recuerdos de momentos maravillosos de cuando se cruzaron en nuestro camino.

Te deseo, hoja de mi árbol, paz, amor, salud, suerte y prosperidad. Hoy y siempre...Simplemente porque cada persona que pasa en nuestra vida es única.

Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros.

Habrá los que se llevarán mucho, pero no habrá de los que no nos dejarán nada.

Esta es la mayor responsabilidad de nuestra vida y la prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad.

INDICE

TEMA	Pag.
1) INTRODUCCIÓN. Importancia de uso de Métodos Rápidos.	2-5
OBJETIVOS	
2) INFORMACIÓN GENERAL. Importancia de la detección de bacterias	
Indicadores en el consumo de agua.	5-7
2.1 Métodos de análisis tradicionales para la detección de bacterias indicadoras.	7
2.2 Métodos de análisis para la detección de bacterias indicadoras.	7-8
2.3 Técnica de Substrato Definido Cromogénico.	9-10
2.4 Descripción de Marcas:	
2.4.1 "Colillert".	10-12
2.4.1.1 Reacciones y uso de Sustrato Definido.	12-14
2.4.1.2 Tabla comparativa de pruebas "Colillert"	15
2.4.2 "ReadyCult"	16
2.4.3 "E*-Colite"	17
2.4.4 Comparativo de Marcas.	18-19
2.5 Identificación de puntos críticos en la elaboración de una bebida sabor manzana. Descripción del proceso.	20-23
2.5.1 Diagrama de elaboración e Identificación de puntos críticos.	24
2.5.2 Hoja de análisis de riesgos.	25-28
3) DISCUSIÓN.	28-30
4) CONCLUSIÓN.	30-31
5) BIBLIOGRAFÍA.	32-33

APLICACIÓN DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES AL CONTROL DE PUNTOS CRÍTICOS EN UNA INDUSTRIA EMBOTELLADORA.

Caso: Embotelladora de una bebida gaseosa de manzana.

1.- INTRODUCCIÓN:

Cada año millones de personas en todo el mundo sufren enfermedades originadas por el consumo de alimentos y agua contaminados. Las enfermedades y, en ocasiones, la muerte de seres humanos son provocados por la ingestión de alimentos y agua que contienen microorganismos patógenos, toxinas y otros contaminantes químicos como residuos tóxicos, que son extraños al cuerpo humano (pesticidas, antibióticos, hormonas, etc.). Estos peligros pudieron ser evitados por un diagnóstico oportuno, confiable y rápido.

Los cambios comerciales y económicos derivados del nuevo rumbo que México está tomando crean la necesidad de un mejor control sanitario para la obtención de productos de calidad. (4)

Los métodos de control de calidad de la elaboración de alimentos y agua potable, generalmente se basan en la inspección y análisis de laboratorio y no han sido lo suficientemente eficaces en tiempo para garantizar la seguridad de los mismos. En la Secretaría de Salud como en la Industria alimentaria e industrias embotelladoras, para el control sanitario de alimentos se realizan verificaciones de las instalaciones, equipos y se observan las prácticas de higiene del personal para vigilar aquellos factores que funcionan como vehículos de peligros microbiológicos o fisicoquímicos en su elaboración. En estas verificaciones se toman muestras de ingredientes, del

producto en proceso y del producto terminado para analizarlos microbiológica y fisicoquímicamente. Los resultados obtenidos de estos análisis se comparan con las especificaciones que han sido establecidas en la legislación sanitaria o en Normas Mexicanas. (4)

Generalmente aquellos productos que presentan peligros microbiológicos suelen ser consecuencia de desviaciones en los procesos de elaboración. La detección de estas desviaciones, su rápida corrección y su prevención anticipada, son el principal objetivo de cualquier método de garantía de la calidad. (4)

Aquellas empresas que se preocupan por prevenir los peligros que se pueden presentar en su proceso requieren de tecnologías que permitan tener un control más amplio, sobre todo en el proceso de alimentos y bebidas embotelladas destinados al consumo humano.(4)

Los procedimientos de aislamiento y confirmación de peligros biológicos en alimentos y agua implican un cierto número de pasos, que requieren tiempo y dinero.

Por lo que países de primer mundo, principalmente EUA, han desarrollado pruebas microbiológicas que reducen significativamente el tiempo para obtener un resultado confiable. A estas pruebas las llamaremos MÉTODOS RÁPIDOS.

Los métodos rápidos son tecnologías microbiológicas, biológicas y fisicoquímicas para el análisis, que reducen costos, tiempos, y horas-hombre en el laboratorio. Sin embargo, el beneficio principal de los métodos rápidos estriba en la eficacia con que identifican el peligro, teniendo compatibilidad y confianza con los métodos de análisis tradicionales.

Estos métodos de análisis se basan fundamentalmente en principios enzimáticos; como las tecnologías de sustrato definido cromogénico, inmunológicos

como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), Bioluminiscencia, técnicas de bacteriófagos, etc., que han sido aprobadas por organismos internacionales principalmente por AOAC , FDA, EPA, IBWA, etc. y en México, por SECOFI y SSA lo cual se refleja en la inclusión de estas técnicas en la NORMA OFICIAL MEXICANA. (Apéndice)

El presente trabajo se ha desarrollado al terminar el diplomado Verificación Sanitaria en la Industria Alimentaria impartido por la Facultad de Química de la UNAM. La opción de vía rápida para la titulación, pretende aprovechar los conocimientos de un diplomado y la experiencia de los sustentantes; en mi caso esta experiencia es de 2 ½ años de trabajar en Métodos Rápidos.

Analizaré brevemente la importancia del control microbiológico del agua, en la industria embotelladora y los grupos de microorganismos indicadores.

A continuación se examinarán los métodos tradicionales y los métodos rápidos disponibles en el mercado, incluyendo un cuadro comparativo.

Se incluye la descripción del proceso de elaboración de la bebida de manzana, y su diagrama de flujo señalando los puntos críticos de control, así como las hojas de análisis de riesgos.

Finalmente, se discuten los métodos rápidos reportados y sus posibilidades de aplicación al caso de una bebida gaseosa de manzana, hasta concluir con una recomendación.

Cabe enfatizar que el ARICPC es fundamental en una industria como la embotelladora, para asegurar la inocuidad del producto ya que es un instrumento que permite prevenir y mantener controlados los riesgos para la salud del consumidor.

OBJETIVOS

Describir los principios, usos, y aprobaciones de los métodos rápidos más conocidos y aplicados en la industria embotelladora para la detección de coliformes.

Analizar las posibles aplicaciones de métodos rápidos, a la determinación de coliformes en los puntos críticos en una industria embotelladora de bebida gaseosa de manzana, bajo un sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos (ARICPC).

2. INFORMACIÓN GENERAL.

México es uno de los principales países consumidores de bebidas embotelladas, principalmente refrescos y agua. Por este hecho es de gran interés contar con embotelladoras que apliquen métodos de análisis eficaces para la prevención de enfermedades transmitidas por deficiencia en el proceso; es necesario identificar el peligro cuando lo hay, y controlar la causa que lo genera. De ahí que la industria embotelladora tienda actualmente a implementar el programa ARICPC.

En la industria embotelladora el abastecimiento de agua con calidad adecuada para consumo humano es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales.

Actualmente se han mejorado tecnológicamente la mayoría de las pruebas de detección para coliformes, haciéndolas más rápidas, con más sensibilidad, más fáciles, y en algunos casos también automatizadas.

OBJETIVOS

Describir los principios, usos, y aprobaciones de los métodos rápidos más conocidos y aplicados en la industria embotelladora para la detección de coliformes.

Analizar las posibles aplicaciones de métodos rápidos, a la determinación de coliformes en los puntos críticos en una industria embotelladora de bebida gaseosa de manzana, bajo un sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos (ARICPC).

2. INFORMACIÓN GENERAL.

México es uno de los principales países consumidores de bebidas embotelladas, principalmente refrescos y agua. Por este hecho es de gran interés contar con embotelladoras que apliquen métodos de análisis eficaces para la prevención de enfermedades transmitidas por deficiencia en el proceso; es necesario identificar el peligro cuando lo hay, y controlar la causa que lo genera. De ahí que la industria embotelladora tienda actualmente a implementar el programa ARICPC.

En la industria embotelladora el abastecimiento de agua con calidad adecuada para consumo humano es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales.

Actualmente se han mejorado tecnológicamente la mayoría de las pruebas de detección para coliformes, haciéndolas más rápidas, con más sensibilidad, más fáciles, y en algunos casos también automatizadas.

La realización de frecuentes exámenes para determinar si el agua, envases, equipos y hasta manos del personal de la industria contienen organismos indicadores de contaminación fecal sigue siendo el modo más sensible y específico de estimar la calidad desde el punto de vista higiénico.

Las bacterias indicadoras están universalmente presentes en gran número en las heces de los seres humanos y los animales de sangre caliente, gracias a lo cual advierten del riesgo de que aparezcan patógenos. (5)

Los organismos indicadores se han usado en el laboratorio por microbiólogos desde 1892 (*E.coli*) para detectar condiciones sanitarias inadecuadas del proceso y almacenaje y la presencia potencial de patógenos. (14)

Estos microorganismos son fáciles de detectar por métodos sencillos y no se desarrollan en el agua en condiciones naturales. (12)

Los indicadores de calidad sanitaria empleados en el control del agua potable consisten en 2 grupos de bacterias: Coliformes y Enterococos. (14)

Coliformes:

Se define como un grupo de bacterias en forma de bastón, aeróbicas y anaeróbicas facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas, que fermentan lactosa con formación de ácido y gas en 48 hs. a 35°C. El grupo incluye organismos como *Escherichia coli*, que es habitante normal del intestino, además del microorganismo *Klebsiella pneumoniae* y otras. (5)

Enterococos:

Dentro de este grupo los enterococos fecales generalmente están presentes en las heces de origen humano y animal. Los miembros de esta especie poseen el antígeno del grupo D de Lancefield. Taxonómicamente pertenecen a los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus*. Los estreptococos fecales rara vez se multiplican en aguas contaminadas y son más persistentes que *E.coli* y las bacterias coliformes. Por lo tanto, en los exámenes de la calidad del agua, sirven sobre todo como indicador suplementario de la eficacia del tratamiento. Además, los estreptococos, son muy resistentes al secado y pueden ser útiles para realizar controles sistemáticos después de la colocación de nuevas tuberías, de la reparación de los sistemas de distribución, así como para detectar la contaminación de aguas subterráneas. (12)

2.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS TRADICIONALES PARA LA DETECCIÓN DE LOS INDICADORES:

Existen dos tipos de procedimientos para la detección de coliformes; el número más probable (NMP) y el filtro de membrana (MF).

El método **MNP** utiliza medio de cultivo líquido en tubos de prueba, y las muestras de agua potable se añaden a los tubos con medio; es usado para la detección de coliformes. El agua es inoculada con un caldo nutritivo en tubos que contienen caldo lactosado y se incuban a 35°C; los tubos se observan para detectar la producción de gas y la turbidez, que constituye una prueba positiva presuntiva que debe confirmarse en medios selectivos, específicamente caldo lactosado y bilis-verde brillante por la misma técnica.

La prueba incluyendo la confirmación toma de 48-96 horas, el resultado se reporta como Número más Probable (NMP) de coliformes/ 100 mL de agua.

En el procedimiento **MF**, la muestra se pasa por un filtro de membrana estéril que retiene a las bacterias, el filtro se coloca en medio de cultivo Endo, que contiene lactosa e indicadores, y se incuba a 35 °C; los resultados se obtienen en 24 horas. (5 y 13)

Cuando se utiliza el método de filtro de membrana con el agua potable se deben analizar al menos 100 mL de agua, aunque en los sistemas de agua aparentemente limpias se deben filtrar volúmenes aún mayores. Después de la filtración de un volumen conocido de agua el filtro se coloca sobre la superficie de una placa con un medio de cultivo selectivo para los organismos coliformes. Se cuentan las colonias típicas y de este valor se puede determinar el número de coliformes en la muestra original de agua. En sistemas de agua bien regulados, los coliformes siempre deben ser negativos. (5)

2.2 MÉTODOS RÁPIDOS DE ANÁLISIS PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES.

En el control de agua potable, en una embotelladora lo más importante es detectar coliformes. Para ello existen pruebas rápidas como alternativa a los métodos tradicionales anteriormente descritos. Las pruebas o métodos rápidos para agua han sido desarrollados por laboratorios reconocidos como IDEXX, MERCK, 3M y CHARM principalmente. Ellos han generado tecnologías basadas en sustrato definido cromogénico; excepto 3M que es un sistema para la enumeración de coliformes

totales y *E. coli*. que utiliza placas con nutrientes específicos deshidratados y con agentes gelificantes para el desarrollo de colonias típicas de éstos.

La NOM 127 de la Secretaría de Salud y la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA), indican que el uso de métodos rápidos para la detección de bacterias en la industria alimentaria es aceptable, siempre y cuando sean validados para demostrar la compatibilidad y confianza con respecto al método tradicional. (3)

En México, en diciembre del año 2000 la tecnología de sustrato definido cromogénico fue aprobada y publicada en las Normas Oficiales Mexicanas 180 y 181- de la Secretaría de Salud. (1,2 y 3)

Los laboratorios IDEXX, fueron los iniciadores de esta tecnología, la cual fue aprobada en la Norma Oficial Mexicana bajo la marca "Colilert". Sin embargo los laboratorios MERCK y CHARM desarrollaron las pruebas "Ready Cult" y "E-Colite" respectivamente, basados en el mismo principio.

2.3 TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO CROMOGENICO.

Es aquella técnica que utiliza nutrientes Indicadores para bacterias objetivo; se emplean sustratos hidrolizables específicos para la detección simultánea de enzimas de bacterias coliformes totales y *Escherichia coli*.

La técnica cromogénica seleccionó a la enzima β -D-galactosidasa, que es exclusiva del grupo coliforme, para aplicarla a la hidrólisis del sustrato cromogénico, liberando el cromógeno. En cambio *Escherichia coli*, además de dar una respuesta

positiva en la prueba de coliformes totales, posee también la enzima β -D-glucoronidasa la cual hidroliza el otro sustrato fluorogénico liberando el fluorógeno.

La respuesta positiva del grupo coliforme total se observa mediante el desarrollo de color visible en la muestra de agua. Una vez que se ha detectado esta respuesta podemos detectar respuesta positiva de *Escherichia coli*, por el desarrollo de fluorescencia bajo la luz U.V. de onda larga (366nm). (1,2,6)

Veremos a continuación las opciones disponibles de éstos métodos, en el mercado:

2.4 DESCRIPCIÓN DE MARCAS "Colillert", "ReadyCult" y "E-colite"

2.4.1.- COLILLERT.

Colillert es la prueba estándar para la detección simultánea de coliformes y *E. coli* más utilizada en el mundo, por más del 60% de las plantas embotelladoras en los E.U.A. y es el método más usado en Japón, Canadá, Europa y el Medio Oriente. Sus principales beneficios son: (6)

- *Resultados en 24 horas o menos

- *No hay interferencias heterotróficas durante el tiempo de incubación de la prueba (24 horas).

- *Menos de dos minutos de trabajo de laboratorio

- *Sensible y confiable

Aprobado por la EPA para agua potable y fuentes de suministro de agua. El Registro Federal lo aprobó para coliformes totales el 29 de junio de 1989, y para *E. coli*

el 10 de junio de 1992. También aparece en la Edición 18ª de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de APHA (Métodos estándar para el análisis de agua y aguas de desecho). Colilert también está aprobado por el AOAC, IBWA, AWWA. y por NORMA OFICIAL MEXICANA. (1-2-6-7-13)

Colilert puede usarse para pruebas cualitativas o cuantitativas y no requiere confirmación por que funciona con tecnología de sustrato definido para los microorganismos objetivo. (7)

Colilert detecta coliformes totales y *E. coli* a concentraciones de 1 UFC en 100 ml de agua. (13)

a) Identificación de coliformes totales:

En esta prueba se utiliza el sustrato cromogénico ortonitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) para detectar a la enzima β -D-galactosidasa producida por todas las bacterias coliformes. Las enzimas β -D-galactosidasas hidrolizan el sustrato cromogénico, liberando el color amarillo proveniente del ortonitrofenol, lo que indica y confirma una prueba positiva de coliformes totales dentro de 24-28 horas sin procedimientos adicionales. (6)

Para algunas embotelladoras es necesario analizar aguas con color por lo que requieren de métodos en los que no interfiera el color de la muestra.

Para eso, IDEXX desarrolla "Colisure" prueba que utiliza el sustrato rojo-cromofenol- β -D-galactopiranosido que libera rojo-cromofenol dando una coloración rojo púrpura, que destaca sobre el color de muchos refrescos.

b) Identificación de *Escherichia coli*:

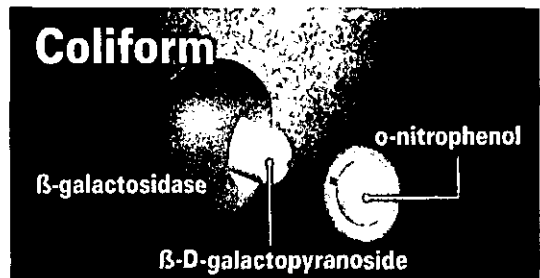
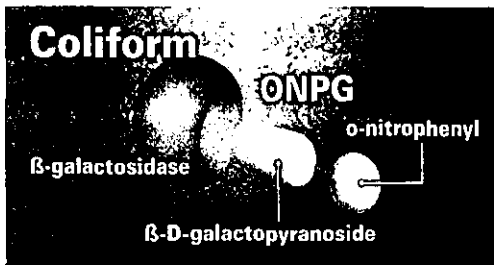
El sustrato fluorogénico utilizado es el 4-metil-umbelliferil- β -D-glucorónido (MUG) para detectar las enzima β -glucuronidasas, presentes en *E.coli*. Las enzimas hidrolizan el sustrato fluorogénico produciendo fluorescencia debido a la liberación de la 4-metil-umbelliferona. La fluorescencia se visualiza bajo la luz U.V de onda larga (366 nm). (6)

c) Identificación de Enterococos:

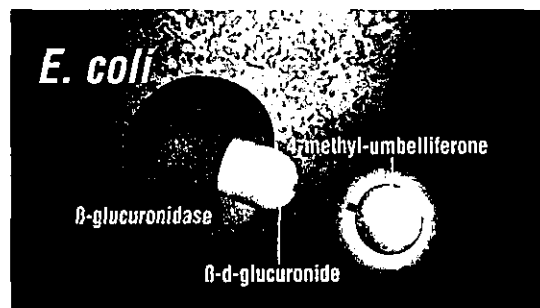
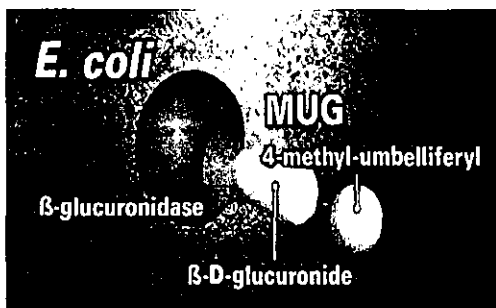
La prueba usa el sustrato fluorogénico 4-metyl-umbelliferona- β -D-glucosido que es hidrolizado por la enzima β -glucosidasa liberando el fluorógeno 4-metil-umbelliferona produciendo fluorescencia bajo luz U.V.

2.4.1.1 REACCIONES Y USO DE SUSTRATO DEFINIDO CROMOGÉNICO:

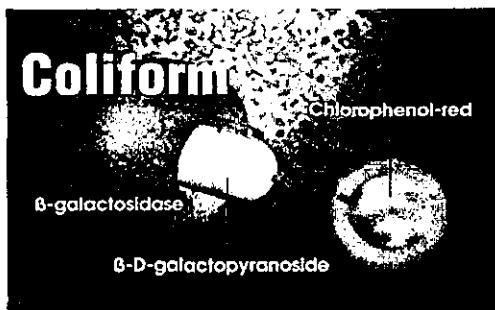
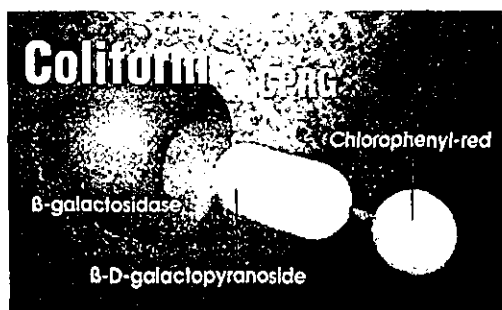
REACCIÓN POSITIVA DE MUG PARA COLIFORMES TOTALES



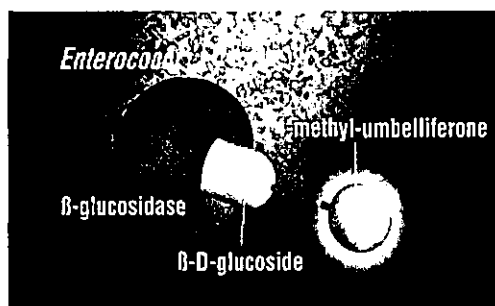
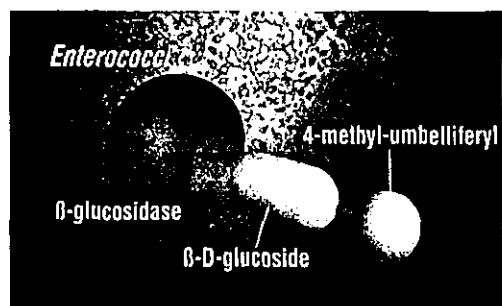
REACCIONES POSITIVAS DE MUG PARA *E. coli*



REACCIÓN POSITIVA DE CPRG PARA COLIFORMES EN AGUA CON COLOR.



REACCIÓN POSITIVA DE MUG PARA ENTEROCOCOS.



USO Y CUANTIFICACIÓN:

Las pruebas de detección "Colillert" de IDEXX, constan de un frasco estéril con cantidades pequeñas de tiosulfato para inactivar el cloro presente en la muestra de agua a analizar y un blister o paquete que contiene al sustrato definido. Se abre el frasco estéril y se depositan 100 ml de la muestra de agua, posteriormente se vacía el sustrato a la muestra, se cierra, se agita y por último se incuba a 35 °C por 24 horas. Los resultados obtenidos son cualitativos ó se puede continuar directamente la cuantificación a partir de la transferencia del contenido del frasco a la charola "Quanti-Tray" que es una placa estéril con pozos que distribuyen la muestra y, en función del

número de pozos positivos, nos permite reportar el NMP/100 mL. También ofrece series de 10 tubos que se inoculan con 10 mL para obtener el NMP/100mL.

Los procedimientos de análisis de las marcas "Merck's-Readycult" y "Charm-E*colite" son similares al formato cualitativo, y difieren un poco en la forma de cuantificar.



2.4.1.2 TABLA COMPARATIVA DE PRUEBAS IDEXX PARA COLIFORMES.

ORGANISMOS OBJETIVO.	PRODUCTO IDEXX.	ENZIMA OBJETIVO.	NUTRIENTE INDICADOR.
Coliformes	Colilert y Colilert 18.	β -galactosidasa	0-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG).
Coliformes	Colisure	β -galactosidasa	Rojo-cromofenil- β -D-galactopiranosido (CPRG).
<i>E. coli</i>	Colilert, Colilert 18 y Colisure	β -glucoronidasa	4-metil-umbelliferil- β -D-gluconido (MUG).
Enterococos	Enterolert	β -glucosidasa	4-metil-umbelliferil- β -D-gluconido (MUG).

2.4.2 Merck's READY CULT® Coliformes.

Al igual que Colilert, Ready Cult maneja la combinación de un sustrato cromogénico y uno fluorogénico para la detección simultánea de coliformes totales y *E. coli*.

a) Identificación de coliformes:

La presencia de coliformes totales produce un color azul verdoso después de la hidrólisis de 5-bromo-4-cloro-3-indol-1-β-D-galactopiranosido (**X-GAL**) por la enzima característica β-D-galactosidasa. (9)

b) Identificación de *E. coli* :

Es a partir de la hidrólisis de 4-metil-umbelliferil-β-D-glucoronido (**MUG**) por la enzima β-D-glucuronidasa. Se verifica el color azul-verdoso comprobando la fluorescencia bajo luz U.V. (9)

2.4.2 READYCULT® Enterococos

a) Identificación de Enterococos:

El sustrato cromogénico 5-bromo-1-cloro-3-indol-1-β-D-glucopiranosido (**X-GLU**) es usado para diferenciar Enterococos de otras bacterias. La muestra de agua vira a azul verdoso cuando el sustrato **X-GLU** es hidrolizado por la enzima β-D-glucosidasa característica de Enterococos. (9)

2.4.4 CHARM E-colite.

E*Colite es una prueba para detectar Coliformes y/o *E.coli*, que ha sido evaluado para aguas superficiales y para beber por EPA (Environmental Protection Agency).

E*Colite proporciona un resultado cualitativo y se puede usar para cuantificar, combinando E*Colite, con el producto Coligel que es un agente solidificante que previene la motilidad bacteriana y permite la enumeración de éstas. (10)

También se basa en la detección de dos enzimas: β -galactosidasa, y β -glucuronidasa provenientes de coliformes y *E. coli*.

a) Identificación de coliformes:

El nutriente indicador o sustrato definido es el 5-Bromo-4-cloro-3-Indolil-1- β -D-galactopiranosido (**X-GAL**). Este sustrato es metabolizado por la enzima β -galactosidasa, liberando el grupo cromogénico color azul-verdoso (indolil-azul). (10)

b) Identificación *E. coli*:

Se utiliza el sustrato fluorogénico llamado 4-metil-umbelliferil- β -D-glucurónido (**MUG**) que es hidrolizado por la enzima β -glucuronidasa, liberando el 4-metil-umbelliferona que bajo luz U.V. fluoresce.(10)

2.4.5 CUADRO COMPARATIVO DE MARCAS.

CARACTERÍSTICAS	IDEXX- Colilert	MERCK'S Redycul	CHARM- E*Colite
Tiempo y temperatura de incubación de Coliformes	24 h 35°C	24 h 35°C	28 h 35°C
Tiempo y temperatura de incubación de <i>E. coli</i>	24 h 35°C	24 h 35°C	48 h 35°C
Resultados (+) de coliformes	color amarillo	color azul-verdoso	color azul-verdoso
Resultado (-) de <i>E. coli</i>	color amarillo con fluorescencia bajo U.V.	color azul-verdoso con fluorescencia bajo U.V.	color azul-verdoso con fluorescencia bajo U.V.
Resultados (+) de Enterococos	La muestra de agua fluoresce bajo U.V.	La muestra de agua fluoresce bajo U.V.	No hay prueba
Opción de Cuantificación	Charolas Qanty - tray Charolas Qanty-tray 2000. NMP- en tubos.	Serie de 10 tubos con 10 mL c/u.	Coligel agente solidificante que previene la motilidad.
Opción cualitativa (Presencia/ausencia)	Frascos estériles con tiosulfato	Frascos estériles con tiosulfato	Bolsas estériles con tiosulfato
Aprobaciones Regulatorias.	EPA, AOAC, US Standard Métodos, AWWA, APHA, WEF, IBW	Certificación en la Normatividad de FDA en USA.	EPA

Aprobaciones Gubernamentales	NOM-127-SSA-1994 NOM-180-SSA-1998 NOM-181-SSA-1988	No hay datos.	No hay datos.
Consumo mundial	Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, Japón, New Zeland.	No hay datos.	No hay datos.
Producto para control de calidad	Quanty-Cult. Cepas ATCC	Cepas ATCC	Cepas ATCC
Sensibilidad	1 UFC / 100 mL.	1 UFC/ 100 mL.	1 UFC/ 100 mL.
Equipos de lectura	Lámpara U.V. 366nm	Lámpara U.V. 366nm	Lámpara U.V. 366nm
APLICACIONES	Agua embotellada Agua de proceso Agua residual Agua para la industria lactea y farmacéutica	Agua para beber	Agua superficial Agua para beber

2.5 IDENTIFICACIÓN DE PUNTOS CRÍTICOS EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA GASEOSA DE MANZANA.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO.

El producto es una bebida gaseosa que contiene un 20 % de jugo de manzana, 9.8°Brix y 2.60 volúmenes de CO₂; es pasteurizado y contiene benzoato de sodio como conservador; se presenta en envase de vidrio conteniendo 315 mL; se recomienda tomarlo frío y mantenerlo bajo sombra; la vida de anaquel es de un año; su distribución no requiere de manejo especial, como refrigeración. (11)

El segmento del mercado al cual está dirigido es población en general. Sin embargo, tiene penetración en poblaciones de riesgo, como son niños, ancianos y enfermos.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.

1.- Tratamiento de Agua:

El agua se obtiene de pozos y tomas municipales; se almacena en una cisterna donde se clora a 2 ppm; se pasa a un tanque reactor donde es tratada con cal y sulfato de aluminio para disminuir la alcalinidad; se aumenta la concentración de cloro a 8 ppm por un tiempo de 2 horas. posteriormente se filtra por arena para disminuir sólidos, se purifica por carbón activado para eliminar cloro, olor, sabor y color; finalmente es "pulida" a través de un filtro de 5 micras de diámetro. (11)

2.-Lavado de envase:

Se recibe el envase retornable; pasando por una inspección visual para rechazar botellas con contaminación que no se pueda eliminar, tal como: cera, cemento, pintura y otros; se mete a una máquina lavadora de botellas donde se preenjuaga, seguido de un lavado con sosa cáustica a una concentración de 3-4% y a una temperatura de 60 °C durante 8 min. Nuevamente se preenjuaga con agua a 40 °C y finalmente se enjuaga con agua a temperatura ambiente, con 2 ppm de cloro. (11)

3.-Preparación de Jarabe Simple:

Se recibe el azúcar (sacarosa) en costales de 50 Kg; se mezcla con agua purificada, y se filtra con tierras diatomáceas hasta disminuir turbidez; se agrega fructuosa (azúcar) y se afora con agua purificada hasta 60 ° Brix. (11)

4.- Preparación de Concentrado de Manzana:

Se reciben las manzanas: se lavan con agua purificada y sosa cáustica al 1 % para eliminar plaguicidas; se enjuagan muy bien; se exprimen para obtener el jugo; se concentra el jugo eliminando el agua hasta 70 Brix; se almacena en tanques de acero inoxidable, a 6 °C; se le agrega color caramelo; se pasteuriza a 80 °C por un minuto y se almacena en tambos de plástico a 6 °C. (11)

5.-preparación de Jarabe Crudo:

A 3,200 L de jarabe simple, se le agregan 200 litros de concentrado de manzana y se agita. (11)

6.-Llenado:

La bebida, ya carbonatada, se pasa a la máquina llenadora de botellas, la cual tiene de 30 a 60 válvulas de llenado, una válvula por botella; se ejerce presión de 2.5 Kg/ cm². (11)

7.- Coronado:

Saliendo de la llenadora, la botella con la bebida gaseosa es coronada (corcholata y/o tapa), con un cierre de 1.130". Posteriormente, se codifica dando la fecha de caducidad.(11)

8.- Inspección de Llenado:

Cada botella pasa por un inspector quien revisa que no haya ninguna alteración física en el refresco. Se empaacan y almacenan para su distribución. (11)

9.- Limpieza y Saneamiento:

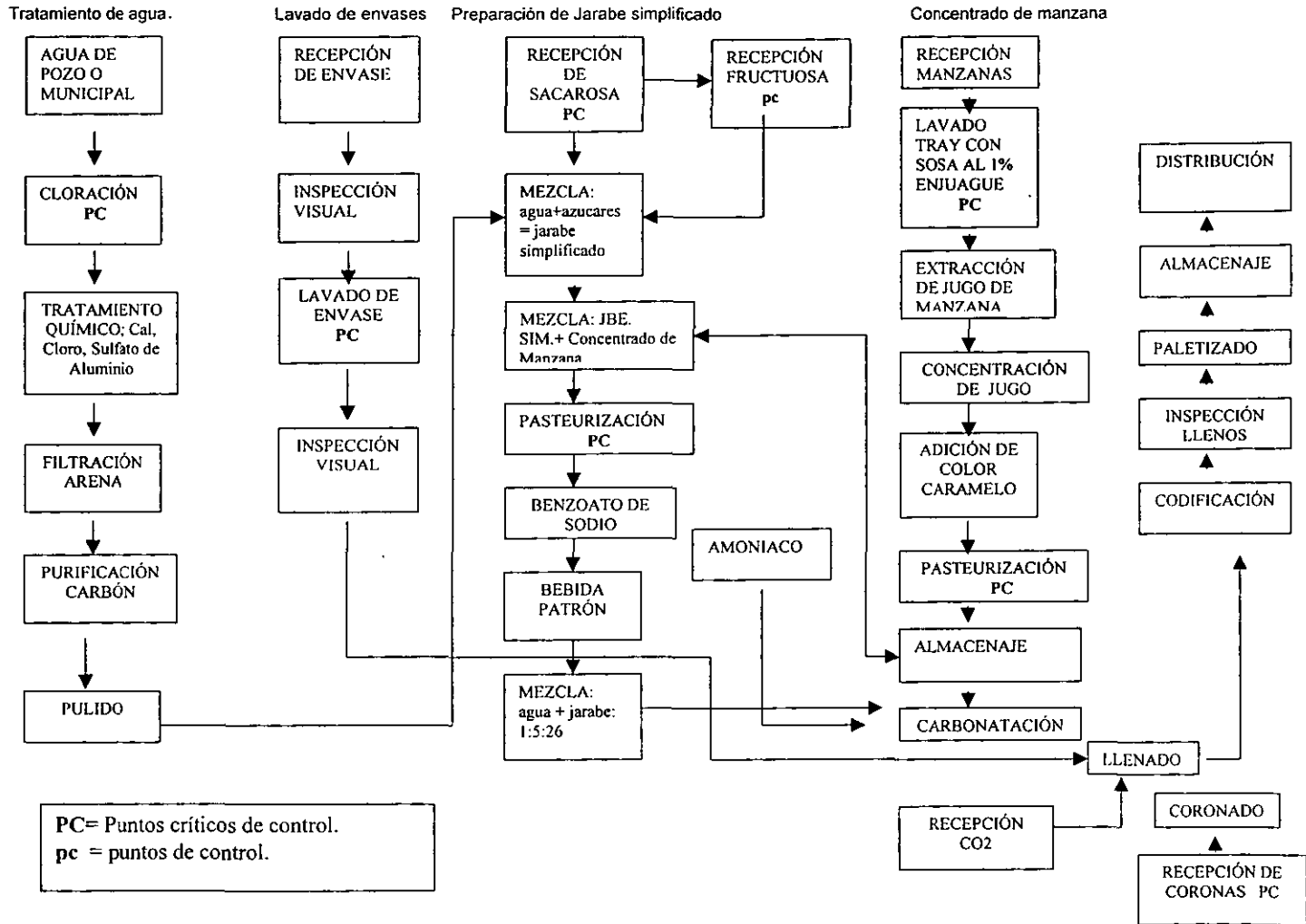
Si hubo cambio de sabor, antes de pasteurizar y embotellar la bebida gaseosa de manzana se somete el equipo a saneamiento por el método de los cinco pasos, en el equipo de pasteurizado y en líneas de embotellado. Si no cambió el sabor, el saneamiento se realiza cada 2 días. El método es como sigue: (11)

- I) Enjuague con agua tratada.
- II) Inundación de los equipos con solución cáustica al 1.5 %, media hora.
- III) Enjuague con agua tratada hasta eliminar la sosa y medir pH.
- IV) Cloración a 50 ppm a temperatura ambiente, media hora.

- V) Enjuague con agua tratada hasta la eliminación del cloro, verificando con orto-toluidina.

A continuación se incluye la descripción del proceso mediante un diagrama de flujo identificando los puntos críticos de control (PC) y los puntos de control (pc) para su monitoreo a la detección de coliformes asegurando así la inocuidad del producto final. Los puntos críticos de control definidos son de suma importancia para eliminar totalmente la presencia de coliformes en el producto final. Los puntos de control son importantes para saber en que condiciones sanitarias se trabaja en el almacén, mejorando a sí las Buenas Prácticas de Manufactura.

2.5.1 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA GASEOSA DE MANZANA EN VASE DE VIDRIO E IDENTIFICACIÓN DE PUNTOS CRÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES.



2.5.2 HOJA DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE RIESGOS E IDENTIFICACIÓN DE PUNTOS CRÍTICOS EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA GASEOSA DE MANZANA.

Peligro: B = Biológico Q = Químico F = Físico

PUNTO DE ORIGEN	PELIGRO	CLASE DE PELIGRO	RIESGO		PUNTO CRÍTICO DE CONTROL
			Grado	Frecuencia	
TRATAMIENTO DE AGUA.					
AGUA	Coliformes fecales. Microorg. Patógenos	B	Alto	Media	Cloración
"	Metales Pesados	Q	Alto	Baja	Tratamiento de Agua
"	Exceso de Sulfato de Aluminio	Q	Alto	Baja	Dosificación
P. Carbón y F. Arena	Pintura Tóxica	Q	Alto	Baja	Recepción
Filtro pulidor	Crecimiento microbiológico en agua estancada por largo tiempo.	B	Bajo	Baja	Drenado
ENVASE					
Botella Retornable	Coliformes fecales. Microorg. Patógenos	B	Alto	Alta	Lavado envases
"	Materiales extraños	F	Alto	Alta	Lavado envases
"	Sustancias Extrañas	Q	Alto	Alta	Lavado envases

PUNTO DE ORIGEN	PELIGRO	CLASE DE PELIGRO	RIESGO		PUNTO CRÍTICO DE CONTROL
			Grado	Frecuencia	
JARABES					
Azúcar (Sacarosa)	Materiales Extraños Insectos, Roedores	F B	Bajo Medio	Baja Media	Recepción.
Fructuosa	Hongos y Levaduras	B	Medio	Baja	Recepción
Concentrado de Manzana	Pesticidas	Q	Alto	Media	Recepción
Jarabe Terminado	Fermentación	B	Alto	Baja	Pasteurización
Manzanas	Plaguicidas	Q	Alto	Alta	Lavar, Tratamiento Químico
Botella Retornable	Coliformes fecales. Microorg. patógenos	B	Alto	Alta	Lavado envases
"	Materiales Extraños	F	Alto	Alta	Lavado envases
"	Sustancias Extrañas	Q	Alto	Alta	Lavado envases
CARBONATACIÓN					
Dióxido de Carbono	Contaminantes Químicos	Q	Bajo	Baja	Recepción.
Alto Volumen de CO ₂ en carbonatación	Explosión de envase en un punto de consumo	F	Alto	Media	Presión y Refrigeración

PUNTO DE ORIGEN	PELIGRO	CLASE DE PELIGRO	RIESGO		PUNTO CRÍTICO DE CONTROL
			Grado	Frecuencia	
LLENADORA					
Aire	Lubricantes	Q	Medio	Baja	Filtrar
Llenado con alto volumen	Vidrios en el producto	F	Alto	Alta	Presión Pistones
Coronado muy ajustado	Vidrio	F	Alto	Media	Cierre coronador
Llenado bajo ajustado	Bacterias	B	Alto	Baja	Buenas prácticas de manufactura
	Grasa	F	Bajo	Baja	Buenas prácticas de manufactura
LIMPIEZA Y SANEAMIENTO					
Líneas de embotellado y Pasteurizados	Bacterias, levaduras	B	Alto	Alta	Saneamiento 5 pasos
	Residuos, Químicos	Q	Alto	Baja	Saneamiento 5 pasos
MANTENIMIENTO					
Mantenimiento	Cabello	F	Bajo	Baja	Buenas prácticas de manufactura
	Contaminación microbiológica	B	Alto	Media	Buenas prácticas de manufactura
Actividades Mantenimiento	Desprendimiento partes del equipo embotellado (tuercas, válvulas)	F	Alto	Baja	Mantenimiento preventivo

PUNTO DE ORIGEN	PELIGRO	CLASE DE PELIGRO	RIESGO		PUNTO CRÍTICO DE CONTROL
			Grado	Frecuencia	
EQUIPOS					
Transportador	Lubricantes	Q	Bajo	Baja	Control Procedimientos
Prácticas de Manufactura	Personal no cumple con prácticas de manufactura	Q F B	Bajo Medio Medio	Baja Baja Baja	Plan de limpieza y saneamiento. Prácticas de manufactura
Fumigación	No usar pesticidas para plantas de alimentos	Q	Alto	Baja	Operación control de pesticidas

3. DISCUSIÓN.

De acuerdo a la información más relevante obtenida en métodos rápidos de análisis para la detección de coliformes, la tecnología de sustrato definido es recomendable en un programa ARICPC para la industria embotelladora de bebidas gaseosas de manzana; en particular la marca con nombre de "Colillert", ya que en comparación con las marcas E*Colite y Readycult, es avalado por más organismos internacionales y nacionales: EPA, IBWA y es aprobado por las Normas Oficiales Mexicanas 180 y 181 de la Secretaría de Salud -1998.

Colillert es más versátil por el hecho de cuantificar en dos formatos; por tubo predispensado o por charolas Quanti-tray, tiene la alternativa del uso de "Colisure"

para muestras coloridas. Además si existe la urgencia de tomar una decisión para liberar los puntos críticos, IDEXX desarrolló "Colilert 18" con el cual se obtienen resultados en 18 horas ó menos.

Sin embargo, E*Colite y Readyult, al igual que Colilert, son las alternativas de uso en la industria embotelladora y su elección será de acuerdo al costo-beneficio que llegue a obtener cada embotelladora.

Por otra parte los puntos críticos en el proceso de embotellar la bebida gaseosa de manzana, en los cuales deben monitorear coliformes, preferentemente por el método mencionado son:

I.-) El tratamiento de agua proveniente del pozo ó red municipal, operando rigurosamente. El muestreo debe hacerse cotidianamente y también cuando se cambien los filtros, de acuerdo a los programas recomendados por el proveedor y establecidos por la empresa.

II.-) El lavado de envases de las botellas retornables de vidrio y botellas retornables para jarabe, se consideran críticos, ya que en ellos se pueden transportar una alta cantidad de coliformes ó patógenos por un mal uso por parte del consumidor, o por posible contacto con roedores.

III.-) La recepción de sacarosa, fructosa y coronas presentan un riesgo de contaminación por almacenaje inadecuado, lo cual puede generar la presencia de plagas (roedores, insectos, etc.) que dañen la calidad sanitaria de los mismos. Es necesario aplicar cuidadosamente las buenas prácticas de manufactura en almacén.

IV.-) El proceso de pasteurización deberá ser controlado en tiempo y temperatura, para evitar que algunos microorganismos indicadores que pudieran estar presentes por otras fuente de contaminación (personal, alguna materia prima, etc.) dañen la salud del consumidor y por ende la marca de la bebida.

V.-) Por último el lavado de las manzanas deberá ser eficiente para eliminar, residuos de heces de aves, roedores e insectos.

La limpieza y saneamiento de las líneas de embotellado y pasteurizado son importantes para crear las bases sólidas de un programa ARICPC. La desviaciones que se lleguen a presentar deben ser corregidas por Buenas Prácticas de Manufactura..

4.- CONCLUSIÓN.

El principal beneficio de la utilización del método de ARICPC es garantizar la calidad sanitaria de los alimentos, se logra mediante el énfasis en la prevención de peligros y no en la corrección de defectos de los productos finales, además de que delega la responsabilidad de la seguridad de los productos a las empresas que los elaboran. (4)

Dentro de este sistema, los métodos rápidos han sido de gran utilidad como la alternativa para obtener resultados confiables y en menos tiempo, especialmente en los puntos críticos de control de las industrias embotelladoras y alimentaria en general.

Estos métodos son muy útiles y de gran uso para obtener resultados oportunos de manera que se logre la prevención de una contaminación evitando así la necesidad de reprocesar por condiciones sanitarias deficientes .

En la aplicación de métodos rápidos se elimina el uso de cajas Petri, medios de cultivo, uso de autoclave por mayor tiempo, material de vidrio, gas y luz; se reduce el tiempo de preparación y realización de las pruebas las cuales, además, pueden ser efectuadas por personal previamente capacitado aunque no tenga muchos conocimientos de microbiología.

Estos métodos son accesible en costo y disponibilidad , ya que en México existen distribuidores autorizados de las marcas.

Por todo ello cual se considera buena elección el uso de estas alternativas de análisis para el control de puntos críticos, en la industria embotelladora.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Norma Oficial Mexicana 180-SSA-1998.

- 2.- Norma Oficial Mexicana 181-SSA-1998.

- 3.- Norma Oficial Mexicana 127-SSA-1994.

- 4.- Secretaría de Salud (1993). Manual de aplicación de análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos. Dirección general de control Sanitario de bienes y Servicios .

- 5.- Brock, T.D. and Madigan M. (1991). Microbiología. 6ª edición. Prentice Hall Hispanoamericana, México.

- 6.- Eaton. A.D., L.S Clesceri, and A. E. Greenberg (1995). (Ed. Board) Standard Methods. For the examination of water and wastewater. 19 th Edition. Publication Office, American Public Health Association, E.U.A.

- 7.- S.C. Edberg, Martín J. Allen & Darrell B. Smith, 1991. Método de Tecnología Definida de Substrato para el Conteo Simultáneo Rápido y Especifico de los Coliformes Totales y *Escherichia coli* del Agua. Journal Association Official Analytical Chemists. Vol 74 (enero/febrero), No. 3

- 8.- www.idexx.com

- 9.- www.merck.com

10.- www.charm.com

11. Curso HACCAP. Impartido por la Q.F.B. Patricia Solís de IDEXX Laboratories. México 1999.

12.- Organización mundial de la Salud Ginebra, 1995. Guías para la calidad del agua potable, 2ª edición . Volumen 1 (Recomendaciones). España.

13.- Información técnica de IDEXX Water Words.

14.- Curso de Microbiología de los Alimentos impartido por el Q.F.B. Guillermo Espíndola Armenta de la Asociación Nacional de Tecnólogos en Alimentos de México, A.C. Mayo del 2000.

Apéndice:

AOAC.	Association of Oficial Analytical Chemist
AWWA.	American Water Works Associaton
FDA.	Food and Drug Administration
IBWA.	International Bottled Water Association
EPA.	Environmental Protection Agency
SSA	Secretaría de Salud Pública y Asistencia
WEF	Water Enviromental Federation
APHA	American Public Health Association