

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA



**“COMPARACIÓN DE MÉTODO PETRIFILM™ CON MÉTODO TRADICIONAL
PARA DETERMINACIÓN DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS EN
ALIMENTOS DE PH BAJO”.**

TESIS

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

PRESENTA

Ilse Lizbeth Márquez Huerta

MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Olga del Carmen Velázquez Madrazo

VOCAL: Profesor: María del Pilar Granada Macías

SECRETARIO: Profesor: Aurora Irma Ortegón Ávila

1er. SUPLENTE: Profesor: Rafael Carlos Marfil Rivera

2° SUPLENTE: Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Olga del Carmen Velázquez Madrazo

SUPERVISOR TÉCNICO:

Francisco E. Solís Aguirre

SUSTENTANTE:

Ilse Lizbeth Márquez Huerta

Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de licenciatura del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM, con apoyo de 3M de México.

Agradecemos al Departamento de Biología y al Cepario de la Facultad de Química, el apoyo brindado para la realización del Proyecto.

Agradecimientos.

He llegado al final de este camino tan largo, de cinco años de esfuerzo, de muchas noches sin dormir, días largos sin comer, demasiado estrés, pero siempre con muchas ganas de continuar, en fin, esto no lo hubiese logrado sin mis padres. Gracias mamá por trabajar tanto y hacer un gran esfuerzo para que tu hija pudiera estudiar y así terminar una carrera, nunca me dijiste que no cuando preguntaba por un libro nuevo o una bata nueva, siempre al pendiente de que me hacía falta para continuar y sobre todo a enseñarme a tener esa seguridad en mí misma que me caracteriza. A mi papá por estar ahí como un buen soporte, por convencerme que yo podía lograr esto y más, pues en el momento que pensé abandonar mi carrera él fue quien me hizo ver que yo soy una mujer de retos y no podía dejar mi pasión por unas cuantas materias que obstaculizaban. A los dos, mil gracias porque me han enseñado a confiar en mí y me han apoyado en cada decisión que he tomado para mi vida, son mis dos grandes pilares que admiro, quiero y respeto.

A mis hermanos, Desirée gracias por tu paciencia y ayuda siempre al pendiente de tu hermana la “rara”, Toñito mi hermanito pequeño que quiero tanto, y Luis mi hermano mayor que se siente orgulloso de mí y yo de él, saben que aunque somos muy diferentes somos complementarios y los adoro, son excelentes personas.

A mi esposo Pierre Patyn, te elegí a ti para ser mi compañero de vida porque eres un ser maravilloso que me llena de amor y que siempre está orgulloso de mí y le presume a la gente que tiene una esposa “química”. Ese valor que él me ha dado nadie más lo puede hacer mejor, cada logro lo celebra como si fuera de él y cada tropiezo lo comparte y hace que el dolor sea menos. Gracias por soportar jornadas muy pesadas de laboratorio, por compartir y entender mis pasiones, por tener ese espíritu aventurero y andar conmigo de “mochilazo” por el mundo y por disfrutar la vida en el mismo camino que yo ando.

No se me pueden olvidar mis amigos pues sin ellos la vida no sería tan divertida. Alonso mi hermano y pieza de dominó, mi mejor amigo y cómplice.

Marisol mi gran amiga, tantos años y tantas risas, no se me olvidan tantas aventuras. Victoria sin ti mi etapa más depresiva hubiera estado peor, a las dos gracias por tres años de preparatoria perfectos. Aria mi amiguita siempre preocupada y orgullosa de mí, tan atenta como solo ella sabe. Héctor sin ti no estaría viva te perdono y te recuerdo con cariño. Luis Ángel “marasmo” mi gran equipo, desde que nos unimos nunca más volvimos a reprobar una materia, sin tu ayuda hubiera estado más difícil. Chio tus risas fueron un gran alivio en especial durante el último año de la carrera; a los dos gracias por ese súper equipo 21 de LABTEC. “Maldito Pantera” Pedro que bueno fue habernos reencontrado en la carrera. A mi protector, mi amigo que solo se adelantó en el camino pero que siempre me ha cuidado tanto y dejó una huella en mi corazón imborrable.

También quiero agradecer a mi tutora Olga por tener tanta paciencia y explicarme cada cosa que no entendía, apoyarme con el material y sobre todo por darme palmadas de aliento en momentos donde la investigación se “atoraba” un poco.

Por último agradezco a mi persona porque tanto esfuerzo, trabajo y estrés, mi objetivo no lo hubiese cumplido sin esa capacidad de disfrutar metas altas que suelo colocar en mi vida.

Índice.

	página
Resumen	1
Capítulo 1. Marco Teórico	
1.1 Inocuidad Alimentaria	2
1.2. Análisis Microbiológico de Alimentos	3
1.2.1. Microorganismos Indicadores	4
1.3. Recuento de colonias totales	5
1.3.1. Mesófilos aerobios (o cuenta total)	6
1.3.2. Cuenta de Coliformes Totales	6
1.3.3. Cuenta de Hongos y Levaduras	7
1.4. Inclinación actual de los Métodos usados para Análisis Microbiológico en la Industria Alimentaria.	8
1.5. Método Placas Petrifilm™	10
1.6. Validación de un método	10
1.7. Análisis Estadístico <i>t de Student</i>	11
Capítulo 2. Objetivos	
2.1 Objetivo general	13
2.2 Objetivos Particulares	13
Capítulo 3. Hipótesis	14
Capítulo 4. Metodología	
4.1. Estandarización de Cepas.	15
4.2. Caracterización de los productos comerciales utilizados	17
4.3 Análisis con poblaciones microbianas conocidas	
4.3.1 Mesófilos aerobios y coliformes totales	18
4.3.2 Hongos y Levaduras	21
4.4 Inhibición bacteriana	23

Capítulo 5. Resultados y Discusión	
5.1. Primera Etapa: Caracterización de Productos	24
5.2. Segunda Etapa: Estandarización de Cepas	28
5.3. Tercera Etapa: Validación del método	32
5.3.1. <i>Aqua-Frut</i> sabor uva	33
5.3.2. Jugo de Naranja <i>Natula'es</i>	38
5.3.3. <i>PetiZoo</i> sabor mora azul	42
5.3.4. Yogur bebible de Fresa	46
5.3.5. Yogur de Fresa	49
5.3.6 Resumen del análisis estadístico de la Validación	52
5.4 Inhibición microbiana	53
Capítulo 6. Análisis de Resultados	56
Capítulo 7. Conclusiones	58
Capítulo 8. Propuestas a futuro	59
Bibliografía	60
Anexo I. Definiciones Estadísticas	63
Anexo II. Normas	65
Anexo III. Composición de medios de cultivo	67
Anexo IV. Neutralización de los Productos LALA	70
Anexo V. Ejemplo de Cálculo para el Conteo de Esporas de la cepa <i>Penicillium</i> sp.	71
Anexo VI. Datos para elaborar gráficas 2 y 3	72

RESUMEN.

El objetivo del proyecto es comparar el análisis microbiológico en alimentos fermentados y bebidas utilizando las placas Petrifilm™ con los métodos tradicionales que describen las normas para dichos alimentos; con lo cual se desea validar el método con las placas Petrifilm™.

Se compararon las determinaciones de los indicadores especificados en las NOM's 092 para mesófilos aerobios, 113 para coliformes totales y 111 para hongos y levaduras. Primero se caracterizaron los alimentos en cuestión: yogur líquido sabor fresa, yogur sólido sabor fresa, *petit suiss* sabor mora, jugo de naranja pasteurizado, bebida sabor uva, todos de la familia LALA para conocer su calidad microbiológica, como punto de partida y optimizar los detalles operativos para las determinaciones.

A continuación, se estandarizaron cepas de microorganismos para utilizarlos en la inoculación de muestras y determinar la eficiencia de ambos métodos, comparativamente. Se utilizaron cepas de: *Escherichia coli* y *Staphylococcus* sp. para la determinación de mesófilos aerobios; *Escherichia coli* para la determinación de coliformes; *Penicillium* sp. para la determinación de hongos y *Saccharomyces cerevisiae* para levaduras.

La última etapa fue la validación, donde se analizaron treinta muestras de cada producto por duplicado, para determinar: mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras. Finalmente, se hizo el tratamiento estadístico de los datos con lo cual se concluyó sobre los métodos tradicionales y Petrifilm™, aplicados a la determinación de los indicadores microbiológicos mencionados, en estos alimentos.

Capítulo 1. Marco Teórico.

COMPARACIÓN DE MÉTODO PETRIFILM™ CON MÉTODO TRADICIONAL PARA DETERMINACIÓN DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS DE PH BAJO.

1.1 Inocuidad Alimentaria.

El *Codex Alimentarius* es el código que reglamenta sobre la calidad e inocuidad de los alimentos y tiene aceptación global; establece que un alimento se considera contaminado cuando contiene: agentes vivos (bacterias, virus o parásitos riesgosos para la salud); sustancias químicas tóxicas u orgánicas, extrañas a su composición normal y componentes naturales tóxicos en concentraciones mayores a las permitidas. La Inocuidad Alimentaria (IA) es el atributo de los alimentos a través del cual se garantiza que no causan daño alguno ni pongan en riesgo la salud de los consumidores. (PANAFTOSA, 2010). Los mensajes básicos de la Organización Mundial de la Salud para la inocuidad alimentaria son “mantener la limpieza, separar alimentos crudos y cocinados, cocinar completamente, mantener los alimentos a temperaturas de refrigeración y usar agua y materias primas libres de contaminantes, por lo que la inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima sanidad posible de los alimentos, las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo” (OMS, 2007).

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

A continuación se presentan tres principios generales que se están relacionados con el problema de la sanidad e inocuidad de los alimentos:

- a) Un alimento que contenga cantidades de organismos patógenos peligrosamente elevadas o niveles clínicamente importantes de toxinas microbianas puede parecer perfectamente salubre para el consumidor porque su aspecto, su sabor y olor son normales.
- b) Las medidas eficaces que impiden el crecimiento de microorganismos, como la refrigeración a temperaturas inferiores a 3°C, no necesariamente controlarán la alteración microbiana de los alimentos ni a todos los microorganismos patógenos.
- c) La inhibición de los patógenos cuando se impide la alteración, por lo general se consigue, especialmente cuando para ello se utilizan métodos adecuados de refrigeración, desecado, acidificación, etc. Sin embargo, estas medidas no necesariamente eliminarán a los microorganismos patógenos, de modo que en algunos casos tales alimentos pueden seguir siendo fuentes de contaminación peligrosa (Mossel, 2003).

1.2. Análisis Microbiológico de Alimentos.

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

La prevención está en evitar la manufactura con materias primas de baja calidad microbiológica, determinar la eficiencia y eficacia de los procesos aplicados para el control de microorganismos, mantener bajo control los procesos de elaboración y la optimización de sus resultados; y no en comprobar la calidad microbiológica de los productos ya elaborados.

El análisis del riesgo consiste en determinar el peligro para la salud humana de un agente patógeno presente en un alimento, y cómo puede reducirse ese riesgo hasta valores aceptables que sean seguros, por medios

tecnológicos. Este riesgo depende de la DMI (Dosis Mínima Infección) del microorganismo y de los valores del mismo que se encuentren en el alimento; así mismo hay que valorar la carga inicial de microorganismos en cada una de las raciones del alimento, y el número de raciones o partes consumidas por la población en un determinado tiempo. (Universidad de Navarra, España 2010).

1.2.1. Microorganismos Indicadores.

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

Un microorganismo indicador también es aquel cuyo número proporciona un tratamiento inadecuado o una contaminación posterior del alimento analizado, por ejemplo: *E. coli* y *Cl. perfringens* deben desaparecer durante la cocción de un alimento o la cloración del agua; si permanecen en el alimento procesado, se dice que el proceso fue insuficiente para eliminar la carga microbiana, o que se contaminó nuevamente después del proceso (De la Cruz, 2004).

Actualmente hay una gama de métodos para la determinación indicadores y también de patógenos en el área de alimentos; sin embargo, los microorganismos indicadores tienen gran aceptación por la facilidad para las determinaciones y por el margen de seguridad que se tiene si se actúa a partir del hallazgo de éstos (De la Cruz, 2004).

La clasificación de los principales indicadores en el análisis microbiológico de alimentos según su función es la siguiente::

1. Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso:
 - a. mesófilos aerobios (o cuenta total)
 - b. cuenta de hongos y levaduras

c. cuenta de coliformes totales

2. Indicadores de contaminación fecal:

a. *coliformes fecales* (o grupo *coli-aerogenes*)

b. *E. coli*

c. *enterococos*.

d. *Cl. perfringens*

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

1.3. Recuento de Colonias Totales.

Una de las técnicas para determinar el nivel de contaminación o población microbiana en un alimento, es el recuento de microorganismos en placa. Se reporta en: “unidades formadoras de colonias” por gramo de alimento ó ufc/g, obtenidas bajo las condiciones óptimas de cultivo. Estos recuentos pueden servir de criterios marcadores porque revelan el grado de colonización que ha tenido lugar hasta el momento del muestreo (Mossel, 2003).

Los siguientes apartados en este capítulo muestran algunos métodos para la detección de microorganismos indicadores, ilustran los métodos más utilizados en industria alimentaria.

1.3.1. Mesófilos aerobios (o cuenta total).

En el recuento de microorganismos aerobios se estima la microbiota bacteriana total pero sin especificar el tipo de microorganismo involucrado. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma en que fueron manipulados durante su procesamiento.

El significado de esta prueba puede relacionarse con materia prima excesivamente contaminada, deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos y con la posibilidad de que haya microorganismos patógenos; y los altos recuentos pueden ser signo de inmediata alteración del producto (Pascual, 2000). El método más comúnmente utilizado es el de placas vertidas, utilizando agar cuenta estándar que se agrega fundido y a 45°C a las placas con el inóculo, las cuales se homogenizan y se incuban 48 h a 37°C (Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994).

1.3.2. Cuenta de Coliformes Totales

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

Su determinación se basa generalmente en la capacidad de fermentar lactosa. Se pueden utilizar los métodos del número más probable (NMP ó MPN por sus siglas en inglés) que es un método estadístico en tres etapas y permite el hallazgo de cantidades muy bajas de coliformes. También se pueden detectar por cuenta en placa, utilizando agar bilis-rojo violeta (ABRV ó RVBA por sus siglas en inglés) en el cual las colonias fermentadoras de lactosa causan el vire del indicador. Los coliformes también pueden detectarse por filtración en membrana (Millipore) e incubación en medios adecuados, por métodos rápidos como Petrifilm y mediante reacciones cromogénicas o fluorogénicas que tienen la ventaja de ser altamente específicas. (Camacho y cols, 2010)

1.3.3. Cuenta de Hongos y Levaduras.

Los hongos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la microbiota normal de un alimento, o como agentes contaminantes provenientes, por ejemplo, de los equipos inadecuadamente sanitizados; cuando están presentes, los hongos y levaduras pueden provocar el deterioro fisicoquímico de los alimentos, debido a que utilizan en su metabolismo carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos, originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados (NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994).

Pertenecen a grupos taxonómicos muy diversos; cuando han crecido lo suficiente, se pueden observar a simple vista pero producen estructuras diminutas, reproductoras y vegetativas que no es posible estudiar sin ayuda de un microscopio (Pascual, 2000).

Las levaduras son hongos que crecen generalmente en forma de células independientes, que pueden ser globulosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. Cuando crecen en medios sólidos forman colonias de aspecto característico que recuerdan a las colonias bacterianas (Pascual, 2000).

La utilización de hongos y levaduras como indicador, es muy importante en la industria alimentaria pues permite poner de manifiesto prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.

Se determinan mediante siembra del alimento o sus diluciones, en agar papa dextrosa acidificado, vertiéndolo en placas con el inóculo e incubando 72 h para levaduras y de 5 a 7 días para hongos a 28°C (NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994).

1.4. Inclinación actual de los Métodos usados para Análisis Microbiológico en la Industria Alimentaria.

Los análisis microbiológicos tradicionales son, por todo lo mencionado, de gran importancia en la industria alimentaria, para tomar decisiones sobre materias primas en diferentes etapas de proceso; la inocuidad de los alimentos producidos en la industria depende en buena medida de las cargas microbianas de materias primas y de la eficiencia de los procesos, que se determinan a través de los análisis mencionados. Pero una de sus desventajas es que son métodos laboriosos y que la obtención de resultados es lenta: 24 horas como mínimo y hasta 7 días, por ejemplo para hongos. De ahí que la industria tenga una creciente necesidad de métodos rápidos de análisis, tanto para el control de especificaciones reglamentarias de alimentos (incluidas en la ley y que por lo tanto, son de observancia obligatoria), como para los procesos internos de control y de mejora continua. (Chordi, 2011).

Los “métodos rápidos” son aquellos destinados a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. El desarrollo de métodos rápidos y automatizados constituye un área de la microbiología aplicada muy dinámica y en continua evolución (Leotta, 2009).

A continuación se presenta un resumen de los principales métodos rápidos hasta ahora desarrollados.

- Sistemas de muestreo de superficie: hisopos (PathCheck, ProTec, etc.), placas de contacto RODAC, laminocultivos, muestreadores de aire.
- Sistemas de recuento y/o estimación de viables y microorganismos indicadores: Petrifilm, NeoGrid, Simplate, Colitrack, etc.
- Sistemas basados en técnicas específicas:
 - eléctricas (Bactometer, Malthus, Bactrace, RABIT),
 - colorimétricas (BactAlert, Omnispect, BioSys, Microfoss),
 - microscópicas (epifluorescencia directa),

- citometría de flujo (D-Count, Bactiflow, Chemscan RDI, BactoCount) y
 - sistemas de estimación de ATP mediante bioluminiscencia.
- Sistemas miniaturizados y/o automatizados de identificación bioquímica: Enterotube, API, BBL Crystal, microID, RapID, etc.
- Medios cromogénicos y fluorogénicos para el recuento y/o aislamiento de coliformes, *Escherichia coli*, Enterococos, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, etc.
- Métodos inmunológicos: aglutinación con látex (pasiva y pasiva inversa), inmunocromatografía, inmunoensayos enzimáticos (ELISA, EIA, entre otros), así como inmunofluorescencia. Formatos especiales: inmunocrecimiento (sistema Unique), inmunobanda (1-2 test), inmunocaptura (Dynabeads, Pathatrix) y sistemas inmunológicos combinados con moleculares (PCR-ELISA, Inmuno-PCR).
- Métodos genotípicos basados en hibridación de ácidos nucleicos (GenQuence, sistema VIT, Accuprobe, entre otros) y microarrays (FoodExpert). Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos: PCR (Bactotype por ejemplo), PCR en tiempo real (sistema A-BAX, iQ-Check, TaqMan detection kits, LightCycler kits, etc.), NASBA (NucliSens EasyQ Enterovirus) y genotipado de cepas (Riboprinter).
- Biosensores de distintos tipos de detección: biosensores catalíticos que detectan enzimas, células, organelos celulares, tejidos; y biosensores por afinidad que detectan anticuerpos, receptores, lecitinas, ácidos nucleicos y moléculas biomédicas (Chordi, 2011)

Muchos de estos métodos tienen el cumplimiento de la regulación en países específicos, desde que salen a la venta; otros los van desarrollando a través de validaciones y/o acreditaciones por organismos oficiales, como la AOAC (*Association of Analytical Communities*), AFNOR (*Association Française de Normalisation*, entre otros) (Chordi, 2011).

1.5. Método Placas Petrifilm™.

Las Placas Petrifilm™ de 3M™ cuentan con un diseño que consiste en una película plástica cubierta de nutrientes y agentes gelificantes que solidifican en frío y se formulan siguiendo la composición de los medios de cultivo de los métodos oficiales (3M, 2010).

El empleo de placas Petrifilm ayuda a incrementar la eficiencia del laboratorio ya que ayuda a maximizar la productividad de la planta; por su óptima estandarización hacen más confiables y reproducibles los procesos de pruebas, reduciendo variaciones entre turnos, plantas e incluso analistas. Su utilización permite reducir el número de horas necesarias para las pruebas microbiológicas, lo que lleva a la reducción de costos en general. Los resultados obtenidos son consistentes y fáciles de leer, minimizando la posibilidad de error de los métodos convencionales.

Petrifilm produce una variedad de placas para diferentes pruebas microbiológicas, que permiten atender múltiples necesidades.

Una ventaja adicional de su es que se dispone de más tiempo para monitorear los puntos críticos de control con mayor frecuencia. El resultado final es un mejor control del proceso y un producto de alta calidad (3M, 2010).

1.6. Validación de un método.

La validación es la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto (ISO 17025, 2006).

El laboratorio microbiológico tiene la responsabilidad de garantizar que los resultados que son exactos, válidos y confiables, de modo de proporcionar información útil acerca de la inocuidad y calidad sanitaria de los alimentos. Es necesario validar un método para conocer el comportamiento del mismo (Cuesta, 2006).

La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión. La validación incluye La especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, una verificación de que se pueden cumplir los requisitos al usar el método, una declaración de su validez. (Hirata, 2006).

La validación de un método frente a otro, requiere que se compruebe que la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión y la exactitud del método original no presentan diferencias significativas. Desde luego, también es importante que el laboratorio domine el ensayo y lo utilice correctamente. (Barenbuem, 2003)

1.7. Análisis Estadístico. La prueba “t de Student”.

El análisis estadístico es indispensable en este estudio ya que es necesario comprobar la dispersión de los datos y así hay diferencias entre el método tradicional y el método Petrifilm, la prueba más adecuada para determinar lo anterior es la “t de Student”, la cual parte de la consideración de que los datos por analizar pertenecen a una población, datos continuos y no discretos. Los cálculos que involucran la prueba incluyen estadísticos poblacionales como la media y la desviación estándar.

La prueba t de Student permite determinar si las medias y desviaciones estándar de muestras relativamente pequeñas, corresponden a los datos “reales” de la población y nos indica si las diferencias encontradas pueden declararse como significativas, con cierto nivel de confiabilidad (Pedrero, 1989).

Existen tres tipos de pruebas:

- a) Cuando se utiliza la prueba estadística t de Student para analizar una sola muestra, es necesario conocer los datos de la población para determinar si efectivamente dicha muestra pertenece o no a esa población.
- b) Muestras relacionadas: Se le llama así cuando las muestras han sido analizadas por un mismo juez o si el número de observaciones para cada muestra son iguales (pares). El propósito de esta prueba es

comparar dos medias, las cuales provienen de dos muestras al azar de la misma población. Éste es el tipo de prueba que corresponde a este estudio.

- c) Muestras independientes: esta prueba tiene como objetivo comparar dos muestras que han sido analizadas, por ejemplo por dos grupos diferentes o por un número diferente de jueces, o incluso en tiempos diferentes de análisis. (Pedrero, 1989)

Capítulo 2. Objetivo.

Objetivo general.

- Validar las placas Petrifilm™ para la determinación de indicadores microbiológicos en matrices de alimentos con pH bajo, producidos en México: lácteos fermentados, jugo de naranja y una bebida saborizada.

Objetivos Particulares.

- Estandarizar y optimizar el método de prueba Petrifilm™ para la determinación de indicadores microbiológicos en bebidas fermentadas, jugos y bebidas saborizadas hechas en México.
- Establecer una metodología correcta para que el analista la utilice.
- Conocer las limitaciones y ventajas del método de prueba Petrifilm™ para la optimización del mismo.

Capítulo 3. Hipótesis.

El método Petrifilm™ en comparación con los métodos tradicionales que las Normas mexicanas 092,113 y 111 indican para en análisis microbiológico de mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras en alimentos con pH bajo, yogur líquido sabor fresa, yogur sólido sabor fresa, jugo de naranja y bebida sabor uva, productos de la familia LALA; deben tener una mayor repetibilidad, menor variación, mayor sensibilidad y mayor reproducibilidad de datos en el análisis microbiológico basándonos en los datos estadísticos, con el propósito de validarlo, obteniendo ventajas de tiempo y metodología.

Capítulo 4. Metodología.

4.1. Estandarización de Cepas.

Se utilizaron cepas proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química de la UNAM, para inocular las matrices bajo estudio y determinar la recuperación de poblaciones microbianas conocidas, por ambos métodos. Las cepas utilizadas fueron: *Escherichia coli* (ATCC-1122) y *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538) para la determinación de mesófilos aerobios; la misma cepa de *Escherichia coli* para la determinación de coliformes; *Penicillium* sp. (CFQ-H-75) y *Saccharomyces cerevisiae* (CFQ-L-25) para la determinación de hongos y levaduras, respectivamente.

Para la estandarización de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se utilizaron cultivos de 24 h, sembrados en caldo BHI; se elaboraron diluciones decimales en solución salina isotónica (SSI) hasta 10^{-10} , manipuladas en condiciones de asepsia y siempre mezclando en vórtex. Se determinó la densidad óptica de cada dilución en Densimat de *BioMerieux*, colocando 3 mL en tubos de 75x100 con tapón de rosca y mezclado en vórtex. Para estandarizar *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó caldo Sabouraud y se procedió con la misma metodología mencionada anteriormente.

A continuación se sembró por triplicado, un inóculo de 1 mL de las diluciones 10^{-5} hasta 10^{-10} , en placas Petrifilm™ AC (para mesófilos aerobios) y en placas Petrifilm™ YM (para hongos y levaduras) la cepa *Saccharomyces cerevisiae*. Se incubaron durante 48 h a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para mesófilos y coliformes y a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ para levaduras y hongos; se determinaron UFC/mL (figura 1.)

Figura 1. Manejo de placas Petrifilm para inoculación de muestras.



Con estos datos, se relacionó densidad óptica con UFC/mL de cada cepa y se construyeron gráficas, se obtuvo la ecuación de la recta y se utilizaron para calcular en los siguientes experimentos, la cantidad de cultivo necesario para inocular las matrices a analizar (figura 3).

Para estandarizar la cepa de *Penicillium sp* se utilizó el método de recuento microscópico directo. Para ello se incubaron las cepas por 7 días en agar papa dextrosa a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta esporulación; se agregaron 10 mL de SSI sobre el cultivo y se raspó suavemente la superficie, con la punta de la pipeta, para obtener la mayor cantidad posible de esporas en la suspensión; se colecta ésta en tubo de 16x150 mm con tapón de rosca, se homogeniza en vórtex y se hace una dilución 1:10. Se transfieren 50 μL de cada una a un portaobjetos y se coloca un cubreobjetos, cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. Se hace la cuenta de esporas por campo, como mínimo 10 campos para obtener un promedio y se calcula el número de esporas en la suspensión, a partir de la superficie de la preparación, la superficie del campo y el volumen utilizado (ver ejemplo de cálculo en el anexo V).

4.2. Caracterización de los productos comerciales utilizados.

Con el propósito de determinar la carga microbiana inicial y la conformidad con las especificaciones microbiológicas establecidas en las NOM's aplicables, primero se realizó una caracterización de cada producto comercial empleado; analizando dos unidades de prueba de cada uno, analizando las determinaciones: mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos y levaduras, por ambos métodos: tradicional y Petrifilm™.

Se realizaron las diluciones, conforme a lo descrito en la NOM-110-SSA1-1994. Para los productos sólidos: yogur de fresa y *petit suiss* sabor mora, se pesan 10 g y se colocan en un frasco de 125 mL con tapón de rosca el cual contiene 90 mL de SSI, con el fin de tener una dilución 1:10.

Para los productos líquidos: yogur bebible de fresa y jugo de naranja pasteurizado, se hace una dilución 1:10 tomando 1 mL de producto y colocándolo en tubos 16x150 mm con tapón de rosca con 9 mL de SSI, dilución 1:10.

Para las determinaciones de mesófilos aerobios y de coliformes totales, se ajustó el pH a 6.5 – 7.5 agregando NaOH estéril 1 N, como indica la tabla 1 en el anexo IV y se verifica el resultado con tiras de papel pH Merck 1.09533.0001. En el caso de *AquaFrut* hay un fuerte efecto amortiguador, de manera que aunque se ajustara el pH con NaOH, en sólo 2 horas de incubación, regresaba a pH 4. Se hicieron varias pruebas para resolver este problema, ya que el ajuste del pH es muy importante para la interpretación de resultados, especialmente en las placas de Petrifilm™AC para mesófilos aerobios. Se resolvió haciendo la dilución 1:10 directamente en 9 mL de buffer de fosfatos pH 7, con lo cual se ajusta el pH automáticamente y se mantiene durante el análisis, de manera que se pueden interpretar adecuadamente.

Para la determinación de hongos y levaduras no es necesario ajustar el pH, ya que en el método tradicional la selectividad se logra precisamente por el pH ácido, y en el método Petrifilm, el indicador no es afectado por valores bajos de pH.

Para determinar mesófilos aerobios, se transfirieron por duplicado analitos de 1 mL de cada dilución, a las placas Petrifilm™ AC. Para la determinación de coliformes totales, se inocularon por duplicado, placas Petrifilm™ CC con 1 mL. Paralelamente se inocularon por duplicado, cajas Petri estériles para las determinaciones por método tradicional. Para mesófilos aerobios se usó agar cuenta estándar (NOM-092-SSA1-1994) y para coliformes totales, agar bilis rojo violeta con sobrecapa (NOM-113-SSA1-1994).

Tanto las placas Petrifilm™ como las cajas Petri se incuban por 48 h a $37 \pm 2^\circ\text{C}$; las cajas Petri se incuban de forma invertida, y se apilan máximo 10 cajas, las placas Petrifilm™ se sugiere incubar dentro de sobres debido a que las placas tienen una cubierta que se puede abrir fácilmente con la manipulación provocando la contaminación del análisis, se recomienda no apilar más 20 placas por sobre.

Para la determinación de hongos y levaduras, se tomó 1 mL de cada dilución y se inocularon por duplicado en placas Petrifilm™ YM y en cajas Petri. A las cajas Petri se le agregan de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico justo antes de verter (NOM-111-SSA1-1994), homogenizar y dejar solidificar.

Las placas se incuban a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 72 h para la cuantificación de levaduras y por 5 días para hongos.

4.3 Análisis con poblaciones microbianas conocidas.

4.3.1 Mesófilos aerobios y coliformes totales.

Para las determinaciones de indicadores bacterianos: mesófilos aerobios y coliformes totales, se utilizó una mezcla de *Escherichia coli* (ATCC-1122) y *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), cultivados por separado, en caldo BHI durante 24 h a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Se hicieron diluciones 1:5 en SSI, en tubos 75x100 mm con tapón de rosca, mezclado con vórtex y se midió densidad óptica en Densimat *BioMerieux*. En caso necesario se hicieron más diluciones, hasta obtener una

lectura en el rango de sensibilidad del Densimat, utilizando las gráficas previamente elaboradas, se calculó el volumen de cultivo necesario para inocular entre 50 y 100 UFC/mL de cada cepa a la dilución 10^{-1} , de cada unidad de prueba ensayada. Para la prueba final, se utilizaron 30 muestras de cada producto bajo estudio y se inocularon como se ha descrito; en cada caso se homogenizó en vórtex. A partir de la dilución 10^{-1} inoculada, se procedió a hacer el análisis igual que en lo descrito en el apartado 4.2.

Para determinar mesófilos aerobios, se transfirieron alícuotas por duplicado de 1 mL de las diluciones, a las placas Petrifilm™ AC. Para la determinación de coliformes totales, se inocularon por duplicado, placas Petrifilm™ CC con 1 mL. Paralelamente para las determinaciones por método tradicional se inocularon por duplicado, cajas Petri estériles. Para mesófilos aerobios se usó agar cuenta estándar y para el grupo coliforme total, agar bilis rojo violeta con sobrecapa.

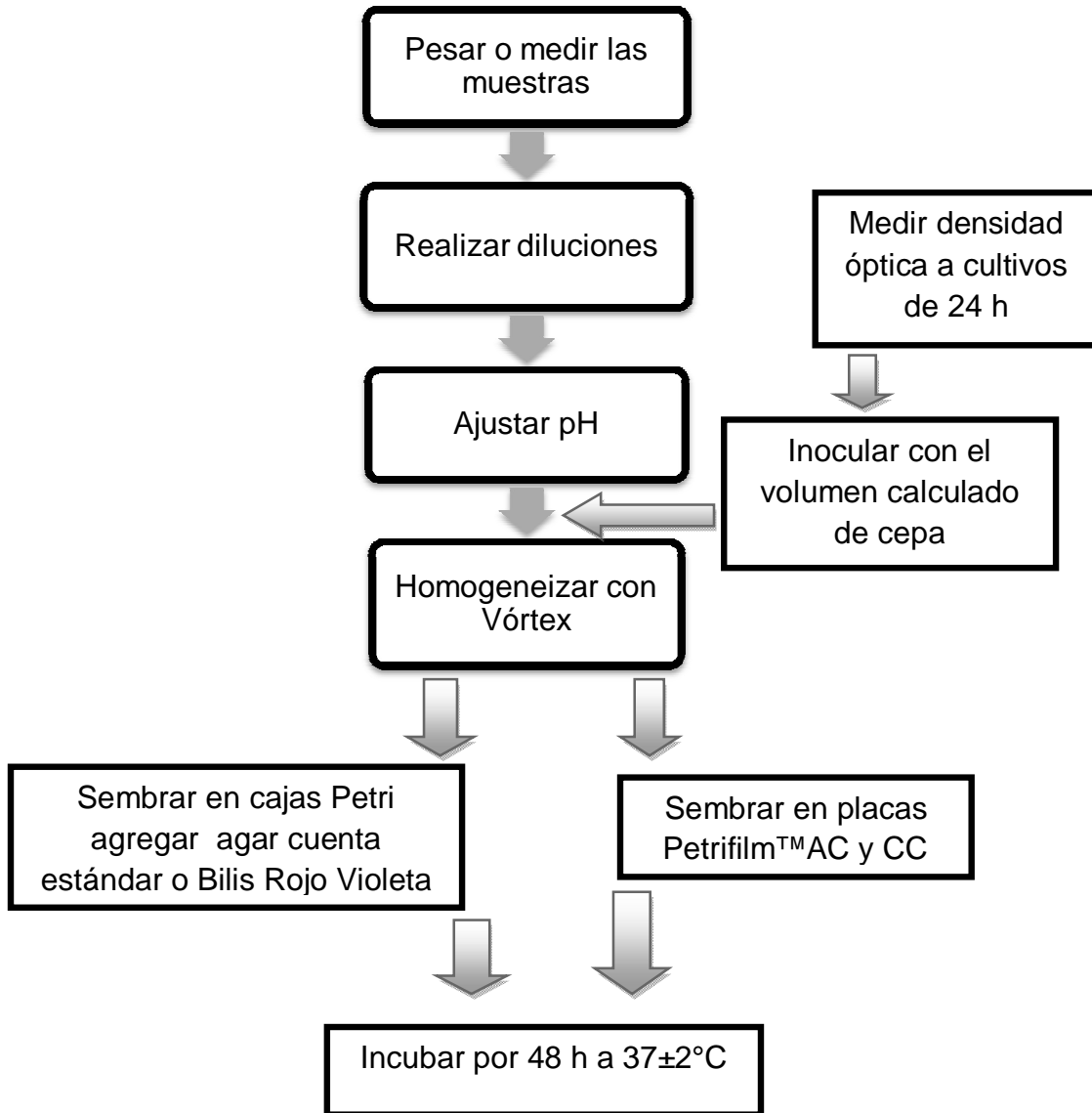
Tanto las placas Petrifilm™ como las cajas Petri se incuban por 48 h a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Las cajas Petri se incuban de forma invertida, y se apilan en máximo 10 cajas. Las placas Petrifilm™ se incuban en no más de 20 placas por sobre.

En todos los casos se incluyeron:

- controles (inoculando la misma cantidad de cultivos en SSI y sembrando por duplicado en todos los medios de cultivo propuestos), para descartar efecto de la matriz sobre el inóculo,
- blancos en los cuales se inoculó la dilución del alimento antes de inocularlo, en todos los medios de cultivo utilizados, para determinar carga original y
- medio de cultivo sin muestra y sin inóculo, como control de esterilidad.
- Una placa Petrifilm™ de cada tipo, con 1 mL de la unidad de prueba sin inocular, la cual se refrigeró durante el tiempo de incubación para cada grupo microbiano ensayado, para tener una referencia del aspecto de las partículas de alimento en la placa.

- Blanco de producto de producto. Unidad de prueba sin inocular.

Figura 2. Diagrama de bloques para el análisis microbiológico de mesófilos aerobios y coliformes totales por método tradicional y método Petrifilm™



4.3.2 Hongos y Levaduras

Las diluciones se prepararon de igual forma a lo descrito en el apartado 4.2.

Para inocular las diluciones se utilizaron los microorganismos *Penicillium* sp. (CFQ-H-75) y *Saccharomyces cerevisiae* (CFQ-L-25), ambos proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. *Saccharomyces cerevisiae* se cultivó durante 48 h en caldo Sabouraud, se diluyó 1:5 con SSI en un tubo de 75x100 mm con tapón de rosca, mezclar con el vórtex, medir la densidad óptica en Densimat de *bioMerieux*. Se hicieron los cálculos necesarios para inocular aproximadamente 25 UFC/mL en las diluciones de cada unidad de prueba ensayada.

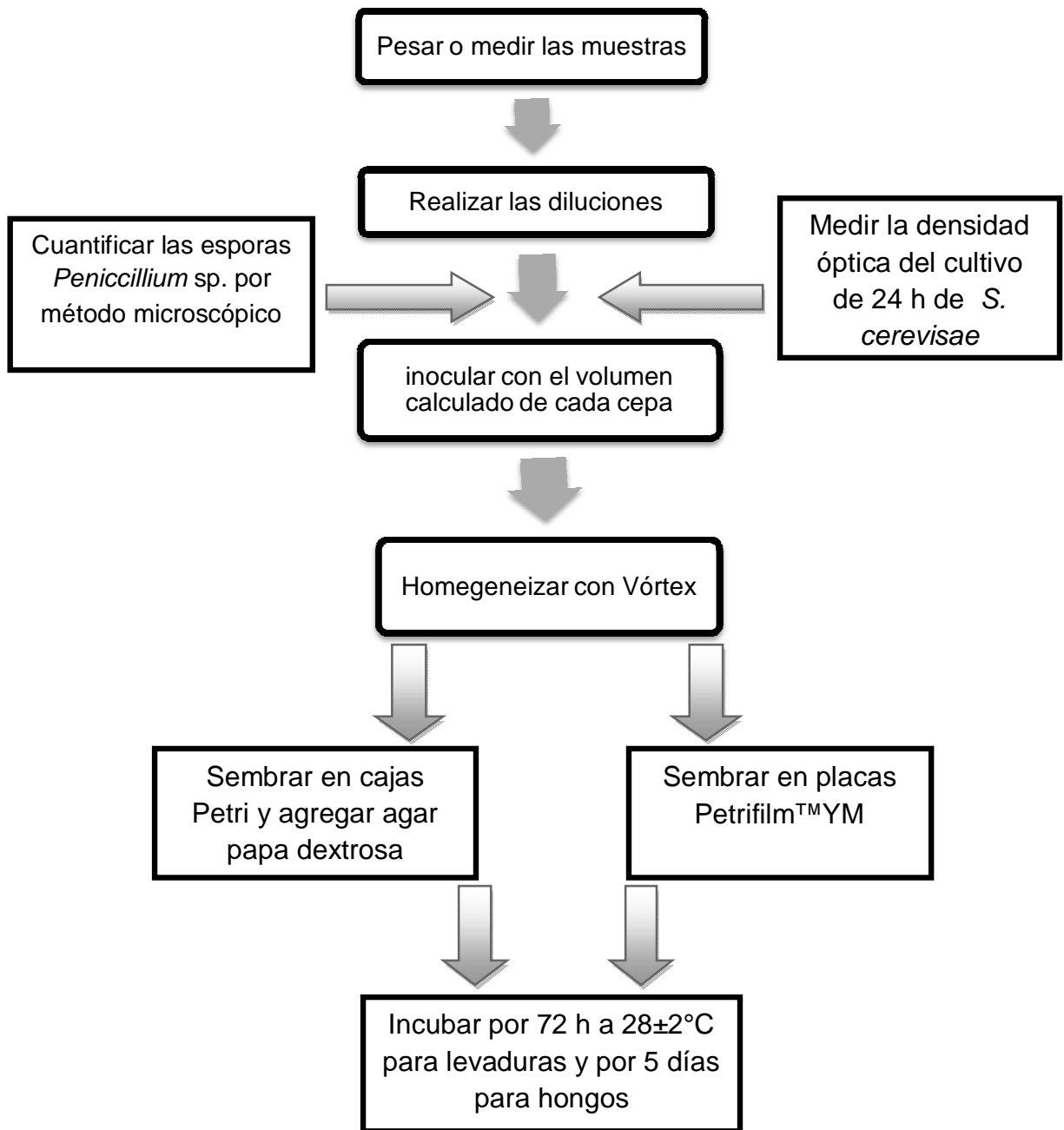
Para la cepa de *Penicillium* sp utilizamos el método de recuento microscópico directo ya mencionado en el apartado 4.1, y se calculó inocular las diluciones con aproximadamente 25 esporas/mL

Una vez inoculadas la dilución 10^{-1} de las unidades de prueba, homogenizar vórtex. Transferir por duplicado alicuotas de 1 mL de cada dilución a placas Petrifilm™ YM y a cajas Petri. A las cajas Petri se les agregaron de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, homogenizar y dejar solidificar.

Para la cuantificación de levaduras se incubaron las placas y cajas por 72 h a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y para la cuantificación de hongos se incubaron por 5 días a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$; las cajas se incuban en un máximo de diez cajas por columna y las placas en un máximo de 25 placas por sobre.

De igual forma que en las otras determinaciones, se incluyeron controles, blancos y blanco de muestra refrigerado para tener referencia del aspecto de las partículas de la matriz, especialmente en las placas Petrifilm.

Figura 3. Diagrama de bloques para el análisis microbiológico de hongos y levaduras por método tradicional y método Petrifilm™



4.4. Inhibición Bacteriana.

Debido a que no se obtenía buen crecimiento de las cepas inoculadas en yogur bebible ni en yogur de fresa y en virtud de que en el blanco de producto crecía perfectamente, se pensó que el problema se debía a la presencia de bacteriocinas producidas por las bacterias fermentadoras, utilizadas en estos productos. Para comprobarlo se decidió hacer una prueba de inhibición con penicilindros y papel filtro (BAM, 1998) para ver si el producto estaba impidiendo el crecimiento.

Para hacer esta determinación, se utilizó la técnica para la detección de inhibidores en leche, descrita por Maturin en el BAM (1998) utilizando las cepas que se aplicaron en las pruebas de recuperación. Se prepararon cultivos en medio de cultivo líquido, de 24 horas, se inocularon 100 μ L del cultivo sobre la superficie de placas de agar cuenta estándar y de agar bilis rojo violeta y se extendió el inóculo con varilla de vidrio estéril. Se impregnaron cuadros de papel filtro (0.5 cm x lado) con 100 μ L para cada unidad de prueba ensayada: yogur, yogur bebible y *PetiZoo*; en forma directa y de la dilución 1:10.

En todas las pruebas se incluyó un blanco con SSI y un control con un antibiótico comercial (Polixín Ofteno de *Sophia*, que contiene: 0.025 mg /mL de gramicidina, 1.75 mg/mL de neomicina y 5000 U./mL de polimixina B). Las placas se refrigeraron durante 30 minutos para permitir la difusión de los inhibidores antes del inicio del crecimiento y enseguida se incubaron a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Después de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición, verificando que no la hubiese en el blanco y si en el control.

Para la variante con penicilindros, éstos se colocaron sobre la superficie de la caja Petri, posteriormente se vierte una sobrecapa de 7 mL de agar adicionado con 100 μ L de un cultivo de 24 h. Una vez que solidificó dentro de los penicilindros, se pusieron 50 μ L de cada unidad de prueba ensayada y sus diluciones 1:10, se refrigeró media hora para permitir la difusión de los inhibidores y luego se incubó en las mismas condiciones que en los cuadros de papel filtro. Para la interpretación se mide el diámetro de los halos de inhibición.

5.4. Prueba de Inhibición de crecimiento microbiano.

Como se ha mencionado, la prueba de inhibición se llevó a cabo como indica el BAM para la detección de inhibidores en leche, pero con las cepas y medios de cultivo utilizados en este estudio. Se probó si había efecto inhibidor de

- yogur de fresa
- yogur de fresa 1:10,
- yogur bebible de fresa,
- yogur bebible de fresa 1:10,
- *PetiZoo* sabor mora
- *PetiZoo* sabor mora 1:10,
- antibiótico comercial 1:10
- en el centro el antibiótico comercial sin dilución,
- en las pruebas con papel filtro se colocó también un blanco con SSI.

Los papeles se impregnaron con aproximadamente 100 μ L para cada muestra, y en los penicilindros se colocaron 50 μ L también de para cada muestra. Los resultados se presentan en la tabla número 37.

Tabla 19. Diámetro (mm) del halo de inhibición para cada producto, sobre las cepas probadas.

Producto / Cepas	Método de discos de papel filtro			Método de Penicilindros		
	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC-6538)	<i>E. coli</i> (ATCC-1122)	<i>E. coli + S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC-6538)	<i>E. coli</i> (ATCC-1122)	<i>E. coli + S. aureus.</i>
Yogur de fresa	17	7	20	15	13	13
Yogur de fresa 1:10	10	18	07	15	13	12
Yogur bebible de fresa	20	20	20	15	12	10
Yogur bebible de fresa 1:10	10	10	7	10	12	13
<i>PetiZoo</i> mora	7	15	10	10	12	13
<i>PetiZoo</i> mora 1:10	13	15	7	10	12	14
Control	25	17	10	15	15	25
Control 1:10	30	23	17	13	15	15
Blanco	0	0	0			

Como puede apreciarse, todos estos productos tuvieron efecto inhibitor sobre las cepas de estudio, separadas o juntas. Los productos diluidos tienen aparentemente mayor efecto, pero consideramos que se debió a una mejor impregnación y mayor facilidad para difundir en el agar. No hay diferencias importantes entre ambos métodos.

Esta prueba demostró que las matrices de estos alimentos inhiben el crecimiento bacteriano, lo que hace muy difícil la determinación de indicadores de este grupo.

Esto, por lo demás, es de esperarse en lácteos fermentados ya que las BAL se caracterizan por su habilidad para producir antibióticos naturales como las bacteriocinas. Por curiosidad, en pruebas no reportadas aquí, determinamos también si presentaban este efecto otros dos productos comerciales: yogur de fresa Danone y yogur de fresa Alpura. Ambos inhiben el crecimiento en las cepas probadas.

En las imágenes se pueden apreciar los halos de inhibición para ambas cepas y para la mezcla, lo que explica la baja o nula recuperación en las determinaciones de mesófilos aerobios especialmente, y de coliformes, en las leches fermentadas en estudio.

A continuación se muestran las fotografías de esta prueba; las matrices se colocaron en el orden de las manecillas de reloj, comenzando por el centro en la parte superior: yogur, yogur 1:10; yogur bebible, yogur bebible 1:10, *PetiZoo*, *PetiZoo* 1:10, antibiótico comercial 1:10 y al centro, el antibiótico comercial sin diluir. En las pruebas con papel filtro hay también un blanco con SSI.

Figura 8. Prueba de inhibición para *Staphylococcus aureus* en agar cuenta estándar.

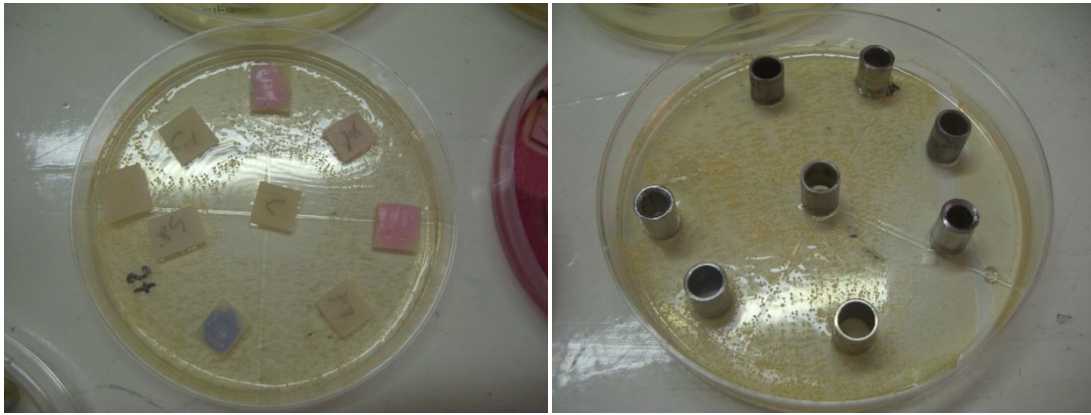


Figura 9. Prueba de inhibición para *Escherichia coli* en agar BRV.

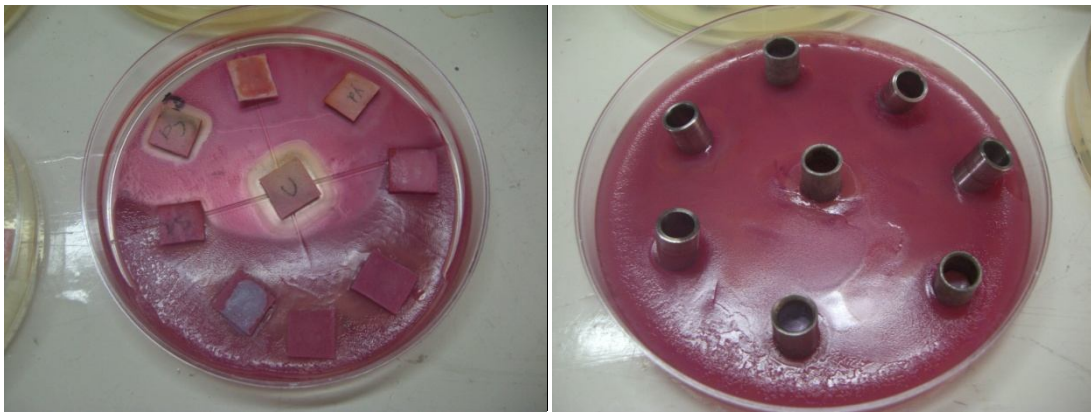
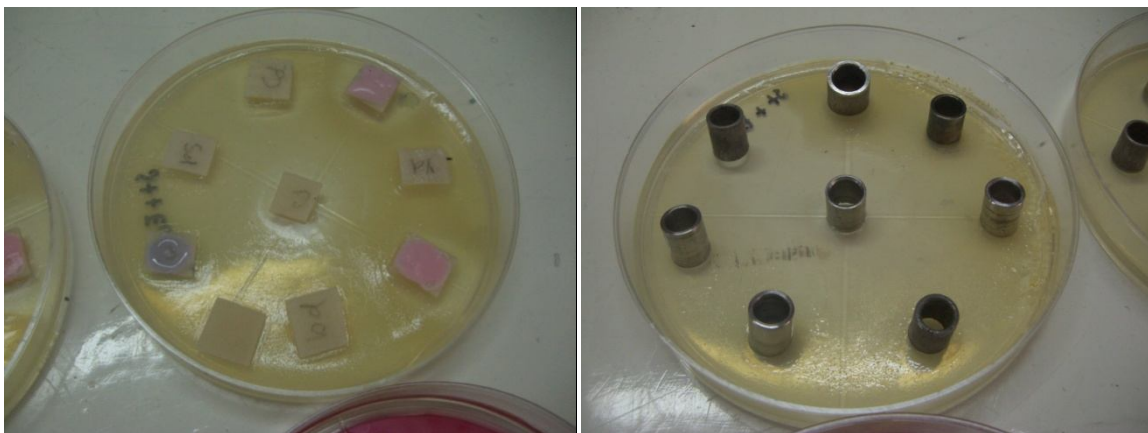


Figura 10. Prueba de inhibición en agar cuenta estándar, para *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli*.



Capítulo 5. Resultados y Discusión.

5.1. Primera Etapa: Caracterización de Productos.

Se analizaron unidades de prueba de yogur de fresa clásico *LALA*, yogur bebible de fresa *LALA*, *PetiZoo* sabor mora, jugo de naranja pasteurizado *Natural'es*, y *AquaFrut* bebida sabor uva, todos de la familia *LALA* para conocer su calidad microbiológica, como punto de partida y establecer si cumplen las especificaciones de NOM's aplicables, en cuanto a los indicadores en estudio. Para ello, se hizo primero el resumen de las especificaciones, que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de especificaciones microbiológicas aplicables a los productos analizados e indicadores determinados.

Productos	NOM aplicable	Indicador	Límite máximo ufc/g o mL
Leches fermentadas	NOM-185-SSA1-2002 inciso 9.1.2	Mesófilos aerobios	No se considera
		Coliformes totales	10
		Hongos y levaduras	No se considera
	NMX-F-444-1983 inciso 5.3.2 Tabla 3	Coliformes	10
		Hongos	10
		Levaduras	10
Jugos y néctares pasteurizados	NOM-130-SSA1-1995 inciso 7.2.3	Mesófilos aerobios	100
		Coliformes totales	No se considera
		Hongos y levaduras	25
Bebidas no alcohólicas preenvasadas	PROY-NOM-218-SSA1-2009 inciso 6.3.1	Mesófilos aerobios	50
		Coliformes totales	10
		Hongos y levaduras	No se considera

Los resultados obtenidos experimentalmente se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Resultados de los análisis microbiológicos de los productos comerciales analizados.

Indicador	Producto	Yogur bebible	Yogur sólido	<i>Petit suiss</i> sabor mora	Jugo de naranja	<i>AquaFrut</i> sabor uva
	Método					
Mesófilos aerobios	MT UFC/mL o g	<10	<10	<10	70 v.e.	<10
	MP UFC/mL o g	<10	<10	<10	50 v.e.	<10
Coliformes totales	MT UFC/mL o g	< 10	< 10	160	< 10	< 10
	MP UFC/mL o g	< 10	< 10	100 v.e.	< 10	< 10
Hongos y levaduras	MT UFC/mL o g	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	MP UFC/mL o g	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

MT = Método tradicional. MP = Método Petrifilm. v.e. = valor estimado

Con base en los resultados de la tabla, se puede apreciar que los productos tienen una calidad microbiológica satisfactoria cumpliendo con las especificaciones de las normas aplicables. El único producto que no cumple con las especificaciones del grupo coliforme total establecido en la NOM-185-SSA1 es el *Petit suiss*, cuestión que debe ser verificada y mejorada por el fabricante en su proceso de elaboración y almacenamiento. El número de coliformes totales obtenidos en este análisis, difícilmente es aceptable aún en planes de muestreo, aunque puede ser atribuido a una contaminación puntual ya que en las pruebas posteriores, no se encontraron unidades de prueba que no cumplieran las especificaciones establecidas en la NOM 111.

En las determinaciones microbiológicas que las normas no consideran, tales como mesófilos aerobios para yogur, coliformes totales para jugos y hongos

y levaduras para bebidas, se puede considerar que los resultados son satisfactorios ya que las cuentas son muy bajas.

Este análisis nos sirvió para tener un panorama general de la carga microbiana de cada producto analizado y que al momento del análisis de validación tengamos en cuenta estos recuentos y podamos ponderar diferencias numéricas en la inoculación según sea el caso.

Las siguientes figuras muestran fotografías de la apariencia de las colonias en las placas Petrifilm™AC, CC y YM y por el método tradicional en las cajas petri con el agar respectivo.

Figura 4. Fotografías del análisis de mesófilos aerobios en yogur sólido, por ambos métodos.

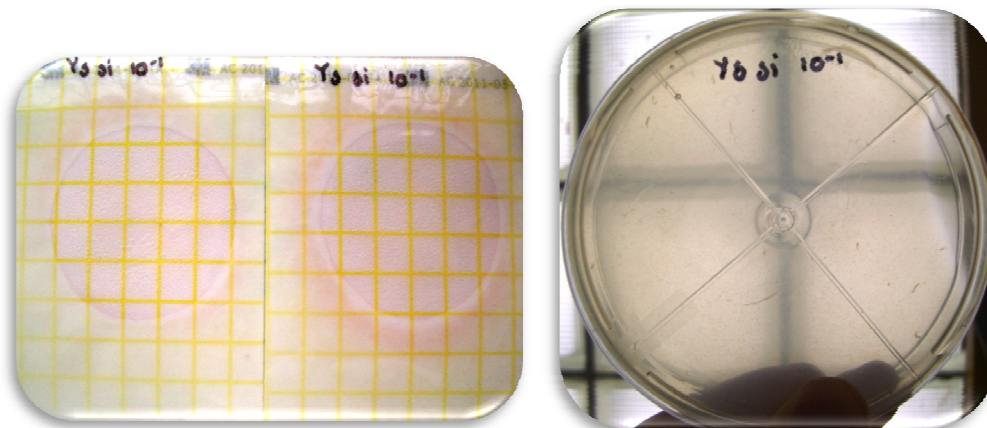


Figura 5. Fotografías del análisis de coliformes totales en jugo de naranja.

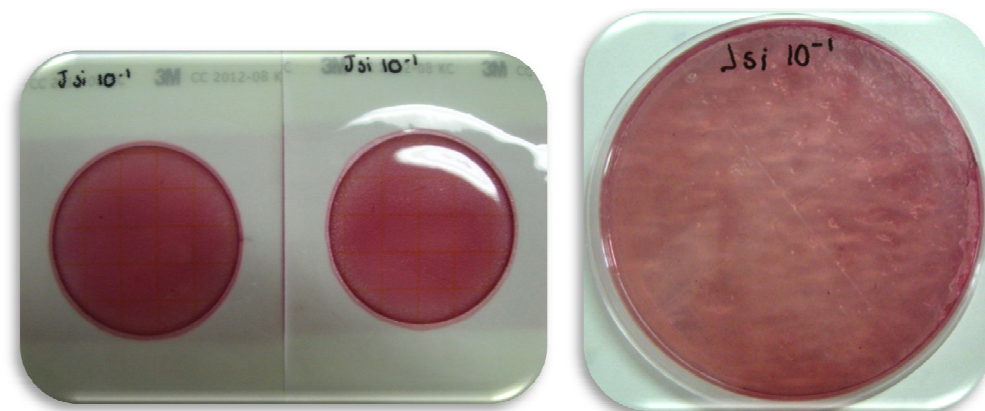


Figura 6. Fotografías del análisis de levaduras en yogur de fresa, por ambos métodos.

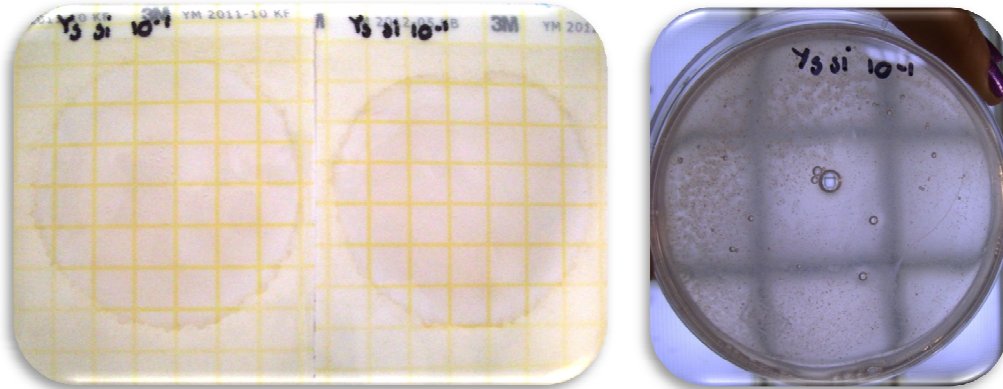
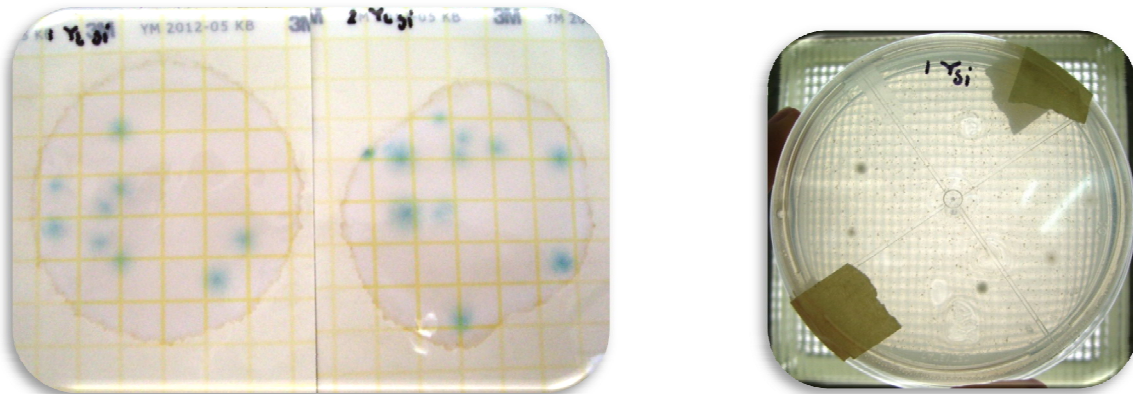


Figura 7. Fotografías del análisis de hongos y levaduras en yogur bebible, por ambos métodos.



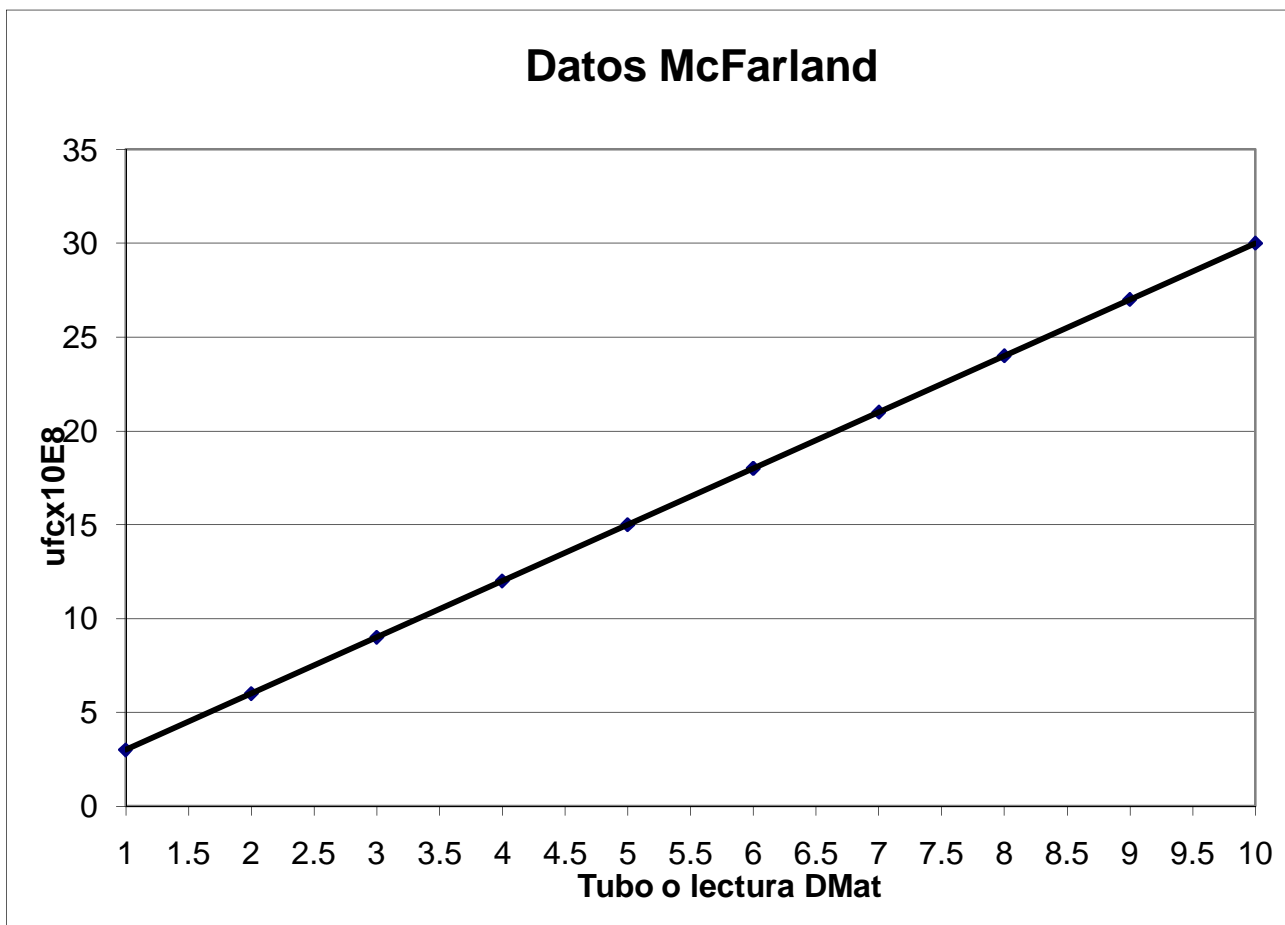
5.2. Segunda Etapa: Estandarización de Cepas.

Se estandarizaron cepas de microorganismos para utilizarlos en la inoculación de las unidades de prueba y determinar la eficiencia de ambos métodos, haciendo un análisis comparativo.

Se utilizaron las siguientes cepas: *Escherichia coli* (ATCC-1122) y *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538) para la determinación de mesófilos aerobios; *Escherichia coli* (ATCC-1122) para la determinación de coliformes; *Penicillium* sp. (CFQ-H-75) para la determinación de hongos y *Saccharomyces cerevisiae* (CFQ-L-25) para levaduras. Los resultados se muestran a continuación en las gráficas.

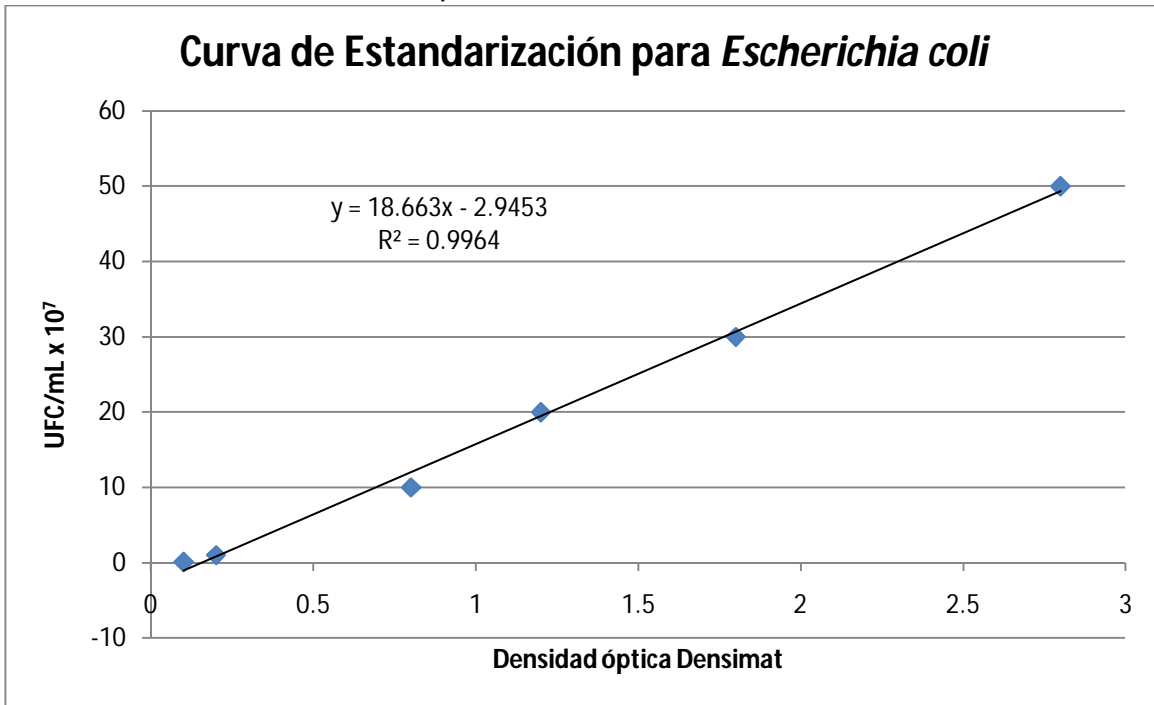
Se elaboró la curva de McFarland con sulfato de bario, la cual se estandarizó en el Densimat.

Gráfica 1. Curva de McFarland con lectura en Densimat.

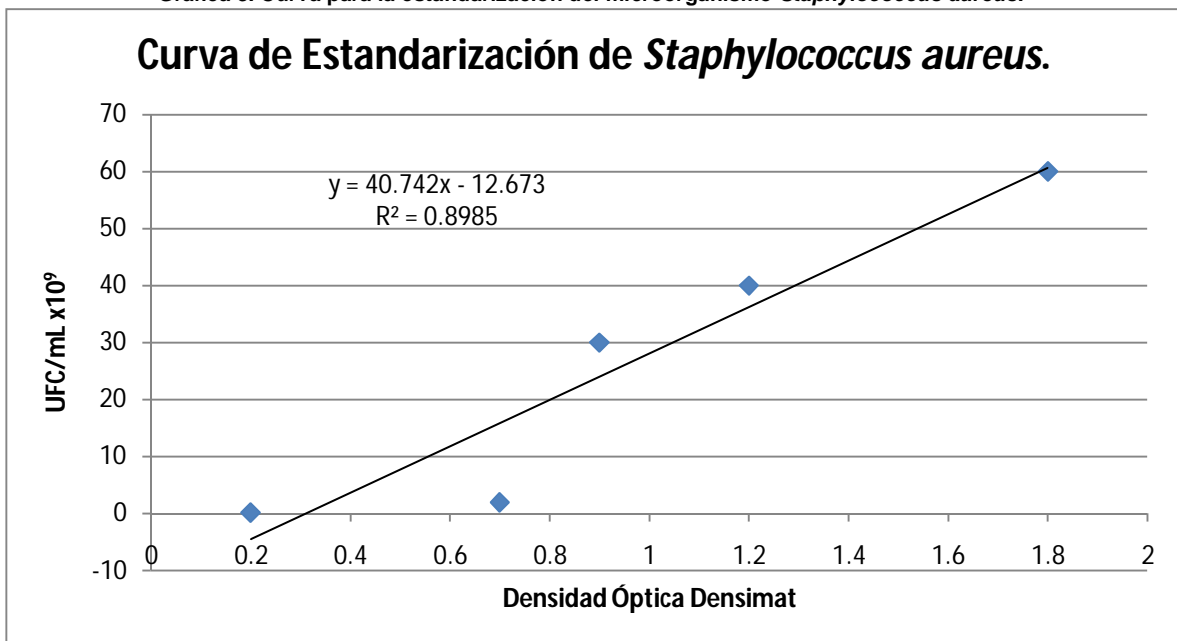


Con la metodología mencionada en el capítulo 4 se elaboraron las siguientes curvas para cada cepa de microorganismo.

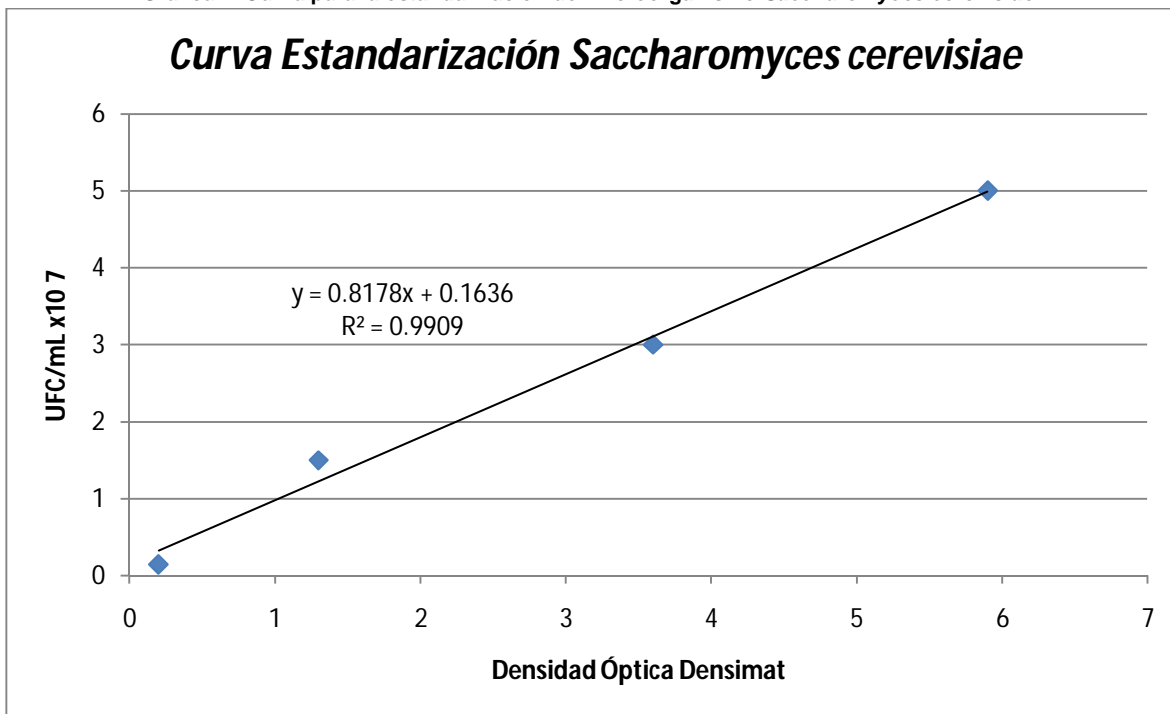
Gráfica 2. Curva para la estandarización de *Escherichia coli*.



Gráfica 3. Curva para la estandarización del microorganismo *Staphylococcus aureus*.



Gráfica 4. Curva para la estandarización del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*.



Los números en el eje de las ordenadas se obtuvieron aplicando el inverso de la dilución a las cuentas obtenidas dentro de los límites de detección y sensibilidad de los métodos empleados que son entre 15-150 para coliformes, de 25-250 para mesófilos y de 10-150 para hongos y levaduras.

Así se puede observar que en los datos de las ordenadas en la gráfica se les asignó un exponente de 10^7 para *E.coli* y 10^9 *Sacch. cerevisiae* porque fue el inverso de la dilución 10^{-7} donde la cuantificación de UFC en placas Petrifilm™ CC se encuentra dentro del límite de detección ya mencionado.

El Densimat determina la densidad óptica de la dilución o de la cepa sometida al análisis y nos proporciona sólo un dato de “tubo de escala de MacFarland”, el cual es suficiente y estable para estandarizar los cultivos. Fue posible relacionar dichas lecturas con los resultados de recuento en placas Petrifilm™ y así estandarizar los inóculos que se usaron en el siguiente capítulo. Una vez obtenidas las gráficas se puede utilizar la ecuación de la recta donde “x” es densidad óptica y “y” es UFC/mL x10 elevado a la potencia correspondiente de cada cepa, para determinar el volumen necesario que debemos inocular en las

muestras para la siguiente etapa de la validación. Los datos a partir de los cuales se elaboraron las gráficas 2 y 3 se encuentran en el anexo 6.

Para el hongo *Penicillium* no se aplicó este método; se hizo en cada ocasión el recuento de esporas en la suspensión obtenida de éstas, para determinar el inóculo necesario y se comprobó, en cada ocasión, sembrando diluciones de la suspensión, en Petrifilm™YM.

5.3. Tercera Etapa: Validación del método Petrifilm.

Para la validación del método se analizaron treinta muestras de cada producto comercial, inoculando cantidades conocidas de los microorganismos indicadores. Para el análisis estadístico se aplicó la prueba t-Student para determinar si la hipótesis nula es verdadera.

Las siguientes tablas y gráficas muestran los resultados obtenidos en las matrices inoculadas para ambos métodos, en las determinaciones de mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras. Las determinaciones por método tradicionales se llevaron a cabo como indican las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-092-SSA1-1994 para mesófilos aerobios, NOM-113-SSA1-1994 para coliformes totales en placa y NOM-111-SSA1-1994 para determinación de hongos y levaduras.

5.3.1. *Aqua-Frut* sabor uva.

En la siguiente tabla se muestra el promedio correspondiente a los resultados obtenidos en las treinta muestras analizadas.

Tabla 8. Resultados del análisis microbiológico para la Validación en *Aqua-Frut*.

Indicador		Método Tradicional UFC/mL	Petrifilm™ UFC/mL
Mesófilos aerobios	Promedio (x)	820	880
	Control x	810	840
	Blanco Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	800-1000	
Coliformes totales	Promedio (x)	890	1230
	Control x	840	1280
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	800-1000	
Hongos y levaduras	Promedio (x)	270	310
	Control x	220	420
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	400-500	

v.e. valor estimado

En la tabla se encuentra el recuento de los controles obtenido para cada método y se puede comparar con el promedio de las treinta muestras; en todos los casos se recuperan valores muy cercanos a los inoculados, que teóricamente fueron entre 800-1000 UFC/mL para el caso de mesófilos aerobios y coliformes; las diferencias se pueden explicar por la carga microbiana que tiene el producto y, en general, por sus características fisicoquímicas, como su baja acidez, alrededor de 3 a 4, factor que contribuye a la inhibición del crecimiento microbiano.

Para el caso de hongos y levaduras, teóricamente se inocularon entre 400-500 UFC/mL y de acuerdo con la tabla 8 se observa que Petrifilm™ obtuvo el recuento más cercano al promedio de las unidades de prueba; el control nos da un recuento de 420 en este método y el promedio de las 30 unidades de prueba es de 310 UFC/mL en el producto inoculado. Se puede ver que la recuperación de la cantidad de células inoculadas en el producto es similar y no muy lejana a la cantidad del control, por lo que se asegura que los valores son adecuados y el producto no interfiere con los métodos de análisis, observando también que el producto en su presentación comercial no tenía carga microbiana significativa que pudiese alterar nuestros resultados. Los recuentos por método tradicional son menores, tanto en el control como en el promedio de las unidades de prueba, a pesar de que se partió de la misma dilución inoculada.

Tabla 9. Análisis estadístico t-pareada para *Aqua-Frut* sabor uva

Indicador	t- tablas	t-pareada experimental	Interpretación
Mesófilos aerobios		3.9195	Hay diferencias significativas entre MT y PF
Coliformes totales	2.045	13.5491	Hay diferencias significativas entre MT y PF
Hongos y levaduras		3.2150	Hay diferencias significativas entre MT y PF

De cada resultado se obtuvieron los logaritmos base 10 de los resultados mostrados en la tabla 10 para hacer los cálculos estadísticos que se presentan en la tabla anterior.

La t-student es de dos colas y pareada, con 29 grados de libertad y un nivel de significancia de 5%. Por lo tanto, cuando t-pareada experimental es menor a la t-tablas se acepta la H_0 (hipótesis nula) y se establece que no hay diferencias significativas entre ambos métodos, el valor t-pareado experimental debe ser absoluto. Si no hay diferencias, ambos métodos pueden usarse indistintamente. Cuando hay diferencia significativa entre ambos, hemos determinado cuál permite mejor recuperación de la población inoculada y en qué porcentaje.

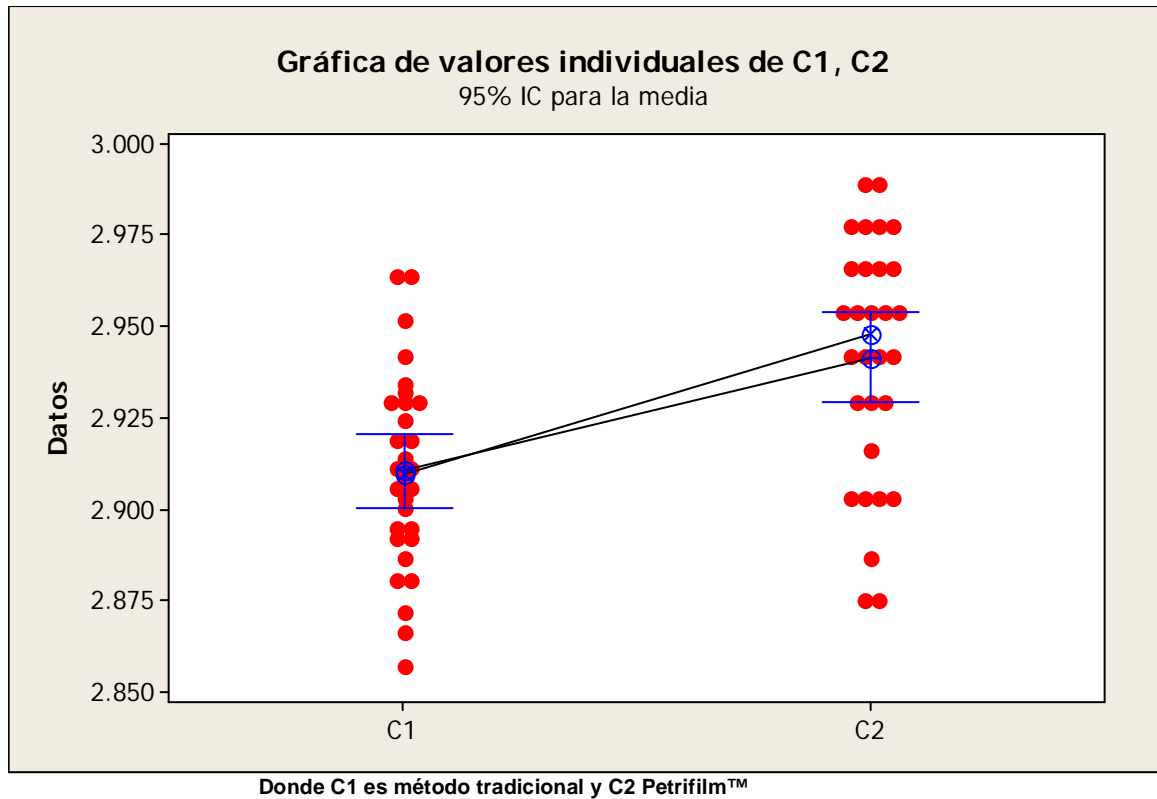
Para el caso de mesófilos aerobios, ambos métodos presentan diferencia significativa pues el valor t-experimental es mayor. Por lo tanto vemos que el método Petrifilm™ tiene 6.84% más de recuperación en el recuento que el método tradicional.

Para coliformes totales se observa que Petrifilm™ recupera 27.63% más que el método tradicional de coliformes totales en el análisis de esta bebida, lo cual se observa en la gráfica número 6.

En hongos y levaduras el método Petrifilm™ tiene un 13.42% más de recuperación en el recuento de células. Con la ventaja de que para el analista es más fácil usar las placas Petrifilm™YM ya que la identificación de colonias es más clara y precisa que en el método tradicional.

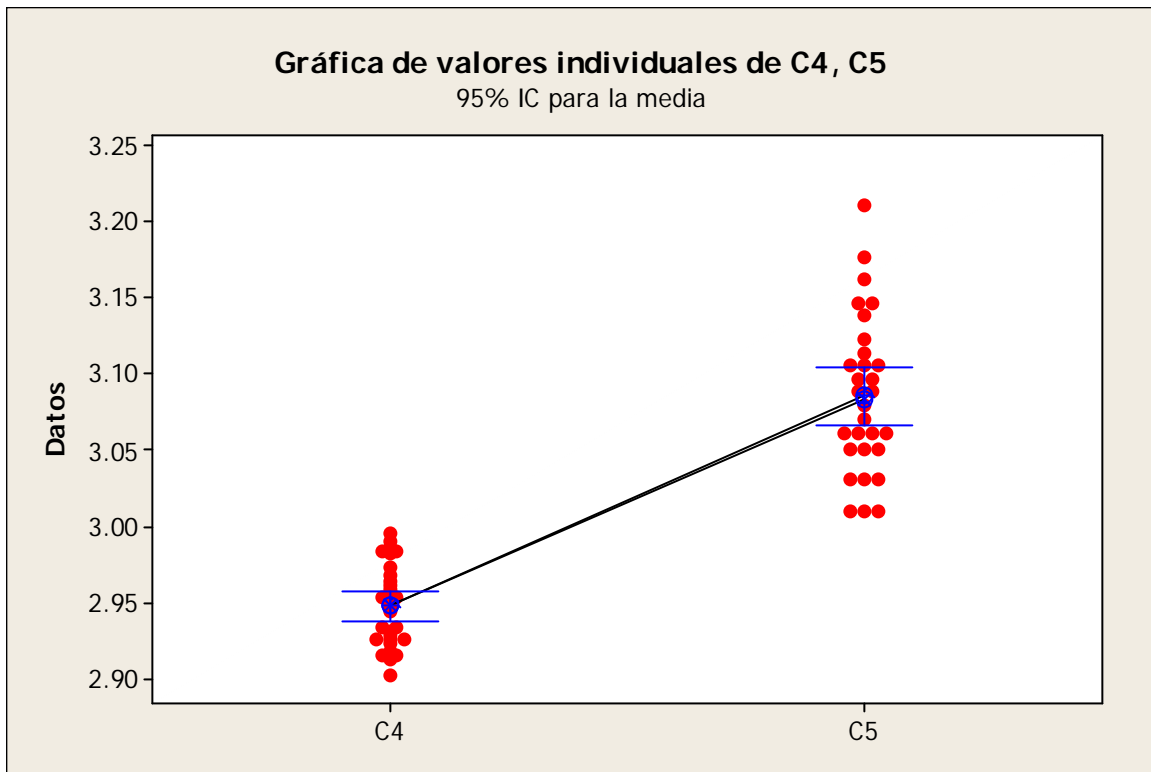
Las siguientes gráficas representan los valores de las 30 unidades de prueba en el área del gráfico con el propósito de hacer una comparación de eficacia y repetibilidad.

Gráfica 5. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para *AquaFrut* mesófilos aerobios



La gráfica 5 nos habla de la dispersión de los datos y de qué tan alejadas están las medias de ambos métodos. Se observa que aunque Petrifilm™ tiene más dispersión, tiene una mejor recuperación en el recuento microbiano; por lo tanto, las placas Petrifilm™AC pueden ser utilizadas para el análisis microbiológico de mesófilos aerobios para este tipo de bebidas obteniendo así mejores o iguales resultados que por el método tradicional que establece la norma correspondiente.

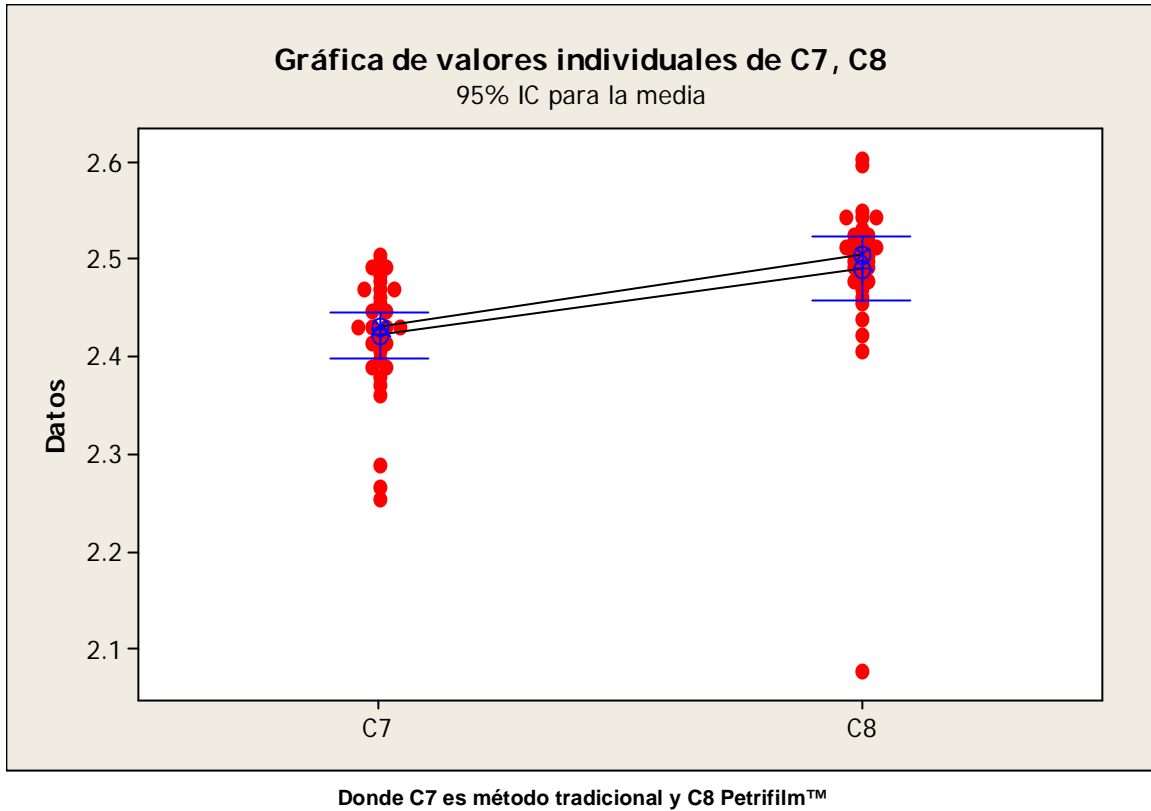
Gráfica 6. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para *Aqua Frut* coliformes totales.



Donde C4 es método tradicional y C5 Petrifilm™

El método tradicional tiene una mejor repetibilidad, pues los datos se concentran más en un área de la gráfica número 6; mientras que los datos de Petrifilm™ están más dispersos pero también se aprecia una mayor recuperación de los microorganismo inoculados, pues el recuento obtenido en Petrifilm™ está por arriba del recuento en placas por método tradicional. Por lo tanto, las placas Petrifilm™ pueden ser usadas para esta determinación en la matriz del *AquaFrut* y se obtendrán mejores resultados que por el método tradicional.

Gráfica 7. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para *Aqua-Frut* hongos y levaduras.



La repetibilidad de ambos métodos es similar de acuerdo con la gráfica número 7, los datos no están dispersos en ningún caso, además de que como analista es más fácil manejar el método Petrifilm™ ya que el recuento es mejor y más claro.

5.3.2. Jugo de Naranja *Natula'es*.

Tabla 10. Resultados del análisis microbiológico para la Validación en jugo de naranja *Natural'es*.

Indicador		Método Tradicional UFC/mL	Petrifilm™ UFC/mL
Mesófilos aerobios	Promedio (x)	1150	1230
	Control x	1260	1170
	Blanco Producto x	70	50
	Inóculo teórico	800-1000	
Coliformes totales	Promedio (x)	1090	810
	Control x	1010	800
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	800-1000	
Hongos y levaduras	Promedio (x)	200	290
	Control x	260	310
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	400-500	

v.e. valor estimado

Para el análisis de mesófilos aerobios y coliformes totales teóricamente se inocularon 800-1000 UFC/mL. En la tabla número 10 se observa que el alimento contenía niveles bajos de mesófilos aerobios pero no son recuentos que hagan variar los resultados, ya que los valores del promedio de las muestras y los controles son parecidos entre sí.

En el análisis de coliformes totales se observa que la recuperación en las muestras es muy semejante en ambos métodos, a la recuperación en el control, aunque si hay diferencia entre los métodos, como demuestra el análisis estadístico.

Experimentalmente se inocularon 500 UFC/mL de hongos y levaduras pero de acuerdo a la tabla número 10 se observa que se inoculó una cantidad menos a lo experimental. Esto se aprecia a observar los resultados de los controles Al comparar los controles con el promedio de las muestras inoculadas se observa que se obtiene una recuperación muy similar, por lo que decimos que el producto no interviene con el análisis de hongos y levaduras y el análisis es correcto.

Tabla 11. Análisis estadístico t-pareada para jugo de naranja *Natural'es*.

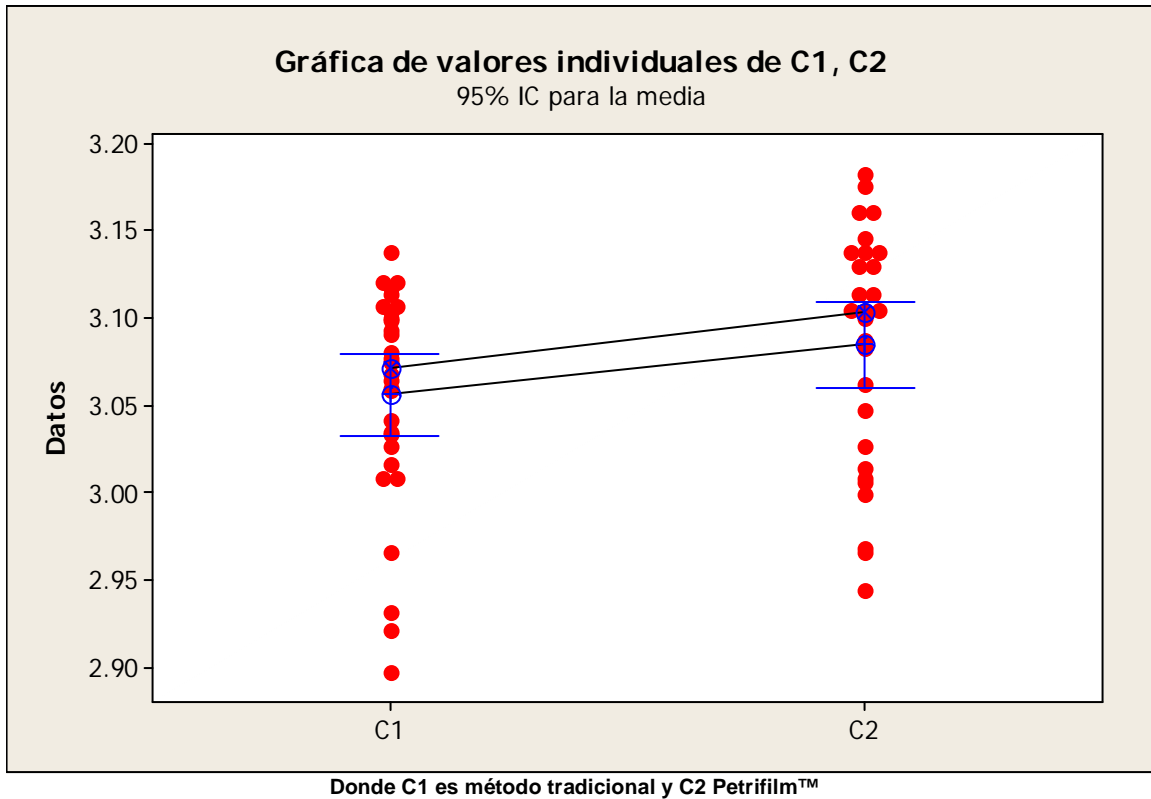
Indicador	t- tablas	t-pareada experimental	Interpretación
Mesófilos aerobios		1.9145	Sin diferencias significativas
Coliformes totales	2.045	12.5570	Hay diferencias significativas entre MT y PF
Hongos y levaduras		6.0819	Hay diferencias significativas entre MT y PF

Para mesófilos aerobios vemos en la tabla anterior que el valor experimental para la t-Student es de 1.914 siendo menor al valor de tablas, entonces se acepta la hipótesis nula, con lo cual se dice que no hay diferencia significativa entre los métodos, por lo que ambos métodos son igual de eficientes.

En el análisis de coliformes totales se observa que existe diferencia significativa entre los métodos, por lo que el método tradicional tiene un 27.95% más de recuperación en el recuento de microorganismos que Petrifilm™ por lo tanto decimos que para el análisis de coliformes totales en el jugo de naranja pasteurizado el método tradicional es mejor pues proporciona recuentos más altos y la repetibilidad es mejor, en la gráfica número 9 se aprecia que los valores tienen menor dispersión.

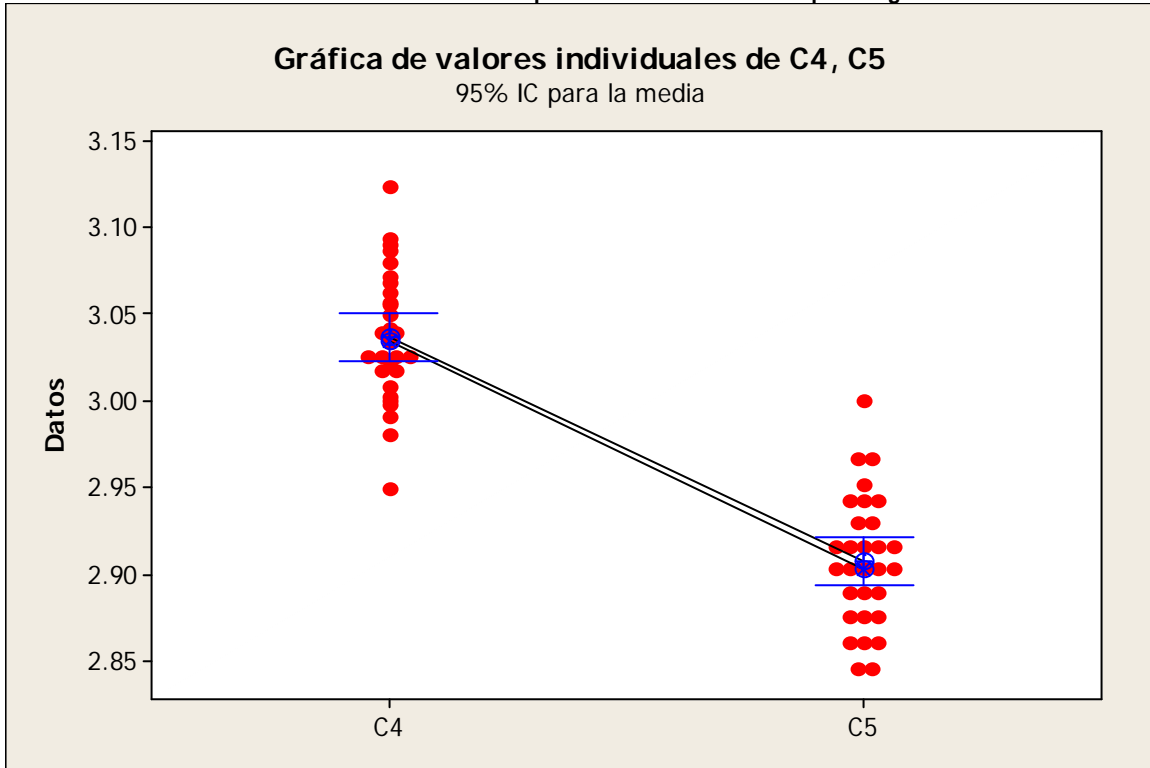
Para hongos y levaduras existe diferencia significativa pues la t-experimental es mayor, por lo tanto se dice que Petrifilm™ es mejor método para el análisis de hongos y levaduras ya que tiene un 25.45% más de recuperación. A su vez si observamos la gráfica número 10, los valores están menos dispersos en el análisis de Petrifilm™ y se ubican más arriba en el área del gráfico lo que confirma que el método tiene una mejor recuperación y mejor repetibilidad.

Gráfica 8. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para Jugo mesófilos aerobios.



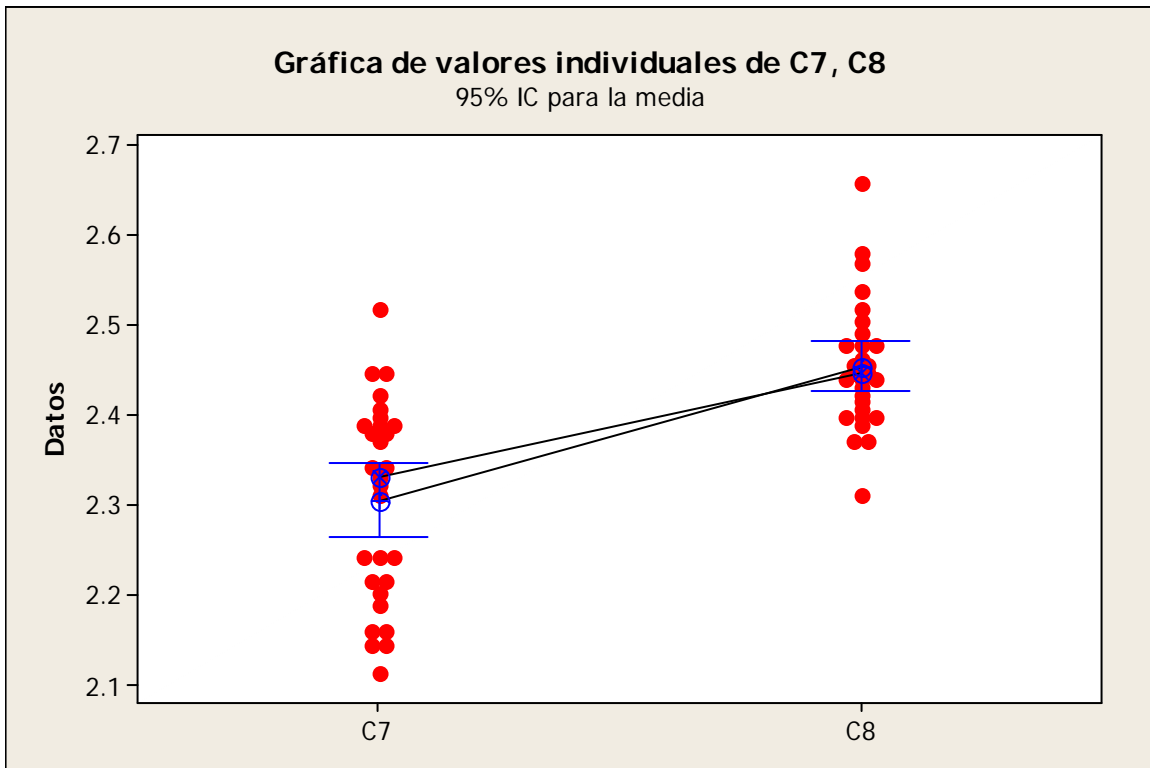
En la gráfica número 8 vemos que ambos métodos tienen buena repetibilidad de acuerdo a la dispersión de los datos, aunque debemos considerar que el producto comercial contiene microorganismos que licuan el medio de cultivo en las placas Petrifilm™, mientras que en el método tradicional hay un crecimiento extendido de dichos microorganismos. Esto constituye una dificultad para esta determinación que afecta a ambos métodos.

Gráfica 9. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para Jugo coliformes totales.



Donde C4 es método tradicional y C5 Petrifilm™

Gráfica 10. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para jugo de naranja hongos y levaduras.



Donde C1 es método tradicional y C2 Petrifilm

5.3.3. *PetiZoo* sabor mora.

Tabla 12. Resultados del análisis microbiológico para la Validación en *PetiZoo* sabor mora.

Indicador		Método Tradicional UFC/mL	Petrifilm™ UFC/mL
Mesófilos aerobios	Promedio (x)	790	740
	Control x	1260	1170
	Blanco Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	1000-1200	
Coliformes totales	Promedio (x)	1170	950
	Control x	1010	930
	Blanco de Producto x	<10v.e	
	Inóculo teórico	800-1000	
Hongos y levaduras	Promedio (x)	310	360
	Control x	360	380
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	400-500	

v.e. valor estimado

Experimentalmente se inocularon 1200 UFC/mL para el recuento de mesófilos aerobios, de acuerdo con la tabla número 12 vemos que en los controles se obtuvo un recuento muy cercano al teórico; no así en el promedio de las unidades de prueba ensayadas, pues el recuento para ambos métodos es significativamente menor. Esto se debe a que el producto presenta inhibición bacteriana, probablemente debida a bacteriocinas producidas por los microorganismos fermentadores. Hay que recordar que estos antimicrobianos naturales contribuyen a la estabilidad e inocuidad del producto. Ante estos resultados, se hizo una prueba de inhibición cuyos resultados se reportan en el apartado 5.4, la cual confirmó esta suposición.

Para coliformes totales si comparamos los valores del control en cada método contra los promedios de la recuperación en las unidades de prueba, se observa que es similar, por lo tanto, se considera para este caso que la matriz del producto no afecta el resultado. Afectando más el recuento de mesófilos aerobios que el recuento de coliformes.

Experimentalmente se inocularon 400-500 UFC/mL de hongos y levaduras pero de acuerdo a la tabla número 12 los valores en los controles nos indican que se inocularon menos células de lo que se pensaba pues nuestros valores son de 360 y 380 UFC/mL respectivamente. Si se comparan los controles con el promedio de las unidades de prueba ensayadas se observa que se obtiene una recuperación similar; por lo tanto, la inhibición natural que posee el producto no afecta a los hongos y levaduras ya que las bacteriocinas no afectan a eucariotes.

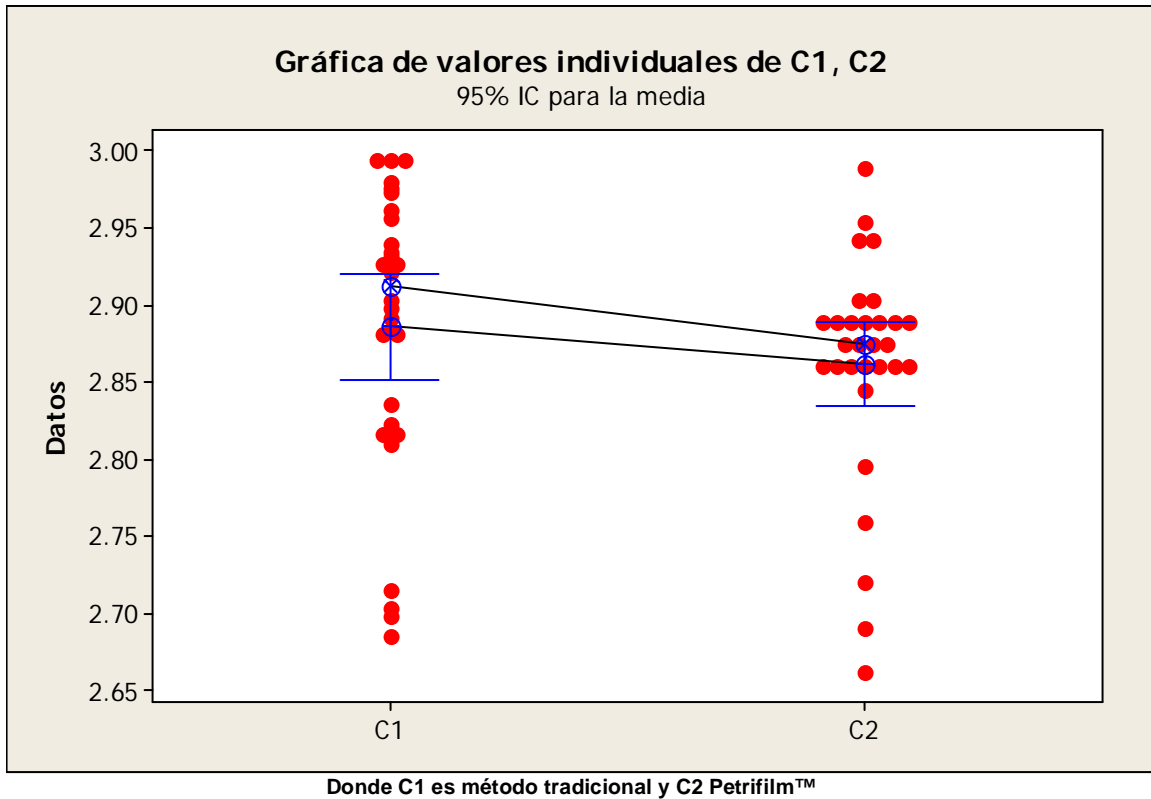
Tabla 13. Análisis estadístico t-pareada para *PetiZoo* sabor mora.

Indicador	t- tablas	t-pareada experimental	Interpretación
Mesófilos aerobios		1.9859	Sin diferencias significativas
Coliformes totales	2.045	5.3515	Hay diferencias significativas entre MT y PF
Hongos y levaduras		3.8081	Hay diferencias significativas entre MT y PF

De acuerdo con la tabla número 13 el valor experimental para la t-Student es mayor en el caso de coliformes totales y hongos y levaduras por lo tanto H_0 se rechaza, por lo tanto existe diferencia significativa entre ambos métodos. Para coliformes totales tenemos que el método tradicional posee 21.16% más de recuperación en el recuento, caso contrario de hongos y levaduras pues Petrifilm™YM posee un 16.33% de mejor recuperación.

En el caso de mesófilos aerobios no tenemos diferencias significativas entre ambos métodos, aunque ambos tienen el mismo problema de una recuperación baja.

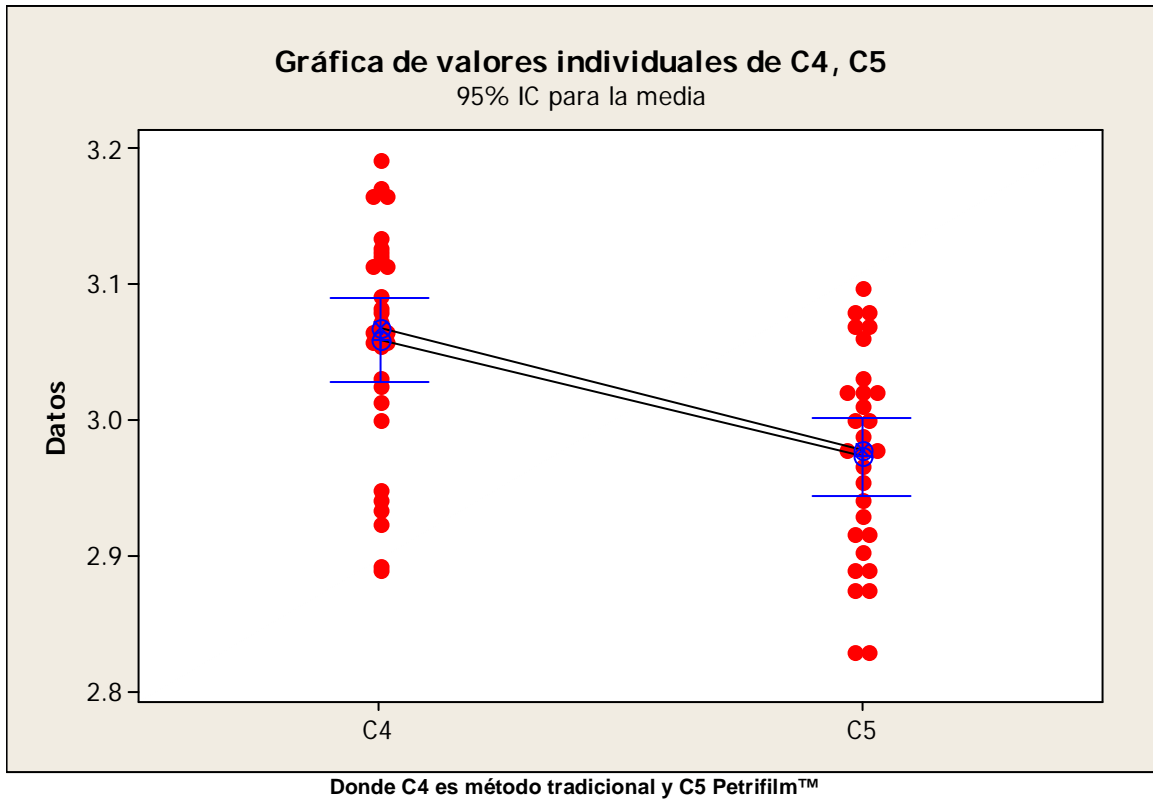
Gráfica 11. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para PetiZoo mesófilos aerobios.



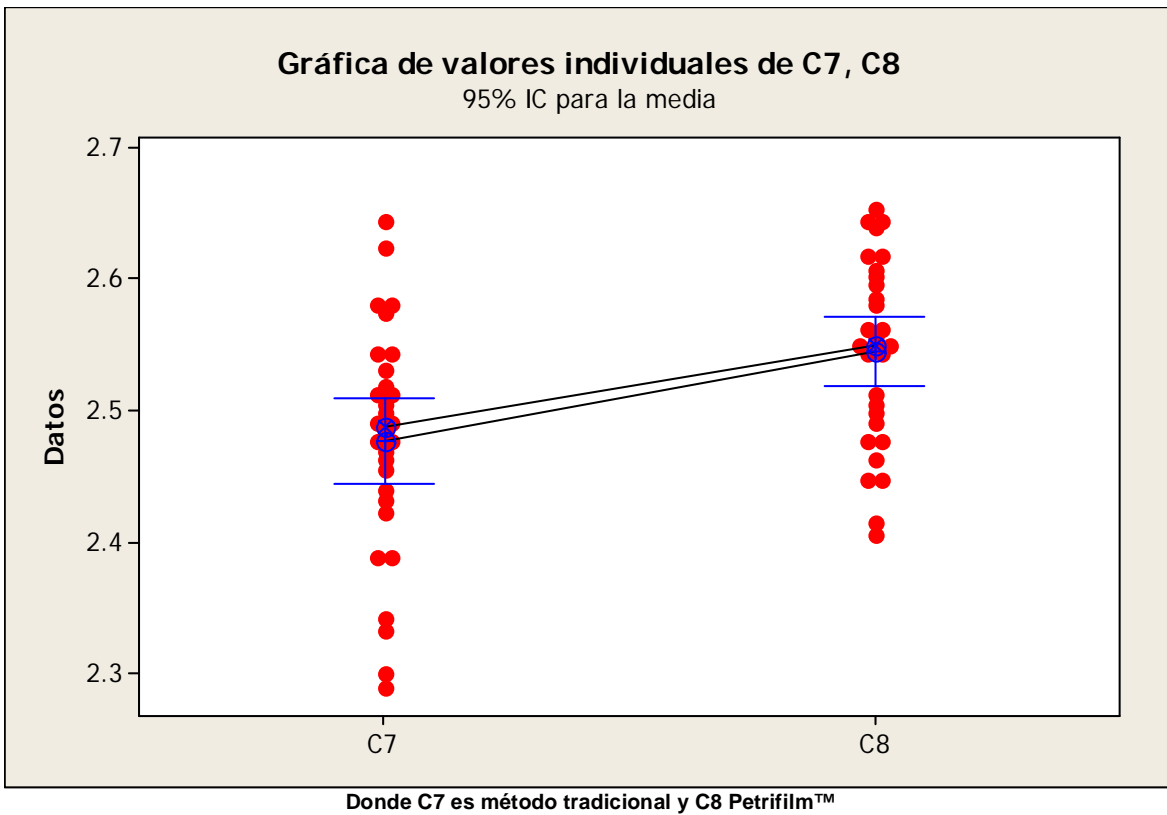
En la gráfica anterior se aprecia la dispersión de los valores de las 30 unidades de prueba para cada método, la cual es similar por lo tanto ambos métodos tienen la misma repetibilidad. Debido a esto y a que el análisis estadístico nos indica que no existe diferencia significativa, se puede usar indistintamente ambos y se obtendrán los mismos resultados.

En la gráfica número 12 se observa que la media de los valores para coliformes totales del método tradicional es superior que la de Petrifilm™ siendo así el primero mejor para este tipo de análisis, pues la dispersión de datos es mejor obteniendo mejor repetibilidad. No así para hongos y levaduras que es el caso contrario.

Gráfica 12. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para PetiZoo coliformes totales.



Gráfica 13. Gráfica de puntos de ambos métodos para PetiZoo hongos y levaduras.



5.3.4. Yogur bebible de Fresa.

Tabla 14. Resultados del análisis microbiológico para la Validación en yogur bebible de fresa.

Indicador		Método Tradicional UFC/mL	Petrifilm™ UFC/mL
Mesófilos aerobios	Promedio (x)	---	---
	Control x	600	620
	Blanco Producto x	<10v.e	
	Inóculo teórico	800-1000	
Coliformes totales	Promedio (x)	10	9
	Control x	610	510
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	500-600	
Hongos y levaduras	Promedio (x)	470	490
	Control x	530	520
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	400-500	

v.e. valor estimado

En la determinación de mesófilos aerobios para este producto no se obtuvieron datos, ya que hay una clara y fuerte inhibición microbiana. No hubo crecimiento alguno ni en las placas Petrifilm™ AC ni en método tradicional, pero los controles que están libres de la matriz del alimento, si crecieron bien. Para confirmar esto, se hizo la prueba de inhibición que se reporta en el inciso 5.4, en detalle.

Para coliformes totales también hay inhibición bacteriana del yogur, pero ésta no es total. Para el análisis de este producto no se hizo dilución alguna, lo cual desde luego afectó más el crecimiento de microorganismos. En los controles si se recuperó la cantidad inoculada, que fue de 500 a 600 UFC/mL. El producto sin inocular tampoco tuvo crecimiento.

Experimentalmente se inocularon 500 UFC/mL de hongos y levaduras y de acuerdo con la tabla número 14 los controles muestran una recuperación muy similar. La recuperación de los microorganismos inoculados en las unidades de prueba es también parecida a la recuperación en los blancos por lo que se puede

decir que en este caso no hay interferencia de la matriz en la determinación de hongos y levaduras.

Tabla 15. Análisis estadístico t-pareada para yogur bebible de fresa.

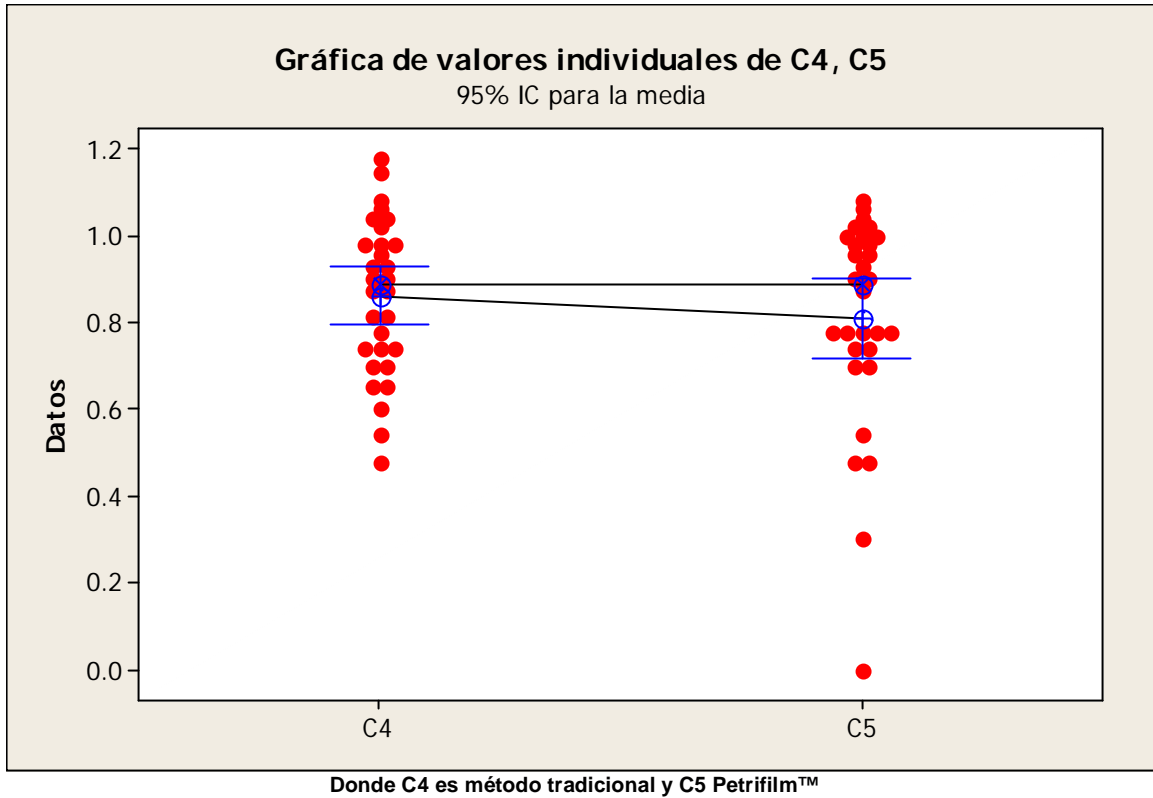
Indicador	t-tablas	t-pareada experimental	Interpretación
Mesófilos aerobios		---	Sin diferencias significativas
Coliformes totales	2.045	1.1647	Sin diferencias significativas
Hongos y levaduras		1.5959	Sin diferencias significativas

Debido al efecto inhibitor del yogur para mesófilos aerobios no hay datos para analizar estadísticamente, por lo que éste no es un buen indicador microbiano. Ambos métodos presentan las mismas dificultades

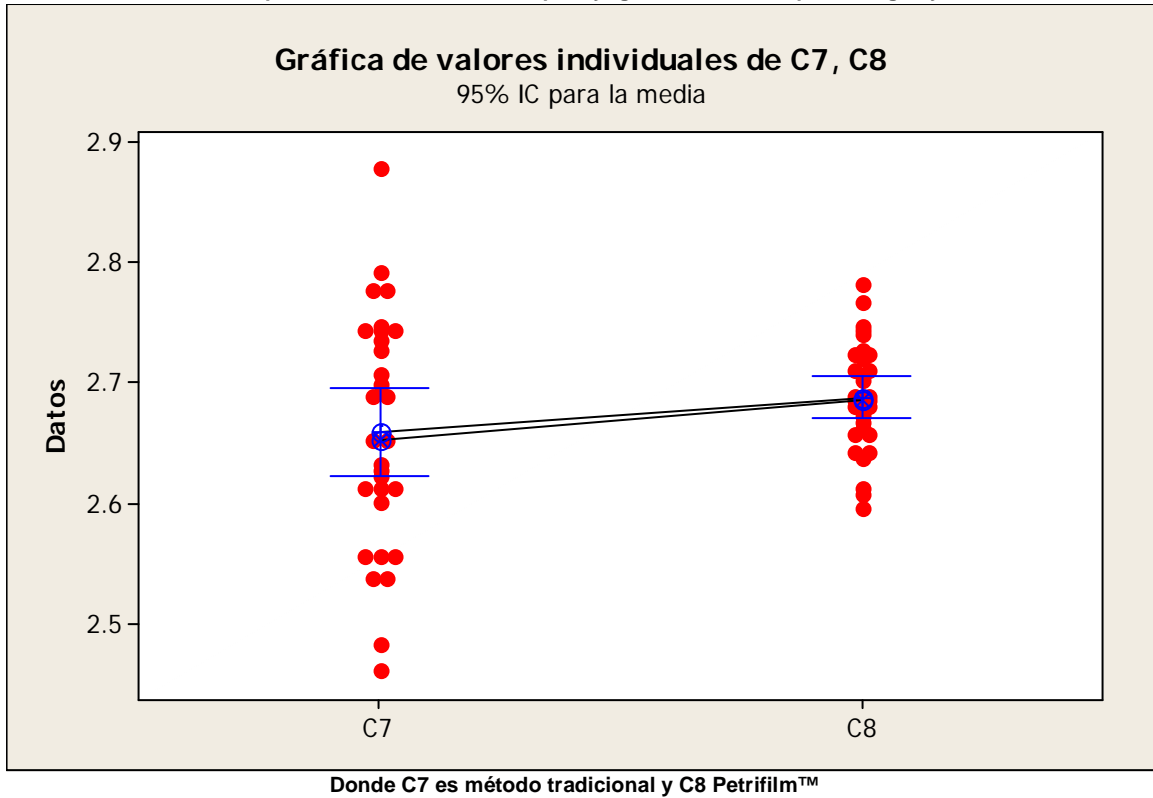
Para coliformes totales y hongos y levaduras vemos no existe diferencia significativa entre ambos métodos por lo que es indistinto el uso de cualquiera de éstos en el análisis microbiológico.

En las gráficas número 14 y 15 se aprecia que ambos métodos tienen una dispersión de datos en el área similar, las medias no difieren mucho entre sí, por lo tanto, los dos métodos tienen un comportamiento y repetibilidad parecidos tanto en el análisis de coliformes totales u hongos y levaduras.

Gráfica 14. Gráfica de valores individuales en puntos de ambos métodos para yogur bebible fresa coliformes totales.



Gráfica 15. Gráfica de puntos de ambos métodos para yogur bebible fresa para hongos y levaduras.



5.3.5. Yogur de Fresa.

Tabla 16. Resultados del análisis microbiológico para la Validación en yogur de fresa.

Indicador		Método Tradicional UFC/mL	Petrifilm™ UFC/mL
Mesófilos aerobios	Promedio (x)	---	---
	Control x	810	810
	Blanco Producto x	<10v.e	
	Inóculo teórico	800-1000	
Hongos y levaduras	Promedio (x)	160	300
	Control x	240	320
	Blanco de Producto x	<10v.e.	
	Inóculo teórico	400-500	

v.e. valor estimado

Al igual que en el caso del yogur bebible de fresa hay inhibición microbiana pues es el mismo producto pero con diferente estado de agregación. En la determinación de mesófilos aerobios no hay valores que analizar ya que no hubo crecimiento alguno ni en las placas Petrifilm™ AC ni en las cajas Petri con el agar cuenta estándar; como los controles de ambos métodos se obtuvo crecimiento y se recuperó el inóculo calculado, se piensa que hay efecto inhibitorio de bacteriocinas, lo que se explica con más detalle en el apartado 5.4.

Para esta a matriz, si se hizo dilución 10^{-1} antes de inocular, lo cual diluye también a los inhibidores y el efecto fue mucho menor que en el caso del yogur bebible.

Experimentalmente se inocularon de 400 a 500 UFC/mL de hongos y levaduras; de acuerdo con la tabla número 16 se observa que se inoculó menos de lo que teóricamente se pensó pues el recuento de los controles es menor: 240 UFC/mL para MT y 320 en las placas Petrifilm™YM, notando así que la recuperación en placas es mayor.

Tabla 17. Análisis estadístico t-pareada para yogur de fresa.

Indicador	t- tablas	t-pareada experimental	Interpretación
Mesófilos aerobios	2.045	---	Hay diferencias significativas entre MT y MP
Hongos y levaduras		7.6910	Hay diferencias significativas entre MT y MP

Al igual que en el caso del yogur bebible no hay datos para analizar estadísticamente por efecto de la inhibición, ambos métodos presentan las mismas dificultades.

Para hongos y levaduras existe diferencia significativa entre los dos métodos ya que la t-pareada experimental es mayor. En esta determinación, Petrifilm™YM tiene 45.30% más de recuperación que el método tradicional establecido en normas.

Al observar la gráfica número 16 la media de los datos para hongos y levaduras es más alta y la dispersión de valores es menor para Petrifilm™YM que para método tradicional, por lo tanto, Petrifilm™YM tiene mejor repetibilidad.

5.3.6. Resumen del análisis estadístico de la Validación.

En la siguiente tabla se presenta el resumen de todas las pruebas con los diferentes productos donde se observa en qué determinaciones se rechaza o acepta la hipótesis. Si se rechaza H_0 , se indica cual de los dos métodos tiene un mejor desempeño y cómo se comparan en repetibilidad.

Tabla 17. Validación del metodo Petrifilm™ frente a Métodos tradicionales, utilizando la prueba t-Student.

Grupo Indicador	Valor t	Interpretación	Mejor desempeño	% de recuperación	Repetibilidad
PetiZoo mora					
AC	1.9859	Sin diferencia sinificativa	----	----	Mejor MT
CC	5.351	Hay diferencias entre MT y PF	MT	21.16	Mejor MT
YM	3.808	Hay diferencias entre MT y PF	PF	16.33	Mejor MP
Jugo de Naranja Natural'es					
AC	1.914	sin diferencia	----	----	MT=MP
CC	12.557	Hay diferencias entre MT y PF	MT	27.95	MT=MP
YM	6.081	Hay diferencias entre MT y PF	PF	25.45	MT=MP
Aqua-frut uva					
AC	3.919	Hay diferencias entre MT y PF	PF	6.84	Mejor MT
CC	13.549	Hay diferencias entre MT y PF	PF	27.63	Mejor MT
YM	3.215	Hay diferencias entre MT y PF	PF	13.42	MT=MP
Yogurt de fresa					
AC	---	Sin datos por efecto inhibidor de producto	MT=PF *	-----	MT=MP
YM	7.691	Hay diferencias entre MT y PF	PF	45.30	Mejor MP
Yogurt bebible de fresa					
AC	---	Sin datos por efecto inhibidor de producto	MT=PF *	-----	MT=MP
CC	1.164	sin diferencia	MT=PF **	-----	Mejor MP
YM	1.595	sin diferencia	MT=PF **	-----	Mejor MP

MT = método tradicional; **PF** = Petrifilm™

AC = mesófilos aerobios; **CC** = coliformes totales; **YM** = hongos y levaduras

* Sin diferencia pero ambos métodos presentan dificultades semejantes.

** Sin diferencia significativa, ambos son útiles y pueden usarse con resultados semejantes.

Capítulo 6. Análisis de Resultados.

Con base en el objetivo de esta investigación que ha sido validar las placas Petrifilm™ para la determinación de indicadores microbiológicos en productos específicos, analizaremos primero los productos que no presentaron diferencias significativas en el análisis de los indicadores microbiológicos con método tradicional y Petrifilm™:

No hay diferencias significativas entre ambos métodos para el análisis de mesófilos aerobios en *PetiZoo* sabor mora y jugo de naranja *Natural'es*; no hay diferencias significativas en el análisis de coliformes totales ni en el de hongos y levaduras del yogur bebible de fresa. Por lo tanto en estos casos se puede utilizar cualquiera de los dos métodos.

El método tradicional fue mejor para el análisis de coliformes totales de *PetitZoo*, jugo de naranja *Natural'es* y yogur bebible de fresa, ya que se tiene mayor recuperación en las pruebas con población conocida y las colonias se desarrollaban mejor.

Petrifilm™ es mejor para el análisis de hongos y levaduras en *PetiZoo* sabor mora, jugo de naranja *Natural'es* y yogur de fresa. Petrifilm es mejor para la determinación de todos los indicadores en el producto *Aqua-frut* sabor uva.

Adicionalmente se pueden informar las conclusiones centradas en los indicadores. En general para hongos y levaduras es mejor Petrifilm™ porque tiene una mejor recuperación en pruebas con población conocida y porque es más fácil la detección de colonias para el recuento, ya que en las placas Petrifilm™YM las colonias de levaduras y hongos son definidas y claras, no se confunden con las partículas de alimento; a las 72 h las colonias de levaduras aparecen de forma clara y a los 5 días las de los hongos. En comparación con el método tradicional en el cual las colonias de levaduras no se distinguían aún a las 72 h o se confunden con partículas de alimento, lo que con frecuencia hace necesario un examen microscópico para diferenciarlas.

En el análisis de mesófilos aerobios para yogur de fresa y yogur bebible de fresa, ambos métodos son afectados por la inhibición bacteriana provocada por los productos. No se obtienen datos para hacer el análisis estadístico, pero el problema no es debido a la metodología sino al producto mismo, por lo tanto, los mesófilos aerobios no son un buen indicador para este tipo de productos.

En cuanto a la determinación de coliformes totales, la interpretación de las placas Petrifilm™CC es muy fácil. No existe diferencia significativa entre ambos métodos en uno de los productos analizados. En dos productos resultó mejor el método tradicional debido a la mayor recuperación y definición de las colonias.

Es importante la validación de los métodos ya que es indispensable saber si el método seleccionado posee la misma eficiencia, repetitibilidad y reproducibilidad que los métodos ya establecidos en la normativa del país. Una vez validado el método se puede proponer la inclusión como método oficial aceptado o al menos, se puede utilizar internamente, con mucha mayor productividad y confianza. Con los métodos rápidos de recuento, evolucionamos en el campo de la ciencia pues en el mundo actual se prefieren resultados rápidos y seguros.

En resumen, el presente estudio ha permitido validar el método Petrifilm frente a los métodos tradicionales para la determinación de mesófilos aerobios, coliformes totales y de hongos y levaduras en las matrices estudiadas, demostrando que los resultados son equivalentes en los recuentos de mesófilos aerobios y en la mayoría de los casos, para hongos y levaduras. Cuando existe diferencia significativa entre ambos métodos de prueba analizados, Petrifilm tiene mejor desempeño, excepto en la determinación de coliformes, donde si existe diferencia significativa y tiene mejor desempeño el método tradicional.

Capítulo 7. Conclusiones.

En general se puede concluir que el método tradicional tiene un mejor desempeño para el análisis de coliformes totales, Petrifilm™ es mejor para el análisis de hongos y levaduras, y ambos métodos se desempeñan de igual manera para el análisis de mesófilos aerobios. Para llegar a esta conclusión se tomó en cuenta que dicha metodología presentara una mayor repetibilidad, menor variación, mayor sensibilidad y mayor reproducibilidad de datos en el análisis microbiológico.

Se logró establecer, estandarizar y optimizar la metodología con placas Petrifilm™ para el análisis de las matrices aquí presentadas, así como conocer las ventajas de este método, las cuales consisten en una disminución del tiempo en la experimentación y el ahorro de material y medios de cultivo, y las limitaciones que son los bajos recuentos en el análisis de coliformes totales y la inhibición bacteriana por parte de los productos fermentados.

Capítulo 8. Propuestas a Futuro.

Como habitualmente sucede en la ciencia, hemos encontrado algunas respuestas pero seguimos teniendo preguntas que no se han resuelto a lo largo de esta tesis experimental y que seguramente serán abordadas por el mismo equipo o por alguien más; algunas sugerencias serían:

En la determinación de mesófilos aerobios en el jugo de naranja *Natural'es*, se dificulta el recuento de colonias debido a la presencia de bacterias con crecimiento extendido que además licuan el gel e invaden gran parte de la placa; consideramos que si se amplía el área de crecimiento, se podrían apreciar mejor todas las colonias y sería fácil de lograr si se utilizan los difusores grandes (los usados en la determinación de hongos y levaduras). Cabe mencionar que esta dificultad también se presenta en método tradicional, pues las colonias de crecimiento extendido invaden gran parte del agar o bien en su totalidad.

En algunos productos, como jugos, están teniendo cada vez más importancia los microorganismos esporulados. Será muy útil establecer la metodología adecuada para determinarlos en estas matrices.

Bibliografía.

- Barembuem C. 2003. Guía para Validación de Métodos de Ensayo, Organismo Argentino de Acreditación, Argentina, 26/09/2003.
- Barrantes, X., D. Railey, M.L. Arias y C. Chaves. 2004. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. *ALAN*, sep. 2004, vol.54, no.3, p.293-297. Disponible a través de internet en: http://www2.bvs.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222004000300006&script=sci_arttext&tlng=es
- Branda, J.A. and A. Kratz. 2006. Effects of Yeast on Automated Cell Counting: Materials and Methods. *American Journal of Clinical Pathology*. 2006. 126(2):248-254. Disponible en Internet a través de Medscape en: http://www.medscape.com/viewarticle/541508_2
- Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de los Alimentos. Disponible a través de internet en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tecnic-Basicas-Coliformes-en-placa_6528.pdf
- Camacho, A., M.Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. 2011. Técnicas para el Análisis Microbiológico de los Alimentos Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Chordi A. 2011. Curso de Métodos Rápidos en Microbiología De Alimentos Y Agua. Universidad de Salamanca, España. Disponible a través de internet en: <http://fundacion.usal.es/es/index.php/inicio/formacion-especializada/cursos-biosanitarios/metodos-rapidos-en-microbiologia-de-alimentos-y-agua/informacion-general>
- Codex Alimentarius. 2003. Norma del Codex para Leches Fermentadas. CODEX STAN 243-2003. Disponible a través de internet: http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp
- Cuesta A. 2006. Características de Resultados de Medición de los Métodos Microbiológicos. FAO Oficinal Regional para América Latina y el Caribe. Disponible a través de la internet en: www.rlc.fao.org/es/inocuidad/codex/rla3014/pdf/presen8.pps
- De La Cruz, I. 2004. Desinfección de Agua Potable con Radiación Solar, Universidad de las Américas Puebla. Disponible a través de internet en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lic/de_l_ij/capitulo2.pdf
- FAO. 1999. ¿Qué es el Codex Alimentarius? Grupo Editorial, Dirección de Información de FAO. Disponible a través de Internet en: http://www.fao.org/docrep/w9114s/W9114s01.htm#P0_0

- Forsythe, S.J & P.R. Hayes. 2002. Higiene de los Alimentos, microbiología y HACCP. Acribia, Zaragoza.
- Hirata Polanco, M.E. 2006. ¿Por qué validar métodos analíticos? Instituto Argentino de Normalización. Disponible a través de internet: <http://www.scribd.com/doc/4925527/porque-validar-metodos-analiticos> .
- Kleiman, E. 2011. Manipulación Higiénica de los Alimentos. Oficina Regional de América Latina y el Caribe. FAO. UNO. Disponible a través de Internet en: <http://www.rlc.fao.org/es/nutricion/arg3101/pdf/ean06.pdf>
- Leotta, G. 2009. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos, Revista Argentina de Microbiología. Disponible a través de internet en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v41n2/v41n2a01.pdf>
- Maturin, L.J. 1998 (F.U.A.: 2009). Inhibitory Substances in Milk, Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 20A. Disponible a través de Internet en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM072661#authors>
- Mossel A., 2003, Microbiología de los Alimentos, 2 edición. Editorial Acribia, España.
- Norma ISO 17025. Generalidades SOBRE SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LABORATORIOS. Disponible a través de internet en: http://www.inha.sld.cu/Documentos/Sistema_de_Calidad.pdf
- OMS, 2011, Inocuidad Alimentaria. Disponible a través de internet en: http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys_es.pdf
- PANAFTOSA. 2010 Inocuidad Alimentaria. Disponible a través de internet: <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?cd=211&id=65>
- Pascual M. del R. 2000. Microbiología para Alimentos y Bebidas. 2 ed. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.
- Pedrero, 1989. Evaluación Sensorial de los Alimentos. Métodos analíticos, Editorial Alhambra Mexicana, México.
- Pisabarro, A. G. 2009. Notas de Microbiología de Alimentos. Métodos Generales de Análisis de Alimentos. Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. Disponible a través de Internet en: <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/11-metodos%20analiticos%20generales.htm>
- PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-218-SSA1-2009, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Publicada en el DOF el 22 de diciembre 2010.

- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Dirección General de Bienes y Servicios. México. Publicada en el DOF el 10 de noviembre de 1995.
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana Nom-110-Ssa1-1994, Bienes Y Servicios. Preparación Y Dilución De Muestras De Alimentos Para Su Análisis Microbiológico. Publicada en el DOF el 10 de mayo de 1995
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA-1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Dirección General de Bienes y Servicios. México. Publicada en el DOF el 10 de mayo de 1995
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Dirección General de Bienes y Servicios. México. Publicada en el DOF el 10 de mayo de 1995.
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Dirección General de Bienes y Servicios. México. Publicada en el DOF el 21 de noviembre de 1997.
- Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. Dirección General de Bienes y Servicios. México. Publicada en el DOF el 16 de octubre de 2000.
- Secretaría de Salud. Norma Mexicana NMX-F-444-1983. Alimentos. Yoghurt o Leche Búlgara. Dirección General De Normas. Disponible a través de internet en:
<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-444-1983.PDF>
- 3M México. 2006. Placas Petrifilm™3M™. 3M en el mundo. Cuidado de la Salud. Disponible a través de Internet en:
<http://www.3m.com/cms/MX/es/0-253/kRecrFS/view.html>

ANEXO I

Definiciones Estadísticas.

Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

Valor verdadero convencional (de una magnitud): valor atribuido a una magnitud particular, y aceptado a veces por convención, porque la representa, con un incertidumbre apropiada, para un fin dado.

Mesurando: magnitud particular sometida a medición

Incertidumbre de medida: Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando.

Exactitud de una medición: proximidad entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mesurando.

Repetibilidad (de los resultados de las mediciones): proximidad entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando, realizadas bajo las mismas condiciones de medición. (Aplicación de un mismo procedimiento, a un mismo objeto, por el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, con el mismo equipamiento instrumental, en el mismo lugar).

Reproducibilidad: Proximidad entre los resultados de mediciones de un mismo mesurando, realizadas bajo distintas condiciones de medición.

Precisión intermedia: magnitud que relaciona la variación en los resultados observados cuando uno o más factores, tales como tiempo, equipamiento, operador, varían dentro de un mismo laboratorio

Límite de detección: es la menor cantidad que puede ser distinguida del fondo con cierto nivel de confianza especificado. Para un resultado analítico que es muy cercano al valor del blanco, se plantea la duda de si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito. La señal del fondo

es producida es producida por el blanco y exhibe ruido. El límite de detección (LD) corresponde a una señal k veces la desviación estándar del ruido del fondo. Típicamente el valor de k es igual a 3 ($LD=3sF$). Los valores por encima del LD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables

Límite de cuantificación: es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un dado nivel de confianza. Para el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito. El límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el LD ($LD= 3 s F$), según cada caso. (Organismo Argentino de Acreditación, 2003).

Anexo II

Extractos de las normas Aplicables a los Productos Analizados.

NMX-F-444-1983. ALIMENTOS. YOGUR O LECHE BÚLGARA. DEFINICIONES

Para los efectos de esta Norma se establecen las siguientes definiciones:

1. Yogur natural o leche búlgara: Producto lácteo preparado a partir de leche entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida en extractos secos por medio de la concentración de ésta o agregando leche en polvo, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por la fermentación obtenida de la siembra en simbiosis de los fermentos lácteos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
2. Yogur o leche búlgara con fruta y aromatizado: Producto definido en 1 que ha sido adicionado de frutas o preparados a base de frutas y saborizantes permitidos por la Secretaría de Salubridad y Asistencia, debe llevar un, 75 % mínimo de yogur.
3. Yogur o leche búlgara aromatizado: Producto definido en 1 al que se le haadicionado saborizantes permitidos por la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Especificaciones Microbiológicas.

5El producto objeto de esta Norma no debe contener microorganismos patógenos, toxinas microbianas, e inhibidores microbianos ni otras sustancias tóxicas que puedan afectar la salud del consumidor o provocar deterioro del producto.

El Yogur o leche búlgara en sus tres tipos, tres subtipos; único grado de calidad debe cumplir con las siguientes especificaciones microbiológicas:

- Bacterias Lácticas vivas. Mínimo 2,000.000 UFC/g
- Organismos coliformes. Máximo 10 UFC/g
- Hongos. Máximo 10 UFC/g
- Levaduras. Máximo 10 UFC/g

NMX-F-118-1984. ALIMENTOS PARA HUMANOS. BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS
JUGO DE NARANJA ENVASADO.

DEFINICIÓN

Para los efectos de esta Norma se establece la siguiente definición: Se entiende por Jugo de Naranja envasado al producto obtenido por la expresión de naranja de la variedad (*Citrus sinensis* L.) sin diluir, sin concentrar, no fermentado y sometido a tratamiento adecuado que asegure su conservación en el envase. Puede contener pulpa de frutas finamente dividida en cantidad mínima y ser agregado de aditivos alimentarios permitidos y estar exento de corteza, semillas y sedimentos de materia extraña.

Microbiológicas

El Jugo de Naranja debe estar exento de microorganismos patógenos y de toda sustancia tóxica producida por los mismos. No debe contener organismos no patógenos que puedan desarrollarse en condiciones normales de almacenamiento, fuera de los límites que establezca la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

NORMA Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

Especificaciones microbiológicas.

MICROORGANISMO	LIMITE UFC/g o ml
Mesofílicos aerobios	100
Mohos y levaduras	25

Anexo III

Composición de Medios de Cultivo.

AGAR CUENTA ESTANDAR. BACTO PLATE COUNT AGAR. (Difco)

Fórmula:

Ingredientes por litro.

Triptona.....5 g

Extracto de Levadura.....2.5 g

Dextrosa (Glucosa).....1 g

Agar.....15 g

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

Método de preparación:

- 1) Suspender 23.5 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
- 2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
- 3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C)

(UAM Azcapotzalco, Departamento Microbiología, 2004)

AGAR-ROJO- VIOLETA-BILIS-LACTOSA (RVBA)

Formula

Ingredientes cantidades

- Peptona 7,0 g
- Extracto de levadura 3,0 g
- Lactosa 10,0 g
- Sales biliares 1,5 g
- Cloruro de sodio 5,0 g
- Rojo neutro 0,03 g
- Cristal violeta 0,002 g
- Agar 15,0 g
- Agua 1,0 L

Preparación:

Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos.

Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor.

Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos.

Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C.

Evitar el sobrecalentamiento del medio.

No debe esterilizarse en autoclave.

Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación.

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante. (NOM-113-SSA1-1994)

AGAR DEXTROSA SABOURAUD. SABOURAUD DEXTROSA AGAR. (Difco)

Fórmula:

Ingredientes por litro.

Neopeptona, Difco.....10 g

Dextrosa.....40 g

Agar.....15 g

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25 °C.

Método de preparación:

- 1) Suspender 65 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
- 2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
- 3) Distribuir en la forma deseada.
- 4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

No recalentar para evitar el ablandamiento del medio.

(UAM Azcapotzalco, Departamento Microbiología, 2004)

Anexo IV.

Neutralización de los productos LALA.

Tabla 1. Neutralización productos.

Producto	Dilución	µL NaOH 1N
Yogur sólido de fresa	1:10	800
Yogur bebible de fresa	10:10	500
<i>Petit suiss</i> sabor mora	1:10	700
<i>AquaFrut</i> sabor uva	8:10	**
Jugo de naranja pasteurizado	1:10	150

** Se neutralizó con buffer de fosfatos pH 7

Anexo V.

Ejemplo de Cálculo para el Conteo de Esporas de la cepa *Penicillium* sp.

Tabla 2. Conteo de Esporas por Campo en la dilución 1:10

Campo	No. esporas	Campo	No. esporas
1	7	9	11
2	8	10	7
3	6	11	30
4	9	12	14
5	6	13	16
6	9	14	6
7	11	15	5
8	18		

Volumen examinado: 50 μL

Promedio de esporas por campo 11

Diámetro de Campo = 350 μm

Radio de Campo = 175 μm

Superficie de Campo = $\pi \times r^2 = 3.1416 \times (175 \mu\text{m})^2 = 96 \times 10^3 \mu\text{m}^2$

Tamaño de cubre objetos = 24 $\times 10^3 \mu\text{m}$ por lado

Área de Cubre objetos = $L \times L = (24 \times 10^3 \mu\text{m})^2 = 576 \times 10^6 \mu\text{m}^2$

No. de campos = $\frac{\text{área de cubre objetos}}{\text{superficie de campo}} = \frac{576 \text{E}6 \mu\text{m}^2}{96 \text{E}3 \mu\text{m}^2} = 5.98 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ campos

No. esporas = No. de campos x Promedio esporas por campo

No. esporas = 6×10^3 campos x 11 esporas por campo = 66×10^3 esporas

$$\left(\frac{66 \text{ E}3 \text{ esporas}}{50 \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{L}}{X} \right)$$

por lo tanto $X = 13.2 \times 10^5$ esporas en el tubo de la dilución 1:10

entonces en el tubo de la dilución 1:10 tenemos $13 \times 10^5 / \text{mL}$

si queremos colocar 20 esporas por mL debemos tomar 190 μL de tubo con la dilución 10^{-4}

Anexo VI.

Datos para Elaborar Gráficas 2 y 3.

Tabla 6. Datos para elaborar la gráfica 2, densidad óptica vs ufc/mL

Diluciones	Densimat D.O.	Muestra 1	Muestra 2	Promedio x	[diluciones]
10 ⁻¹	0.8	**	**	**	96x10 ⁶
10 ⁻²	0.2	**	**	**	96x10 ⁵
10 ⁻³	0.1	**	**	**	96 x10 ⁴
10 ⁻⁴	0.1	**	**	**	96 x10 ³
10 ⁻⁵	**	**	**	**	96 x10 ²
10 ⁻⁶	**	693	553	623	96 x10 ¹
10 ⁻⁷	0.3	101	92	96	96
10 ⁻⁸	0.2	22	9	15	
10 ⁻⁹	0.1	3	3	3	
10 ⁻¹⁰	0.1	0	1	1	

**No se realizó

Tabla 7. Datos para elaborar la gráfica 3, densidad óptica vs ufc/mL

Diluciones	Densimat D.O.	Muestra 1	Muestra 2	Promedio x	[diluciones]
1:3	1.8	**	**	**	56 x 10 ⁹
1:4	1.2	**	**	**	42 x 10 ⁹
1:6	0.9	**	**	**	28 x 10 ⁹
10 ⁻¹	0.7	**	**	**	17 x 10 ⁸
10 ⁻²	0.2	**	**	**	17 x 10 ⁷
10 ⁻³	0.2	incontables	incontables	incontables	17 x 10 ⁶
10 ⁻⁴	0.1	incontables	incontables	incontables	17 x 10 ⁵
10 ⁻⁵	**	incontables	incontables	incontables	17 x 10 ⁴
10 ⁻⁶	**	incontables	incontables	incontables	17 x 10 ³
10 ⁻⁷	**	373	300	337	17 x 10 ²
10 ⁻⁸	**	173	167	170	170
10 ⁻⁹	**	101	64	83	
10 ⁻¹⁰	**	27	36	32	

**No se realizó

Para hacer el cálculo, en las tablas anteriores se selecciona el promedio que esté dentro del límite de detección que es de 50 a 150UFC/mL. En el caso de la gráfica 2 es el valor de la dilución 10⁻⁷ que es de 96, entonces decimos que la concentración de microorganismos para esa dilución es de 96, entonces para la dilución anterior será el mismo valor pero con un logaritmo base diez más, así hasta llegar a la concentración de la cepa original que debe tener el inverso del exponente de la dilución que nos arrojo el resultado entre el intervalo.