

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE RECuento EN PLACA
TRADICIONAL Y PLACAS 3M™ PETRIFILM™ PARA LA ENUMERACIÓN DE
MOHOS Y LEVADURAS EN MATRICES ALIMENTARIAS**

ANGIE ELIANA REYES NÚÑEZ

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA**

2020

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE RECuento EN PLACA
TRADICIONAL Y PLACAS 3M™ PETRIFILM™ PARA LA ENUMERACIÓN DE
MOHOS Y LEVADURAS EN MATRICES ALIMENTARIAS**

ANGIE ELIANA REYES NÚÑEZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito para optar por el título de
MICROBIÓLOGO**

TUTORES:

FANNY HERRERA ARIAS

DOCENTE, UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

LAURA GUERRA GONZÁLEZ

CORDINADORA DE LABORATORIO

KEYNER YOWANIS CERVANTES

ANALISTA LIDER MICRBIOLOGÍA

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA**

2020

Nota de aceptación:

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Pamplona, 15 de Diciembre 2020.

AGRADECIMIENTOS

A Dios,

Porque aunque largo sea el camino sus promesas son verdaderas, porque sus planes son perfectos, porque su misericordia y su amor se renuevan cada día y él cumplirá su propósito en mí.

A mis padres,

Por su apoyo incondicional, por su amor infinito, por su entrega, por nunca dudar y siempre confiar en mí y por ser un ejemplo a seguir. Mil gracias.

A mis tutores,

Fanny Herrera, Laura Guerra y Keyner Cervantes, gracias por su apoyo y guía para la realización de este trabajo y acompañamiento durante el tiempo de pasantías, mil gracias por hacer parte de mi formación como profesional y por cada día enseñarme cosas nuevas.

A mis compañeras,

Kelly Mindiola, Nini Ortiz, Julieth Moya y Alexandra López, muchas gracias por toda su paciencia, por todas sus enseñanzas y por brindarme su amistad, confianza y apoyo en esta etapa de mi formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. Introducción	10
2. Objetivos	12
2.1 Objetivo general.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. Justificación y planteamiento del problema	13
4. Marco referencial	15
4.1 Marco teórico	15
4.1.1 Hongos	15
4.1.1.1 Generalidades	15
4.1.2 Métodos de detección de mohos y levaduras.	16
4.1.2.1 Enumeración o recuento en placa	16
4.1.2.2 Enumeración en placas 3M™ Petrifilm™.	17
4.1.2.3 Otros métodos de detección.	17
4.1.3. Exigencias gubernamentales.....	17
4.1.4 Estudio de comparación de métodos	18
4.1.4.1 Estudio de comparación de métodos	18
4.1.4.1.1 Medición del sesgo (E-bias)	18
4.1.4.1.2 Análisis de regresión lineal.....	18
4.1.4.1.3 Prueba Fisher	18
4.1.4.2 Validación	18
4.2 Antecedentes	19
4.3 Marco legal	21
5. Metodología	23
5.1 Selección de muestras	23
5.2 Preparación del inóculo	23
5.3 Preparación y acondicionamiento de las muestras.....	23
5.4 Inoculación y siembra de las matrices alimentarias	24

5.5 Análisis estadístico	25
5.5.1 Medición del sesgo (eBias)	25
5.5.2 Análisis de regresión lineal	26
5.5.3 Prueba F	27
6. Resultados y análisis	28
6.1 Resultados	28
6.1.1 Evaluación de la eficiencia de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el análisis de levaduras	28
6.1.2 Evaluación de la eficiencia de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el análisis de mohos.....	31
6.1.3 Comparativa del método de recuento en placa entre medios de cultivo tradicionales y placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para la enumeración de mohos y levaduras	34
6.1.4 Gastos económicos relacionados al uso de los medios de cultivo tradicionales y 3M™ Petrifilm™ RYM®	36
6.2 Análisis de resultados	38
7. Conclusiones	43
8. Recomendaciones	44
9. Referencias bibliográficas	45
10. Anexos	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Muestras y medios de siembra correspondientes.....	23
Tabla 2. Promedios de Recuento en placa del método de referencia y método alternativo para levaduras	27
Tabla 3. Prueba F del método de referencia (YGC) y método alternativo para la enumeración de levaduras	28
Tabla 4. Recuentos de levaduras en los puntos de análisis	28
Tabla 5. Análisis de regresión para recuento de levaduras	29
Tabla 6. Calculo E-bias para las placas Petrifilm en el recuento de levaduras	30
Tabla 7. Promedios de Recuento en placa del método de referencia y método alternativo para mohos	30
Tabla 8. Prueba F del método de referencia (YGC) y método alternativo para la enumeración de mohos.....	31
Tabla 9. Recuentos de mohos en los puntos de análisis	32
Tabla 10. Análisis de regresión para recuento de levaduras	32
Tabla 11. Calculo E-bias para las placas Petrifilm en el recuento de mohos.....	33
Tabla 12. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo para la enumeración de mohos.....	34
Tabla 13. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo para la enumeración de levaduras	34
Tabla 14. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo (YGC) para la enumeración de mohos.....	35
Tabla 15. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo (YGC) para la enumeración de levaduras	35
Tabla 16. Estudio comparativo de costos de metodología referenciada en la norma nacional y el medio de cultivo ara el método alternativo YCG y placas 3M™ Petrifilm™ RYM®	36
Tabla 17. Análisis de costo entre el análisis utilizando medio de cultivo tradicional y placas 3M™ Petrifilm™ RYM®	37

LISTA DE GRAFICOS

	Pág.
Grafica 1. Curva de regresión lineal para el recuento de levaduras	29
Gráfico 2. Curva de regresión lineal para el recuento de mohos.....	32
Grafica 3. Diagrama de barras para la comparación de recuentos entre método de referencia y método alternativo con placas 3M™ Petrifilm™ RYM®	39
Grafica 4. Diagrama de barras para la comparación de recuentos entre método de referencia y método alternativo con placas tradicionales de YGC	39

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Datos crudos del análisis comparativo	49
Anexo 2. Recuento de la escala McFarland	50
Anexo 3. Análisis microbiológico inicial.	50

1. Introducción

La industria de la producción de alimentos y bebidas es uno de los sectores económicos de mayor potencial; sin embargo estos pueden presentar un riesgo para la salud pública debido a la presencia de microorganismos en este tipo de productos. Los microorganismos pueden desencadenar casos peligrosos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), debido a la contaminación de estos y, por lo tanto, no deben estar presentes en la matriz de interés no debe superarse un número específico (Chulze, 2017).

Un grupo microbiano importante causante de efectos adversos en los alimentos son los mohos y las levaduras. Estos microorganismos poseen amplias condiciones de crecimiento aunque la mayoría de las levaduras y mohos son aerobios obligados, el requerimiento de pH para el crecimiento es amplio, estos pueden crecer entre un pH 2 y un pH superior a 9, el rango de temperatura de crecimiento oscila entre 10-35 ° C, con algunas especies capaces de crecer a temperaturas superiores e inferiores. Los requisitos de actividad del agua (a_w) de los mohos son relativamente bajos, la mayoría de las especies pueden crecer con un a_w de 0,85; sin embargo las levaduras requieren de una mayor actividad. Una característica importante de este grupo microbiano es la producción de micotoxinas, debido a que son metabolitos que difícilmente se destruyen y pueden permanecer en el alimento teniendo efectos adversos sobre la salud del consumidor (FDA, 2001).

Los laboratorios de análisis generalmente dedican sus actividades al control de calidad de medicamentos, alimentos, cosméticos y afines, que con los resultados generados apoya a sus clientes en la comercialización nacional e internacional en el cumplimiento de los requisitos legales y en la certificación de productos. En este sentido, los laboratorios dedicados a este tipo de labor ofrecen diferentes tipos de análisis, dentro de los cuales se ofertan los análisis microbiológicos, que son fundamentales para determinar factores como: higiene, focos de contaminación e inocuidad del producto. Uno de análisis más comunes es la enumeración de mohos y levaduras regidas por las normas ISO 21527-1 e ISO 21527-2 y la norma técnica Colombiana (NTC) 5698 – 1 y 5698 – 2.

Los parámetros normativos establecen que la enumeración de colonias para mohos y levaduras debe llevarse a cabo de acuerdo con la actividad del agua del alimento a analizar así mismo, se fijan los medios de cultivos correspondientes para el análisis. Los medios de cultivo establecidos en las normas anteriormente mencionadas son: Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) y Dicloran-glicerol (DG18) no obstante, estos presentan algunos inconvenientes en su implementación debido a sus costos elevados y gastos adicionales por el desecho de los mismos, por tal razón el uso de medios como extracto de levadura, glucosa-Clorafenicol (YGC) da solución a los inconvenientes anteriormente mencionados, además que permite recuperar satisfactoriamente las células viables presentes en los alimentos, dando como efecto la obtención de resultados viables, veraces y oportunos, eliminando inconvenientes mostrados por los medios sugeridos en la norma (ISO 2008).

En los últimos años en la industria se han desarrollado diferentes métodos de análisis para el recuento fácil, rápido y eficaz de microorganismos dando lugar a alternativas viables que generan resultados veraces y oportunos. Entre los métodos podemos encontrar las placas 3M™ Petrifilm™ que consisten en placas de recuento listas para usar disminuyendo la laboriosidad en el análisis, aumentando la productividad, disminuyendo costos en el uso de medios de cultivo y generando resultados confiables en el análisis de alimentos. Estos métodos de recuento rápido se han venido generando principalmente por la demanda y exigencias actuales en las industrias como las industrias productoras de alimentos, en la que se vela por garantizar la calidad e inocuidad de estos y proteger la salud del consumidor (3M FOOD SAFETY, 2016).

Los laboratorios de análisis dentro de los protocolos de recuento para mohos y levaduras establecen el uso de agar YGC y placas 3M™ Petrifilm™ RYM® aunque no es lo determinado en la normativa, los laboratorios garantizan su proceso operacional, asegurando la confiabilidad de sus resultados a través de estudios comparativos que permitan la verificación de estos. Dando lugar a resultados eficientes, asertivos, confiables y de calidad, eliminando los inconvenientes ya mencionados y brindando nuevas alternativas de análisis a sus clientes.

La industria ha ido evolucionando a fin de cumplir y satisfacer las necesidades del consumidor; sin embargo, las metodologías empleadas para llevar a cabo los análisis microbiológicos deben cumplir con criterios que permitan garantizar la veracidad de los resultados. Por ende, el objetivo del presente estudio fue realizar un análisis comparativo del método horizontal para el recuento en placa de mohos y levaduras en matrices alimentarias utilizando diferentes medios de cultivo y placas 3M™ Petrifilm™ RYM®, esto con el fin de garantizar que el uso de métodos alternativos como las placas de agar YGC y placas 3M™ Petrifilm™ RYM® cumplan a cabalidad con el propósito del análisis, así mismo este tipo de estudios abre paso a generar nuevas alternativas para el análisis de microorganismos que permitan obtener resultados rápidos, veraces y oportunos, de una forma más asequible y permitiendo al sector productor garantizar la calidad tanto de sus productos, como materias primas, además de la calidad microbiológica de sus procesos, tomar acciones correctivas para ofrecer al consumidor un alimento seguro y cumplir con los requisitos legales cada vez más exigentes.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general:

- Comparar técnicas de recuento en placa tradicional y placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para la enumeración de mohos y levaduras en matrices alimentarias.

2.2. Objetivos específicos:

- Evaluar la eficiencia de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el recuento de mohos y levaduras en alimentos.
- Establecer diferencias entre la capacidad de recuperación de los medios de cultivo tradicionales y las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el análisis mohos y levaduras en alimentos.
- Determinar la viabilidad económica de la implementación de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para la enumeración de mohos y levaduras en alimentos.

3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las estrategias de procesamiento, envasado y formulación de alimentos generalmente están diseñadas para inhibir el desarrollo de microorganismos que puedan contaminar, degradar o alterar los alimentos. Algunas de estas estrategias son: cambios en el pH, temperaturas de almacenamiento, reducción de oxígeno o reducción de la a_w . Sin embargo existen microorganismos capaces de superar estas barreras y continuar con su propagación. Un grupo importante causante de contaminación son los mohos y las levaduras, los cuales presentan una alta capacidad de adaptación a diferentes ambientes. Adicionalmente, los mohos y las levaduras pueden producir micotoxinas capaces de afectar tanto a humanos como a animales de abasto causando enfermedades de tipo crónico y pérdidas económicas al sector ganadero y agrícola (Snyder & Worobo, 2018).

El constante desarrollo de la industria de alimentos y la capacidad que tienen los grupos microbianos para crecer y proliferarse en estos, ha dirigido a este sector productivo a buscar alternativas de análisis que permitan obtener resultados más rápidos, coherentes, precisos y a su vez, cumplir las exigencias normativas de higiene y seguridad alimentaria que cada día se hacen más estrictas. Generalmente el análisis de mohos y levaduras en alimentos es una labor que requiere una gran cantidad de tiempo y material; así mismo, los medios de cultivo requeridos para el análisis como son el DG18 y DRBC presentan inconvenientes como: costos elevados, crecimientos escasos del microorganismo de interés debido a la presencia de inhibidores, suplementos adicionales y sustancias cancerígenas (Hamilton, 2020). Por ende, en la actualidad la industria de alimentos busca implementar metodologías para el análisis microbiológico que faciliten la obtención de resultados, metodologías económicas, fáciles y sencillas de cuantificar. Adicionalmente, estas metodologías deben ayudar a agilizar los procesos de verificación en la producción de alimentos garantizando la salud del consumidor a través de la inocuidad de los productos.

En el mercado existen metodologías alternas capaces de ofrecer solución a los inconvenientes presentados por las metodologías tradicionales de recuento; algunas de estas son el uso de otros medios de cultivo como en el YGC y por otro lado el uso placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el análisis microbiológico de mohos y levaduras. Potencialmente las placas de 3M™ Petrifilm™ permite obtener resultados rápidos, precisos y económicos, ya que disminuye el uso de materiales como cajas y medios de cultivo, además de que evita el uso de instrumentos como autoclaves que generan gastos de energía y agua (3M FOOD SAFETY, 2016).

Por ende, surge la necesidad de realizar un estudio comparativo entre placas de Petrifilm™ y el recuento tradicional utilizando diferentes medios de cultivo, estableciendo ventajas de la enumeración empleando estas placas listas para el recuento, permitiendo una metodología alternativa para la enumeración de mohos y levaduras de una forma rápida, consistente y eficaz, además de económico (3M FOOD SAFETY, 2016). De modo que, si las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® tienen la capacidad de recuperar el mismo número de células viables que los medios

utilizados tradicionalmente, ¿serán estas apropiadas para el análisis de mohos y levaduras en matrices alimentarias?

El estudio de estas alternativas de análisis es de vital importancia para generar metodologías económicas y viables, que garanticen a los usuarios resultados confiables, veraces y oportunos, además que permitan a las empresas de la industria alimentaria tomar de decisiones y acciones correctivas en los procesos de producción y que más empresas puedan realizar este tipo de análisis a sus productos; así mismo permite a laboratorios dedicados al análisis continuar con este tipo de examen y seguir brindando un servicio de calidad. Esto a su vez tendría un impacto en la salud pública ya que se garantiza la comercialización y distribución de alimentos dentro de los parámetros normativos microbiológicos, evitando casos de enfermedades transmitidas por alimentos y un colapso en el sistema de salud pública. La presente investigación abriría paso a consideración de nuevas metodologías igual de viables para ser aplicadas a las normativas nacionales e internacionales de recuento microbiano, lo cual representaría un aumento de las alternativas con las que contarían los laboratorios de referencia y laboratorios académicos para aplicar análisis microbiológicos.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 MARCO TEORICO.

4.1.1 Hongos

4.1.1.1 Generalidades

Los hongos son organismos eucariotas que poseen al menos un núcleo, membrana celular, retículo endoplásmico, mitocondrias y un aparato secretor. En la actualidad se han descrito más de 70.000 especies de hongos; sin embargo se estima que existen 1,5 millones de especies. Los hongos pueden ser aerobios obligados o facultativos, son capaces de degradar una amplia variedad de sustratos orgánicos en nutrientes solubles que son absorbidos e integrados a la célula. Además, los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares, de paredes rígidas y se reproducen de formas sexuales, asexuales o ambas. Los hongos comparten con los animales la capacidad de exportar enzimas hidrolíticas que descomponen los biopolímeros, que pueden absorberse para la nutrición (Estrada & Ramírez, 2019).

Los hongos cuentan con una pared celular conformada por polisacáridos, polipéptidos y quitina de consistencia rígida, a través de la cual pasan sustancias simples y solubles, producto de la acción enzimática externa. La pared celular en los hongos tiene gran plasticidad, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de cambios osmóticos (Blackwell, et al, 2012).

La forma en la que crecen los hongos depende de la cantidad y disposición de la macrovesículas y microvesículas; es decir, si se conectan en un punto originan una hifa y si se distribuyen en forma homogénea en la periferia origina una levadura. En este sentido, los hongos pueden ser macroscópicos o microscópicos; los hongos macroscópicos están formados por agregaciones miceliales formando cuerpos fructíferos o carpóforos, donde se localizan las estructuras de reproducción sexual. Una característica importante de los hongos filamentosos es la producción de esporas, que permite que los organismos sobrevivan como células resistentes durante períodos en los que las condiciones del medio no son propicias para el crecimiento. Las esporas de los hongos pueden liberarse activa o pasivamente para su dispersión mediante varios métodos eficaces (Estrada & Ramírez, 2019).

Este grupo microbiano generalmente se diferencia en mohos y levaduras. Los hongos filamentosos o mohos poseen un soma vegetativo similar al de las plantas; consta de filamentos microscópicos continuos más o menos alargados y ramificados que tienen paredes celulares definidas. Los mohos son heterótrofos, se alimentan de otros organismos. Los mohos tienen cuerpos filamentosos que penetran el suelo, desechos animales o los cuerpos vivos o muertos de plantas y animales. La morfología de los mohos no es fija, ya que algunos son dimórficos, pueden adoptar una morfología de levadura dependiendo de las condiciones ambientales; en otros el micelio de los mohos está constituido por células que contienen uno o dos núcleos; otros tienen micelio cenocítico, con muchos núcleos y está integrado por una célula multinucleada continua y tubular que puede o no ramificarse, también el micelio puede presentar septos y es tabicado. Por otro lado, las levaduras son

grupo heterogéneo de hongos microscópicos, las levaduras son hongos unicelulares, poseen morfología esférica o elíptica y miden de 3-10 µm de longitud. Muchas levaduras en determinadas circunstancias y dependiendo de la especie pueden producir hifas y pseudohifas; así mismo su distinción con los hongos filamentosos es muy subjetiva porque existen formas intermedias entre levaduras y hongos superiores típicos (Estrada&Ramírez, 2019). Las levaduras se reproducen tanto sexual como asexualmente, esta última es más común. En la reproducción sexual, una sola célula de levadura sufre meiosis y produce esporas haploides; estas esporas pueden recombinarse con otras esporas haploides, produciendo una célula diploide, el estado “normal” de la levadura. La reproducción asexual es el resultado de la mitosis en la que la célula simplemente produce otra copia de sí misma; esto se llama gemación (MicroPop, 2012).

Los mohos y las levaduras tienen la capacidad de crecer en un amplio rango de temperatura presentando un mejor desarrollo entre los 25-30°C, su requerimiento de pH se encuentra entre 2 y 9, los requerimientos de humedad de este grupo microbiano son bajos y pueden crecer a una actividad de agua menor o igual a 0,85. Las levaduras generalmente presentan crecimientos a las 24 o 36 horas después de su incubación, mientras que los mohos crecen más lentamente después de su inoculación en el medio tomando hasta 5 días para su crecimiento. Las levaduras pueden producir energía convirtiendo los carbohidratos en alcohol y dióxido de carbono además sintetizar carbono a partir de azúcares hexosa, por su parte los mohos secretan enzimas hidrolíticas con capacidad de degradar el almidón, celulosa y lignina en sustancias más simples para la absorción (McGinnis & Tyring, 2010).

Una peculiaridad de los hongos filamentosos es la producción de micotoxinas; estos son metabolitos producidos por varios mohos y tienen efectos considerables sobre la salud de las personas y la productividad de los animales en diversos países; por tanto, se hace indispensable el control de este grupo microbiano en alimentos y bebidas dirigidas al consumo humano y animal. Las principales especies de mohos capaces de producir micotoxinas son: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp; estos producen micotoxinas tales como: aflatoxinas, ocratoxinas A, fumonisinas, toxina T-2 y la Zearalenona, que son las toxinas detectadas con mayor frecuencia en los alimentos, muchos de los cuales se contaminan durante el transporte y almacenamiento (Humphreys, 2016).

Los hongos filamentosos se encuentran comúnmente asociados a reacciones alérgicas y problemas respiratorios; por su parte, las levaduras pueden causar infecciones en personas inmunodeprimidas, estas se encuentran involucradas en enfermedades como la criptococosis encontrada en un 7-9% de los pacientes con SIDA en los EE. UU (FDA, 2001). Durante mucho tiempo este grupo microbiano recibió poca atención en el diagnóstico clínico porque las infecciones que causaban no revestían extrema gravedad, pero en los últimos años ha aumentado la incidencia de infecciones fúngicas en pacientes sometidos a terapias inmunosupresoras y antibioterapia de amplio espectro (Blackwell, et al, 2012).

4.1.2 Métodos de detección de mohos y levaduras

4.1.2.1 Enumeración o recuento en placa

El método de enumeración en placa es una de los métodos más comunes para detectar y determinar el número de microorganismos presentes en un alimento contaminado. Este método ofrece múltiples ventajas para la enumeración de células viables presentes en la matriz alimentaria objeto de análisis, entre ellas podemos encontrar: disminución del error en el momento de recuento, los microorganismos pueden aprovechar mejor los nutrientes ofrecidos por el medio de cultivo, permite realizar subcultivos de forma sencilla, fácil visualización y diferenciación de las células microbianas; así mismo este método es ideal para el análisis de microorganismos aerobios como son la mayoría de mohos y levaduras. En el caso de hongos existen diferentes medios de cultivo disponibles en el mercado para realizar un análisis mediante recuento de placa, entre los cuales se encuentran: DG18, DRBC, YGC, OGY, M-GREEN, Sabouraud, PDA, Malta y Czapek. (FDA, 2001).

4.1.2.2 Enumeración en placas 3M™ Petrifilm™

Un método análogo a la enumeración en placa es uso de placas Petrifilm™, estos son productos actualmente disponibles en el mercado que permiten el recuento de microorganismos como mohos y levaduras de forma sencilla y rápida, con resultados fiables y certeros, así mismo se pueden utilizar para el análisis de una gran diversidad de microorganismos como: Enterobacterias, Coliformes, *E. coli*, *S. aureus*, entre otros. Estas placas están constituidas por películas, adhesivos y nutrientes de composición similar a los usados en las metodologías tradicionales, a fin de garantizar el crecimiento microbiano. El uso de este tipo de placas tiene muchas ventajas en cuanto a laboriosidad dentro del laboratorio, en primer lugar evita procesos de esterilización, preparación de medios de cultivo y disminuye el volumen de desechos generados, adicionalmente pueden ser utilizadas en una gran variedad de muestras, como muestras de alimentos, ambientales y aguas, así mismos ocupa un espacio reducido en la incubación debido a su pequeño tamaño. Estas placas son una alternativa más económica para llevar a cabo análisis de recuento microbiológico, permitiendo a los laboratorios reducir costos y a más personas dedicadas al sector productivo a cumplir con los parámetros establecidos en la normatividad de cada gobierno (3M FOOD SAFETY, 2016).

4.1.3. Exigencias gubernamentales

Colombia cuenta con diferentes entes gubernamentales a través de los cuales se garantiza la inocuidad y seguridad de alimentaria; así mismo por medio de estas se hace seguimiento y control a las actividades relacionadas con la fabricación y comercialización de alimentos destinados al consumo humano y animal. Las principales organizaciones dedicadas a este tipo de labor en Colombia son: el INVIMA (Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos), ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), Ministerio de agricultura y desarrollo, Ministerio de salud y protección social y entidades territoriales de salud. Por otro lado, a través de estos

entes se instauró el Decreto 2055 de 2009, mediante el cual se instituyó la comisión de seguridad alimentaria y nutricional, por la cual se establecen reglamentaciones, políticas sanitarias y fitosanitarias, vigilancia y control de la salud pública y el desarrollo de capacidades técnicas y analíticas de laboratorios dedicados al análisis de alimentos (Ministerio de salud y protección social, 2017).

El INCONTEC (Instituto Nacional de Normas Técnicas Colombianas) es el ente encargado de la normalización en Colombia, este cuenta con certificación MLA del Foro Internacional de Acreditación (IAF) y acreditación ONAC. El INCONTEC tiene como labor aportar recomendaciones normativas para el análisis de microorganismos en alimentos, además de las metodologías correspondientes para el análisis de estos. En el caso de los mohos y las levaduras se contemplan las NTC 5698-1 y 5698-2 para el recuento en placa de estos microorganismos en matrices alimentarias de acuerdo con la actividad de agua del alimento (Ministerio de salud y protección social, 2017).

4.1.4 Estudio de comparación de métodos

4.1.4.1 Estudio de comparación de métodos

De acuerdo con la norma ISO 16140-2, el estudio de comparación de métodos es una parte del proceso de validación. Este estudio comparativo se lleva a cabo confrontando los resultados del método de referencia con respecto al método alternativo. Generalmente estos estudios comparativos se llevan a cabo mediante análisis estadísticos como son: Medición del sesgo, análisis de regresión y prueba Fisher o T- student (ISO, 2016).

4.1.4.1.1 Medición del sesgo (E-bias).

Es la estimación del error de medición, también se puede definir como la diferencia entre el valor de referencia y el promedio de los valores replicados de la medición (ISO, 2017).

4.1.4.1.2 Análisis de regresión lineal.

El análisis de regresión es una medida que examina la exactitud de las mediciones dentro de un rango esperado, obtenidas por un método específico, además determina si el método tiene la misma exactitud en todos los valores de referencia (Guzmán, 2011).

4.1.4.1.3 Prueba Fisher.

Busca determinar si existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos de poblaciones independientes y que se distribuyen de forma normal. En la prueba F la hipótesis nula no puede ser rechazada, indicando que no existen diferencias entre las poblaciones estudiadas (Sánchez, 2015).

4.1.4.2 Validación

La validación es un proceso mediante el cual se determina el propósito de cada proceso y se obtiene evidencia objetiva de que el uso previsto se cumple a cabalidad, asegurando la veracidad de los resultados obtenidos mediante el mismo (ISO, 2016).

4.2 ANTECEDENTES

Los mohos y las levaduras son de gran importancia en la industria de los alimentos y bebidas, debido a su capacidad de adaptación que les permite desarrollarse sobre cualquier medio o superficie; por tanto, a través de los años se han realizado estudios acerca de su crecimiento, desarrollo y métodos de recuento de estos en matrices alimentarias. En primer lugar un estudio realizado por Bird y colaboradores, en Q- laboratorios, Cincinnati, EE.UU, titulado ***“Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for the Enumeration of Yeast and Mold in Food”***; busco comparar las placas Petrifilm con respecto a los medios de cultivo de referencia normatividad, estas se emplean de acuerdo con la actividad del agua de los alimentos. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que no existen diferencias estadísticas significativas entre los recuentos obtenidos en las placas Petrifilm y los métodos de referencia normativa (Bird, et al, 2015).

Por otro lado, Un estudio titulado ***“Comparison of New and Traditional Culture-Dependent Media for Enumerating Foodborne Yeasts and Molds”*** realizado por Beuchat y Mann, en Georgia, EE. UU; busco comparar medios de cultivo nuevos, tradicionales y placas Petrifilm para la enumeración de mohos y levaduras en alimentos e ingredientes alimentarios. En este estudio se compraron los recuentos obtenidos en: placas de recuento rápido de levaduras y mohos (RYM) Petrifilm, placas de recuento de mohos y levaduras (YM) de Petrifilm, placas de agar diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC), placas de agar papa-dextrosa (PDA) y placas de agar diclorán 18% glicerol (DG18). Los resultados obtenidos muestran un alto coeficiente de correlación entre los recuentos obtenidos para los diferentes medios de cultivo utilizados en el análisis, indicando que las placas de recuento rápido recuperan un número de células similar a los medios de cultivo tradicionales de análisis. Las diferencias en el número de células en los medios de cultivo pudo deberse a múltiples factores como: la diversidad de levaduras y mohos presentes en los alimentos de prueba, diferencias en los requisitos de nutrientes, pH y actividad del agua para la reanimación de células estresadas y el desarrollo de colonias (Bauchat&Mann, 2016).

En el 2016 un estudio titulado ***“ Comparison of conventional plating methods and Petrifilm™ for the recovery of aerobic bacteria and mold from hatchery fluff samples”*** realizado por Warren y colaboradores en la universidad de Washington, EE. UU; tuvo como propósito evaluar la capacidad de las placas Petrifilm para la enumeración de mohos y bacterias aeróbicas de hisopados en incubadoras de pollo. Esto se llevó a cabo debido a que el recuento de estos microorganismos utilizando los medios tradicionales resulta en un proceso que requiere mucho tiempo y representa más gastos para la industria, mientras que el

uso de placas listas como los Petrifilm son una alternativas más viable para el análisis de estos microorganismos. Los análisis se llevaron a cabo en 25 muestras y en el caso de los mohos el recuento se realizó mediante 3M™ Petrifilm™ RYM® y agar dextrosa Sabouraud. Como resultado se obtuvo que las placas de petrifilm obtienen recuentos equivalentes a las placas utilizando medios tradicionales (Warren, et al, 2016).

Un estudio en Perú en el 2017 titulado “**Validación microbiológica de un método rápido para la cuantificación de hongos en harina de maca**” realizado por Dueñas; buscó validar el método de recuento utilizando placas de Petrifilm para mohos y levaduras, para esto se llevó a cabo un análisis comparativo entre estas placas listas para usar y el método tradicional. Los resultados obtenidos permitieron al autor validar el uso de placas Petrifilm para el recuento de mohos y levaduras, debido a que le permite obtener la misma recuperación de células que el recuento mediante el método tradicional, además establece las ventajas del uso de estas placas como son el fácil uso, aumento de la productividad y disminución del tiempo requerido para la preparación de material (Dueñas, 2017).

En México en este mismo año un estudio realizado por Pérez titulado “**Evaluación de condiciones higiénico sanitarias en el proceso de elaboración y envasado de alimentos en polvo con técnica de siembra rápida para microorganismos indicadores**” buscó determinar la eficiencia de las placas Pertifilm para la evaluación de microorganismos indicadores en una planta de producción, entre los microorganismos objeto del estudio se evaluaron mohos y levaduras, para determinar la calidad higiénica se llevó a cabo un muestreo en equipos y manipuladores y se sembró mediante el método tradicional y el uso de placas Petrifilm para los diferentes microorganismos a evaluar; a través de los resultados se logró determinar que las placas Petrifilm son una alternativa muy viable para sustituir el recuento mediante el método tradicional (Pérez, 2017).

Finalmente un estudio realizado por Medina y Jordano, titulado “**Petrifilm – A Simplified Technique for Microbiological Testing of Foods and Beverages**” realizado en la universidad de Córdoba, España; presenta la perspectiva del uso de placas de Petrifilm para llevar a cabo análisis microbiológico en muestras de alimentos y bebidas; además, establece que este método de recuento alternativo contribuye a la seguridad alimentaria, puesto que con estas placas se analizan un número significativo de microorganismos como mohos y levaduras, *E. coli*, Enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., Coliformes, *Staphylococcus* spp., entre otros, además que esta técnica ha sido reconocida, verificada y validada internacionalmente (Medina & Jordano, 2019).

4.3 MARCO LEGAL.

Norma Técnica Colombiana 879: Es norma establece requisitos microbiológicos que deben cumplir los productos lácteos como leche azucarada o dulce de leche, los parámetros microbiólogo para esta establece determina un límite de aceptación

<10 UFC/g en el recuento de mohos y levaduras para la comercialización del producto (NTC, 2018).

Norma Técnica Colombiana 805: Esta norma rige a los derivados lácteos que requieren el análisis de este grupo microbiano como son las leches fermentadas como el yogurt, kumis, kéfir, leches cultivadas, acidificadas, entre otros; se establece un criterio de aceptación con recuentos <10 UFC/gr o ml para mohos y levaduras (NTC, 2000).

Norma Técnica Colombiana 267: Esta norma examina la calidad microbiológica de Harinas, y mediante la cual se determina que las exigencias para la enumeración de mohos y levaduras con un recuento máximo entre 4.000 y 5.000 UFC/g (NTC 267, 2007)

Resolución 4393 de 1991: Esta resolución examina la calidad microbiológica de las pastas y masas frescas y a través de la cual se determina que para la enumeración de mohos y levaduras es un recuento máximo entre 4.000 y 5.000 UFC /g (Ministerio de salud y protección social ,1991)

Resolución 15511 de 2011: Mediante esta se dictamina un límite máximo de 50 UFC/g para el recuento de mohos y levaduras para productos de confitería, además en esta se determina el proceso, envase, almacenamiento y transporte que permitan que se importe o exporten este tipo de productos en territorio nacional (Ministerio de salud y protección social, 2011).

Norma Técnica Colombiana 1363: Esta norma va dirigida a los productos de molinería como los productos de panadería, mediante esta se establece los requisitos técnico sanitario para la comercialización, fabricación y circulación de productos de panificación, en el análisis microbiológico se establece un examen de microorganismos ajenos al proceso de fermentación y por tanto requiere la examinación de mohos y levaduras, en esta norma se determina un límite máximo de 10^2 UFC/g para el recuento de estos microorganismos (NTC 1363, 2014).

Norma Técnica Colombiana 5698-1: Esta norma establece el método horizontal para el recuento de levaduras y mohos en productos con actividad acuosa superior a 0,95 (NTC 5698-1, 2008).

Norma Técnica Colombiana 5698-2: Mediante la cual se establece el recuento de colonias en productos con actividad de agua inferior o igual a 0,95 (NTC 5698-2, 2008)

ISO 16140-2: Norma mediante la cual se permite confrontar un método alternativo con un método de referencia, permitiendo obtener resultados veraces, confiables y oportunos con métodos más rápidos y sencillos y que cumplen a cabalidad con el objeto del análisis (ISO, 2017).

5. METODOLOGIA

5.1 Selección de muestras:

La selección de las muestras a analizar en el presente estudio se realizó teniendo en cuenta las propiedades intrínsecas del alimento como: niveles de microbiota autóctona, contenido de grasa, pH, contenido de sal y agua, además de la actividad y la presencia de compuestos antimicrobianos que pueden tener una influencia sustancial en el resultado. Teniendo en cuenta lo anterior las matrices alimentarias seleccionadas fueron: pan tajado, mayonesa, jugo, harina de trigo y croquetas de perro, la presente selección también se llevó a cabo de acuerdo el tipo de muestras más recurrentes en el laboratorio de análisis (ISO 16140-3,2014).

5.2 Preparación del inóculo:

La preparación del inóculo se llevó a cabo utilizando dos cepas fúngicas: *Aspergillus brasiliensis* y *Saccharomyces cerevisiae*, que fueron tomadas del cerapio donde se encuentran conservadas en criobolas. Para su activación se procedió a sembrarlas en agar Sabouraud dextrosa e incubarlas a 25°C durante cinco días.

Posterior al tiempo de incubación, se realizó la estandarización del inóculo por medio de la escala McFarland, este proceso se llevó a cabo con las dos cepas fúngicas de interés. La estandarización tiene como finalidad obtener concentraciones conocidas del inóculo; para este fin, se procedió tomando un tubo con 10 ml de solución salina estéril y transfiriendo colonias hasta obtener una escala McFarland de 2.0. En esta escala se estima que el número de células microbianas es de 6×10^8 UFC/mL; a partir de esta se realizaron siete diluciones seriadas (hasta 10^{-7}) y se sembraron en cajas para el conteo de mohos y Petrifilm para el conteo de levaduras, esto con el fin de verificar que el número de células en el patrón sea el esperado.

Los resultados obtenidos en la estandarización de los inóculos se muestran en el anexo 2. De acuerdo con lo anterior se utilizó la siguiente ecuación para obtener la cantidad de inóculo a añadir en cada matriz, teniendo en cuenta que se van a trabajar tres niveles de contaminación en todas las muestra: alto, medio y bajo.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

5.3 Preparación y acondicionamiento de las muestras:

En el presente estudio las muestras de alimentos utilizadas se enumeran en la tabla 1, cada una de estas se tomó de marcas reconocidas a nivel nacional y disponibles en el mercado con el fin de garantizar la inocuidad de los productos. Las muestras se pesaron para ser utilizadas en tres niveles de contaminación con el patrón McFarland denominados como nivel alto (1×10^6 UFC/ml), medio (1×10^3 UFC/ml) y bajo (1×10^1 UFC/ml), cada nivel de contaminación se realizó por duplicado en cada una de las muestras de ensayadas.

De acuerdo con lo anterior, se procedió pesando 10 g de la muestra en bolsas de pesaje estériles, cada muestra se pesó seis veces; es decir, dos de estas bolsas para contaminar con el patrón del nivel bajo, dos para contaminar con el patrón en el nivel medio y dos para contaminar con el patrón del nivel alto, seguidamente estas se acondicionaron adicionando 90 mL de agua peptonada estéril al 0,1%, esto se llevó a cabo con ayuda del Dilumat obteniendo una dilución 1:10, cada muestra se homogenizó con ayuda del stomacher durante 1 minuto. Las muestras pesadas y acondicionadas se dejaron reposar durante 30 minutos y posteriormente se pasaron al cuarto de patógenos para proceder con la inoculación (ISO 16140-3,2014).

5.4 Inoculación y siembra de las matrices alimentarias.

Se procedió a llevar a cabo la inoculación de las muestras, cada una se contaminó de forma artificial en un nivel alto, medio y bajo, añadiendo 1mL del inóculo de acuerdo con el nivel de contaminación. La contaminación de las muestras se llevó a cabo mediante una co-inoculación; es decir, simultáneamente se contaminó con la especie de moho y levadura empleadas en este estudio, tomando 500µL de cada inóculo en el nivel correspondiente de contaminación. Seguidamente las muestras se dejaron en reposo durante 30 minutos para estabilizar la carga microbiana en la matriz y se procedió a sembrar. Los medios utilizados para sembrar cada una de las muestras se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Muestras y medios de siembra correspondientes.

Matrices.	Muestra.	Niveles.	Medios de cultivo.
1	Pan tajado	Bajo	DRBC,YGC, PETRIFILM
	Pan tajado	Medio	DRBC,YGC, PETRIFILM
	Pan tajado	Alto	DRBC,YGC, PETRIFILM
2	Leche en polvo	Bajo	DG18,YGC, PETRIFILM
	Leche en polvo	Medio	DG18,YGC, PETRIFILM
	Leche en polvo	Alto	DG18,YGC, PETRIFILM
3	Harina de trigo	Bajo	DG18,YGC, PETRIFILM
	Harina de trigo	Medio	DG18,YGC, PETRIFILM
	Harina de trigo	Alto	DG18,YGC, PETRIFILM

4	Jugo de fruta	Bajo	DRBC,YGC, PETRIFILM
	Jugo de fruta	Medio	DRBC,YGC, PETRIFILM
	Jugo de fruta	Alto	DRBC,YGC, PETRIFILM
5	Mayonesa	Bajo	DRBC,YGC, PETRIFILM
	Mayonesa	Medio	DRBC,YGC, PETRIFILM
	Mayonesa	Alto	DRBC,YGC, PETRIFILM
6	Croquetas	Bajo	DG18,YGC, PETRIFILM
	Croquetas	Medio	DG18,YGC, PETRIFILM
	Croquetas	Alto	DG18,YGC, PETRIFILM

Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC); Dicloran-glicerol (DG18); Extracto de levadura, glucosa-Cloranfenicol (YGC)

Posterior al proceso de siembra se procedió a incubar a 25°C durante 5 días, es importante tener en cuenta que los medios utilizados para cada muestra son conforme lo establecido con la norma y de acuerdo con la actividad de agua los alimentos analizados, por ende DG18 se utilizó para muestras con a_w inferior o igual a 0,95 y el DRBC para muestras con a_w superior a los 0,95. Pasado el tiempo de incubación se llevó a cabo la enumeración en placa, este conteo se realizó para mohos y levaduras por separado. Los resultados se muestran en el anexo 1.

5.5 Análisis estadístico

5.5.1 Medición del sesgo (eBias)

De acuerdo con los recuentos obtenidos de los procedimientos anteriores, se procedió a determinar el sesgo estadístico. Para esto fue importante la preparación del inóculo en suspensión sin el alimento, a la cual se le denominó la solución B, esta también se preparó en tres niveles de contaminación una sola vez y se utilizó para todas las matrices de análisis.

La solución B permitió obtener el valor asignado de referencia o valores teóricos permitiendo el cálculo del error de medición. Los resultados obtenidos mediante el recuento en placa en agar YGC se expresaron en \log_{10} UFC/g o \log_{10} UFC/ml para cada una de las muestras analizadas, de esta misma forma se expresan los resultados obtenidos con la solución B y a partir de esto se realizó un análisis comparativo, el cual se llevó a cabo promediando los resultados obtenidos en cada

nivel y restándolo con el promedio obtenido para cada nivel en la solución B. Este mismo procedimiento se llevó a cabo utilizando placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para la enumeración de mohos y levaduras en los diferentes niveles de contaminación y la solución B, la ecuación para el cálculo del sesgo de medición se muestra a continuación. Se espera que los resultados para cada nivel entre la muestra correspondiente y la solución B sea igual o inferior a 0,5 log₁₀ UFC / g o ml.

$$\frac{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{m_i} (Z_{ij} - ref_i)}{\sum_{i=1}^g m_i}$$

Donde;

- Z_{i,j} jésima medición de la iésima parte
- ref_i valor de referencia de la iésima parte
- m_i número de réplicas de la iésima parte

5.5.2 Análisis de regresión lineal

La prueba de linealidad permitió determinar la capacidad del recuento utilizando placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para generar resultados proporcionales a la concentración de microorganismos presentes en la muestra. Esta se llevó a cabo con la muestra más homogénea utilizada en el presente estudio (jugo de fruta), la cual se pesó y acondicionó ocho veces, cada una de estas se le denomina punto y cada punto se contaminó en concentraciones diferentes.

A fin de obtener las concentraciones del inóculo para cada uno de los puntos del análisis de regresión, se realizaron 8 diluciones seriadas a partir de un inóculo inicial con concentración de 1x10⁷ UFC/ml. La concentración inicial se tomó como el primer punto del análisis regresión, denominando este como punto 8; posteriormente, se transfirió 1 ml de la solución inicial a un tubo con 9ml de agua peptonada estéril y así se obtuvo el punto 7, de este último se realizaron 2 nuevas diluciones seriadas y de este forma se obtuvieron los puntos 5 y 3. Seguidamente, se procedió tomando 500µL del inóculo inicial y se transfirió a un tubo con 9,5ml de agua peptonada estéril, esta nueva dilución se le denominó punto 6, posteriormente se transfirió de esta 500µL a otro tubo con 9,5ml de agua peptonada estéril, obteniendo el punto 4, este procedimiento se realizó dos veces más y se obtuvieron los puntos 1 y 2.

Una vez obtenidas las diluciones, se procedió a contaminar las muestras con cada uno de ellas y se sembró por triplicado en placas de agar YGC y placas 3M™

Petrifilm™ RYM®. Con los datos obtenidos del recuento, se procedió a realizar una gráfica con el fin de analizar variables como: el coeficiente de variación, la correlación, error típico y el R^2 ajustado, en síntesis un análisis de ANOVA que permitió determinar la linealidad del método. Es importante tener en cuenta que los recuentos obtenidos en cada punto en el agar YGC se toman como los datos de referencia o teóricos. La ecuación de regresión lineal simple se muestra a continuación:

$$E (y/x) = \beta_0 + \beta_1 x$$

5.5.3 Prueba F

Por medio de la prueba F se buscó determinar si existe una diferencia significativa entre los recuentos obtenidos utilizando el medio referido en la norma (DG18 y DRBC) y los recuentos obtenidos en el agar YGC; así mismo, si existen diferencias entre los recuentos utilizando los medios tradicionales y las placas 3M™ Petrifilm™ RYM®. Esta prueba F se utilizó para probar la hipótesis nula (H_0), esta indica que el medio YGC recupera el mismo número de celular microbianas que los medios de referencia DRBC y DG18; así mismo, que las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® recupera el mismo número de células que los medios tradicionales utilizados en el laboratorio. Para calcular este estadístico de prueba, en primer lugar se determinó el promedio de los recuentos obtenidos en cada uno de los medios de cada matriz analizada, seguidamente estos se transformaron a \log_{10} UFC/g o \log_{10} UFC/ml. Una vez obtenidos los datos, se llevó a cabo su análisis por medio del paquete estadístico Excel que permitió determinar variables como: media, varianza, grados de libertad, F y valor crítico. Para lograr comprobar la hipótesis nula en cada uno de los casos se observa principalmente el valor crítico y F, estableciendo que; si F es menor que el valor crítico, la hipótesis nula es aceptada.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Resultados

6.1.1 Evaluación de la eficiencia de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el análisis de levaduras.

El análisis comparativo para evaluar la eficiencia de las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® se realizó confrontando los datos de recuento en estas placas con los resultados obtenidos utilizando placas tradicionales de agar YGC. Los datos brutos del presente estudio se observan en el anexo 1, donde se encuentran recuentos para mohos y levaduras de forma individual en las diferentes matrices y medios evaluados.

En el caso de las levaduras los recuentos obtenidos tanto en el método tradicional como alternativo se encuentran en la tabla 2 y a partir de los cuales se determinó que las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® recupera el mismo número de células tipo levadura que las placas de YGC, esto se establece debido a que se acepta la hipótesis nula de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de Fisher. Los parámetros establecidos en la prueba F se observan en la tabla 2, que muestran un valor F menor al valor crítico, y a través de los cuales se comprueba que el método alternativo y de referencia recuperan el mismo número de células (Cabeza y Cabeza, 2014).

Tabla 2. Promedios de Recuento en placa del método de referencia y método alternativo para levaduras.

ENSAYO	Promedio de recuentos Log UFC/g-mL		
	Muestra	Método de referencia (YGC)	Método alternativo (Petrifilm)
Alto	1	4,00851667	4
	2	4,04914877	3,95424251
	3	4,04723556	4
	4	4,04530535	4
	5	4,06208903	4
	6	4,02921301	4
Medio	1	3,70327009	3,67121134
	2	3,63335098	3,60205999
	3	3,69897	3,67551143

	4	3,60205999	3,71162294
	5	3,66621923	3,66110965
	6	3,66621923	3,73856063
Bajo	1	3,03959062	3,04139269
	2	3,30103	3,01671188
	3	3,01671188	3,19010562
	4	3,0965623	3,06028697
	5	3,10874197	3,20748667
	6	3,16110965	3,11265464

Tabla 3. Prueba F del método de referencia (YGC) y método alternativo para la enumeración de levaduras

	YGC	Petrifilm
Media	3,60751913	3,59127539
Varianza	0,15441713	0,14549594
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	1,06131573	
P(F<=f) una cola	0,45189184	
Valor crítico para F (una cola)	2,27189289	

Otro parámetro que permitió evaluar la eficiencia del método alternativo utilizando placas de Petrifilm es el análisis de regresión, mediante el cual se determinó la capacidad del método alternativo para generar medidas exactas dentro de un rango evaluado. Para llevar a cabo esto se evaluaron medidas en 6 puntos cada uno en concentraciones distintas del microorganismo, los recuentos en cada uno de los puntos se llevaron a cabo tanto en las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® como en el método de referencia con agar YGC y tomando estos últimos como valores teóricos. Los resultados para el análisis de regresión de las levaduras se encuentran en la tabla 4, el análisis de regresión se puede observar en la tabla 5 y grafica 1.

Tabla 4. Recuentos de levaduras en los puntos de análisis.

Punto	Método de referencia (LogUFC/g o ml)	Método alternativo (LogUFC/g o ml)
1	2,425968732	2,22184875
2	3,079181246	2,90308999

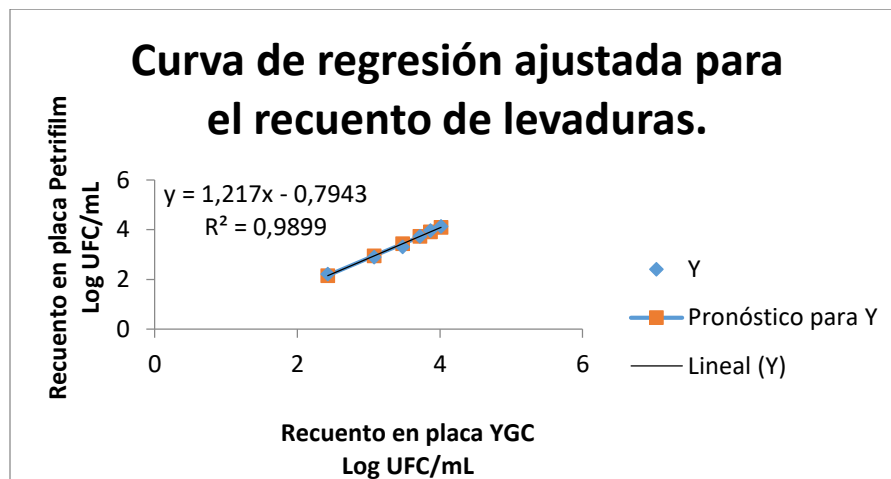
3	3,477121255	3,31527043
4	3,718778398	3,74036269
5	3,865301426	3,96378783
6	4,014240439	4,1356626

En la presente tabla se muestra el promedio correspondiente a 3 réplicas en cada punto expresados en Log. Cada punto corresponde a una concentración microbiana diferente.

Tabla 5. Análisis de regresión para recuento de levaduras.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99492817
Coefficiente de determinación R ²	0,98988206
R ² ajustado	0,98735257
Error típico	0,08132466
Observaciones	6

Grafica 1. Curva de regresión lineal para el recuento de levaduras.



Los datos analizados del método de referencia y alternativo para el recuento de levaduras se muestran estrechamente relacionados ya que el coeficiente de correlación es cercano a uno indicando así que el grado de variación es bajo, la relación entre las variables también se refleja en la gráfica 1, ya que todos los puntos de los datos obtenidos se encuentran sobre la línea de regresión ajustada. Por otro lado, el coeficiente de correlación múltiple es muy cercano a uno por lo que se puede inferir que existe un alto grado de asociación entre las variables (Cabeza y Cabeza, 2014).

Un parámetro que permite determinar la eficiencia del método es el error de medición del método alternativo (Placas 3M™ Petrifilm™ RYM®), para esto se calculó el sesgo de medición en los diferentes niveles de contaminación de las 6 muestras, este sesgo se comparó con los valores de referencia que corresponden

a los recuentos obtenidos para las levaduras en placas 3M™ Petrifilm™ RYM® de la solución B, los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Calculo E-bias para las placas Petrifilm en el recuento de levaduras.

Calculo Ebias		
Concentración alta	Concentración media	Concentración baja
0,010	0,040	0,040
Promedio:	0,030	
Criterio de aceptación= $\leq 0,5$ Log		

Los resultados corresponden a los datos promedio de los sesgos de medición obtenidos en cada nivel de contaminación.

De acuerdo con el criterio de aceptación, el resultado obtenido para el método alternativo es aceptable, ya que las diferencias entre los valores de referencia y los valores obtenidos en cada muestra son bajas e indica la precisión de las mediciones obtenidas para el recuento de levaduras utilizando placas 3M™ Petrifilm™ RYM® (Cabeza y Cabeza, 2014).

6.1.2 Evaluación de la eficiencia de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el análisis de mohos.

En el caso de los mohos al igual que con las levaduras el análisis comparativo para evaluar la eficiencia se realizó utilizando las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® como método alternativo y placas de YGC como método de referencia para el recuento de estos microorganismos. Los resultados obtenidos para estos se muestran en la tabla 7 y a partir de los cuales se llevó a cabo el análisis estadístico de la prueba de F. Los resultados de esta prueba se observan en la tabla 8 y mediante los cuales se rechaza la hipótesis nula, debido a que el resultado de F es mayor al valor crítico y se acepta la hipótesis alternativa donde se determina que la capacidad de recuperación del mohos en las Placas 3M™ Petrifilm™ RYM® es diferente al medio YCG.

Tabla 7. Promedios de Recuento en placa del método de referencia y método alternativo para mohos.

ENSAYO	Promedio de recuentos Log UFC/g-mL		
	Muestra	Método de referencia (YGC)	Método alternativo (Petri)
Alto	1	4,04139269	4

	2	4,04139269	3,95424251
	3	4,04139269	4
	4	4,02069634	4
	5	4,06028697	4
	6	4	4
Medio	1	3,8290057	3,67121134
	2	3,77060235	3,60205999
	3	3,74286071	3,67551143
	4	3,65321251	3,71162294
	5	3,75121356	3,66110965
	6	3,75560735	3,73856063
Bajo	1	3,23856063	3,04139269
	2	3,39759229	3,01671188
	3	3,25527251	3,19010562
	4	3,2887459	3,06028697
	5	3,33232099	3,20748667
	6	3,38907563	3,11265464

Tabla 8. Prueba F del método de referencia (YGC) y método alternativo para la enumeración de mohos

	<i>YGC</i>	<i>Petrifilm</i>
Media	3,70051286	3,59127539
Varianza	0,09451849	0,14549594
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	0,64962974	
P(F<=f) una cola	0,19133937	

Valor crítico para F
(una cola) 0,4401616

Al igual que con la enumeración de levaduras, se buscó evaluar la capacidad del método alternativo para generar medidas exactas en el recuento de mohos, y de esta manera establecer la eficiencia del método alternativo para la enumeración de estos en los diferentes puntos. Esto se realizó evaluando medidas en 6 puntos cada uno en concentraciones distintas del microorganismo. Los recuentos en cada uno de los puntos se llevaron a cabo utilizando tanto las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® como el método de referencia con agar YGC y tomando estos últimos como valores teóricos. En este caso los datos para el análisis de regresión de mohos se encuentran en la tabla 9, el análisis de regresión se puede observar en la tabla 10 y gráfica 2.

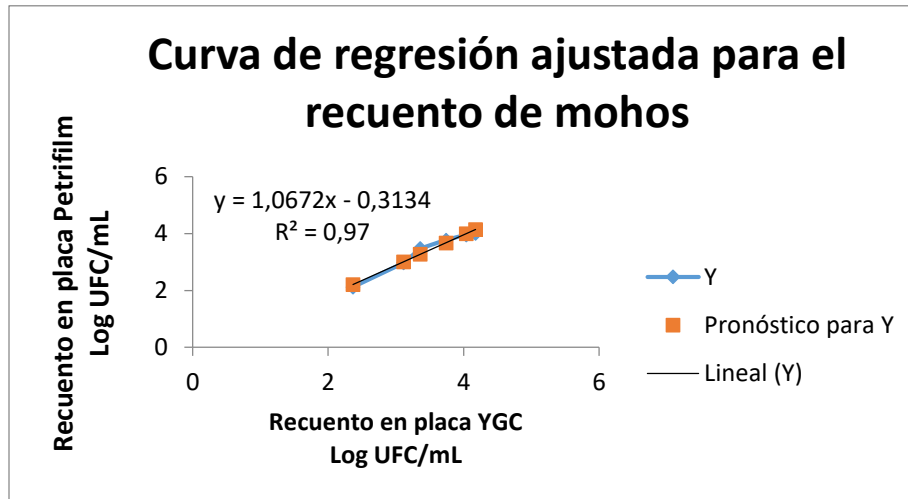
Tabla 9. Recuentos de mohos en los puntos de análisis.

Punto	Método de referencia (LogUFC/g o ml)	Método alternativo (LogUFC/g o ml)
1	2,36797679	2,12493874
2	3,11394335	2,97003678
3	3,36172784	3,47712125
4	3,74036269	3,77815125
5	4,04139269	3,95424251
6	4,17609126	4,01424044

Tabla 10. Análisis de regresión para recuento de levaduras.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,98488216
Coefficiente de determinación R ²	0,96999288
R ² ajustado	0,9624911
Error típico	0,14080834
Observaciones	6

Gráfico 2. Curva de regresión lineal para el recuento de mohos.



La enumeración de mohos realizada mediante los dos métodos se encuentra estrechamente relacionados, esto se infiere debido a que el coeficiente de variación se encuentran cercano a 1, indicando que el grado de variación de los datos es bajo; así mismo, esto se refleja en la gráfica, donde todos los puntos se encuentran sobre la línea de regresión ajustada, mostrando un alto grado de asociación entre las variables. Los resultados del análisis correspondiente al sesgo de medición de las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para la enumeración de mohos, se observan en la tabla 11, a partir de estos se infiere que las medidas determinadas mediante las placas Petrifilm son precisas (Cabeza & Cabeza, 2014).

Tabla 11. Calculo E-bias para las placas Petrifilm en el recuento de mohos.

Calculo Ebias		
Concentración alta	Concentración media	Concentración baja
0,010	0,040	0,040
Promedio:	0,030	
Criterio de aceptación= $\leq 0,5$ Log		

6.1.3 Comparación de la capacidad de recuperación de los medios de cultivo tradicionales y las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para el análisis mohos y levaduras en alimentos.

Se llevó a cabo la comparación entre placas 3M™ Petrifilm™ RYM® y los medios de cultivo referenciados por la norma, en el que se evaluó la capacidad de estas placas listas para usar de recuperar el mismo número de mohos y levaduras que el agar DRBC y DG18. El análisis comparativo se realizó a través de una prueba Fisher en la que el método tradicional utilizando el medio DRBC y DG18 son los métodos de referencia y las placas Petrifilm son el método alternativo, los datos crudos de recuento se encuentran en el anexo 1, así mismo los resultados de la prueba F para mohos y levaduras se muestran en la tabla 12 y 13 respectivamente.

Tabla 12. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo para la enumeración de mohos.

	<i>DRBC y DG18</i>	<i>Petrifilm</i>
Media	3,54119149	2,5814701
Varianza	0,18297516	0,15110722
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	1,21089618	
P(F<=f) una cola	0,3488404	
Valor crítico para F (una cola)	2,27189289	

Tabla 13. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo para la enumeración de levaduras.

	<i>DRBC y DG18</i>	<i>Petrifilm</i>
Media	3,60739503	3,59127539
Varianza	0,13651859	0,1454994
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	0,93829832	
P(F<=f) una cola	0,41852953	

Valor crítico para F (una cola)	0,4401616
---------------------------------------	-----------

Los resultados permiten inferir que las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® recuperan el mismo número de células tipo mohos que los medios determinados en la normativa; sin embargo, en el análisis de levaduras, las placas Petrifilm no permiten la misma recuperación que los medios de referencia normativa. Como se nombró anteriormente, esto se puede inferir a través de los resultados de F y el valor crítico; donde la prueba Fisher para mohos mostró un valor F menor a valor crítico, tomando la hipótesis nula como verdadera y estableciendo que: las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® recuperan el mismo número de células tipo mohos que los medio DRBC y DG18 en las diferentes matrices alimentarias evaluadas. Por otro lado, los resultado de la prueba F para las levaduras mostró un valor F mayor al valor crítico, indicando que las placas Petrifilm no recupera el mismo número de células tipo levaduras, rechazando la hipótesis nula.

Este análisis también se llevó a cabo para comprar el medio YGC con los medios referenciados en la norma, teniendo en cuenta que el recuento en placa con los medios DRBC y DG18 es el método de referencia y la enumeración con YGC es el método alternativo. Los resultados se muestran en las tablas 14 y 15 para mohos y levaduras respectivamente, y a través de las cuales se puede determinar que el medio YGC recupera el mismo número de mohos que los medios DG18 y DRBC debido a que se observa un valor F menor al valor crítico, aceptando la hipótesis nula como verdadera, sin embargo en el caso de las levaduras YGC no recupera el mismo número de células, esto se determina ya que F es mayor al valor crítico.

Tabla 14. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo (YGC) para la enumeración de mohos.

	<i>DRBC y DG18</i>	<i>YGC</i>
Media	3,54119149	3,70051286
Varianza	0,18297516	0,09451849
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	1,93586636	
P(F<=f) una cola	0,09173069	
Valor crítico para F (una cola)	2,27189289	

Tabla 15. Prueba F del método de referencia (DRBC y DG18) y método alternativo (YGC) para la enumeración de levaduras.

	<i>DRBC y DG18</i>	<i>YGC</i>
Media	3,60739503	3,60751913
Varianza	0,13651859	0,15441713
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	0,88408971	
P(F<=f) una cola	0,39003352	
Valor crítico para F (una cola)	0,4401616	

6.1.4 Viabilidad económica de la implementación de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® para la enumeración de mohos y levaduras en alimentos.

Un factor importante en el momento de llevar a cabo un análisis microbiológico es el costo de este, por tal razón es esencial realizar un análisis de costos para los medios tanto referidos por la norma como los utilizados en métodos alternativos como el YGC y Petrifilm, los costos de los medios de cultivo se muestran en la tabla 16, así mismo las diferentes casas comerciales que ofrecen estos productos.

Tabla 16. Estudio comparativo de costos de metodología referenciada en la norma nacional y el medio de cultivo para el método alternativo YGC y placas 3M™ Petrifilm™ RYM®

CASA COMERCIAL	DRBC	DG18	YGC	3M™ Petrifilm™ RYM®.
Merk Millipore	1.925.000	2.178.000	1.090.877	631.000
Fisher Scientific	1.580.040	1.090.877	1.073.561	554.096
Oxoid	1.630.058	1.250.000	1.020.000	581.496
Promedio de costos	1.711.699,33 3	1.506.292,33	1.061.479,3 3	588.864

A fin de establecer diferencias entre el costos de los análisis utilizando medios tradicionales y las placas 3M™ Petrifilm™ RYM®, se realizó un estudio económico

de los gatos relacionados al análisis de matrices alimentarias utilizando medios tradicionales y placas Petrifilm.

Tabla 17. Análisis de costo entre el análisis utilizando medio de cultivo tradicional y placas 3M™ Petrifilm™ RYM®

Metodología	Costo por muestra	Numero de muestras analizadas en el estudio.	Repeticiones por muestra.	Costo total del estudio.
Método tradicional (Placas de YGC, DRBC, DG18)	\$70.000	36	2	\$5.040.000
Placas 3M™ Petrifilm™ RYM®	\$33.000	36	2	\$2.376.000

Los datos expuestos en la tabla 17 corresponden a los precios que generalmente se cobran en el laboratorio de análisis, en este cobro no se hace distinción en el medio de cultivo empleado, sin embargo se contemplan los gastos relacionados a la mano de obra del analista, acondicionamiento de la muestra, la elaboración del medio de cultivo, gasto de material y el uso de instrumentos como autoclaves, jarras, probetas y demás utensilios asociados a la preparación. Es importante tener en cuenta que el gasto total del estudio, utilizando el método tradicional, corresponde al uso de un solo medio de cultivo, por lo que el costo real de lo gastado se estima en \$10.080.000, para un total de 72 muestras analizadas mediante el método de recuento en placa tradicional utilizando agar YGC, DRBC y DG18, estos últimos de acuerdo con la actividad de agua del alimento. En contraparte, los gastos generados por el uso de placas Petrifilm solo representan el 23% de los gastos generados utilizando el método tradicional de recuento. El costo de análisis mediante placas de Petrifilm engloba: Mano de obra del analista, acondicionamiento de la muestra, uso de instrumentos como cabina y de materiales como puntas y micropipeta.

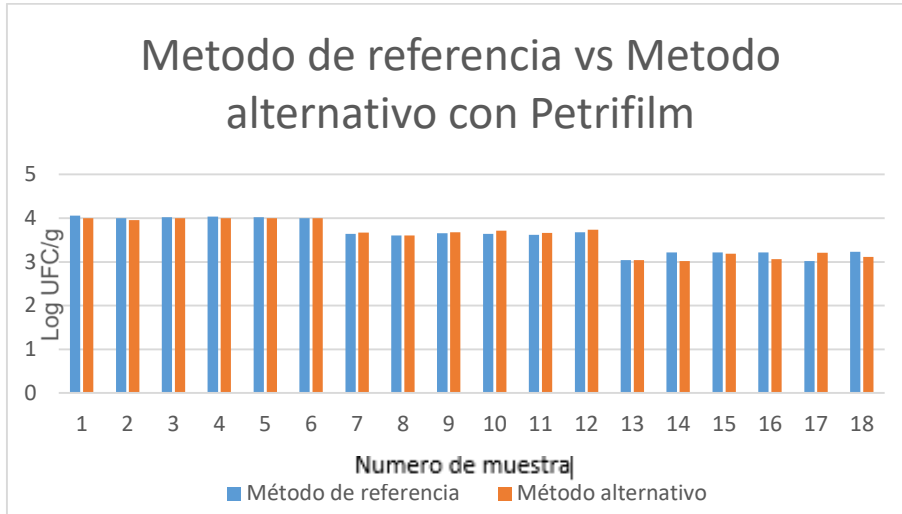
6.2 Análisis de resultados

Los parámetros estadísticos permiten determinar la enumeración en placas 3M™ Petrifilm™ RYM® como eficiente en su comparación con los resultados en el medio YGC, en el caso del recuento de levaduras la prueba F permite aceptar que este método recupera el mismo número de células que el método de referencia, y aunque en el caso de los mohos la hipótesis nula no puede ser aceptada existen otros parámetros estadísticos que indican a las placas Petrifilm como método eficiente para el recuento de este grupo microbiano. Entre estos parámetros podemos

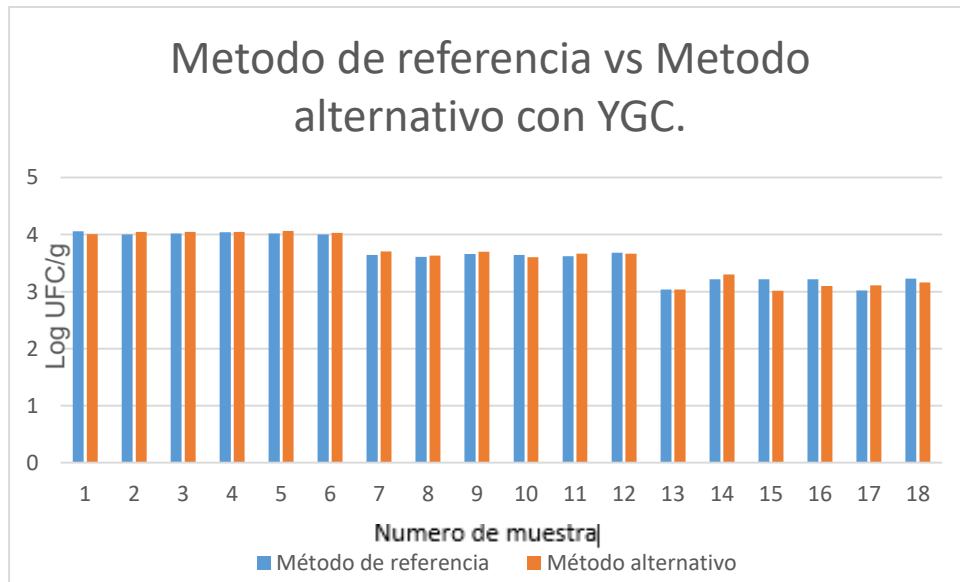
observar el análisis de regresión lineal, donde se manifiesta una recuperación de mohos en las diferentes concentraciones proporcional entre el método de referencia y el alternativo, esto está determinado porque el valor de R^2 es cercano a 1, así mismo todos los puntos se encuentran sobre la línea de ajuste corroborando que estos están estrechamente relacionados, en el caso de las levaduras los datos crudos muestran la mayor recuperación por parte de las placas Petrifilm que el medio YCG, esto mismo se puede observar en los puntos evaluados para el análisis de regresión de los mohos, donde en el punto 3 y 4 el mayor recuento de mohos se observa en las placas Petrifilm, por lo que se infiere que el uso de estas placas son eficientes para el análisis de este grupo microbiano en diferentes matrices alimentarias. Por otra parte, el sesgo de medición de este método en ambos casos es menor a 0,5 Log, indicando que el error en la enumeración mediante placas 3M™ Petrifilm™ RYM® es bajo y además demuestra precisión entre las medidas realizadas mediante Petrifilm influyendo en la baja dispersión de datos proporcionados mediante estas (Cabeza y Cabeza, 2014).

Por otra parte, los análisis estadísticos también permitieron determinar que las placas Petrifilm y el medio de cultivo YGC muestran resultados estrechamente relacionados a los obtenidos con los medios DRBC y DG18 para el recuento de mohos, sin embargo en el caso de las levaduras, de acuerdo con la prueba F, el método de referencian utilizando DRBC y DG18 no recupera el mismo número de células que los métodos alternativos usando placas 3M™ Petrifilm™ RYM® y placas de YGC. No obstante en las gráficas 3 y 4 se muestra la capacidad de recuperación de células tipo levaduras del método de referencia y el método alternativo utilizando el Petrifilm y placas de YGC, y mediante las cuales se pone en manifiesto que los dos métodos recuperan un número similar de células tipo levaduras, esto se comprueba ya que en las gráficas de barras muestran el recuento de levaduras tanto para el método de referencia como el método alternativo representado por barras azules y naranjas respectivamente, donde se evidencia que a partir de las 18 medidas examinadas, que corresponden 6 medidas al nivel alto, 6 al nivel medio y 6 al nivel bajo, el número de levaduras recuperadas es similar para ambos casos e incluso en algunas medidas los métodos alternativos superan en recuento al método de referencia, demostrando así que estos métodos alternativos son viables para el análisis de levaduras en alimentos.

Grafica 3. Diagrama de barras para la comparación de recuentos entre método de referencia y método alternativo con placas 3M™ Petrifilm™ RYM®



Grafica 4. Diagrama de barras para la comparación de recuentos entre método de referencia y método alternativo con placas tradicionales de YGC.



En los datos crudos obtenidos mediante el presente estudio se puede observar que en algunos recuentos de las diferentes repeticiones en los niveles alto, medio y bajo, los métodos alternativos con Petrifilm y YGC obtuvieron mayores recuentos tanto para mohos como levaduras, una de las principales razones es debido a la composición de los medios referidos por las norma. En primero lugar el medio de cultivo DRBC tiene compuestos inhibidores como el dicloran y rosa de bengala que

pueden inhibir en número y tamaño a microorganismos como *Aspergillus brasiliensis* así como a las esporas viables de este, en el caso del medio DG18 dentro de su composición contiene glicerol que disminuye la actividad de agua del medio, teniendo efecto sobre el crecimiento del microorganismo y haciéndolo específico para mohos con capacidad de crecer en alimentos con condiciones de baja actividad del agua, así mismo, debido a esto se dificulta más el crecimiento de levaduras no xerófilas como *Saccharomyces cerevisiae*, que requieren una mayor actividad de agua para su crecimiento y desarrollo, además el medio de cultivo DG18 limita su uso dentro del laboratorio solo a alimentos con baja a_w , haciendo más laborioso el análisis y menos eficiente en cuanto al rendimiento dentro del laboratorio (Microkit, 2017; Merk, 2017).

Así mismo, se observa que en su mayoría, los recuentos en los diferentes niveles son equivalentes, esto debido a la composición similar de los diferentes medios de cultivo; todos los medios evaluados en el presente estudio, incluyendo las placas de Petrifilm, contienen agentes antibióticos como el cloranfenicol para inhibir el crecimiento de células bacterianas; de igual modo, la principal fuente de carbono y energía en estos medios de cultivo es la glucosa. Los medios del cultivo YGC, DRBC, DG18 y Petrifilm contienen potasio como solución tampón y un pH neutro que inhibe el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Como se nombró anteriormente, estos difieren en algunos componentes que causan la variabilidad de los recuentos; entre estos podemos encontrar el glicerol y el Dicloran en el DG18, que disminuyen la actividad del agua y actúan como antifúngicos, dificultando el crecimiento del microorganismo de interés. Por otro lado, el agar YGC además de la glucosa contiene dextrosa y extracto de levadura, por lo que este medio contiene una fuente adicional de carbono, energía y vitaminas esenciales para el crecimiento fúngico. En el agar DRBC, el rosa de bengala puede limitar en número y tamaño a los mohos, por lo que interfiere en el crecimiento de la cepa de interés y en el recuento del mismo; sin embargo, este medio contiene peptona y sulfato de magnesio que proporciona nitrógeno, vitaminas, oligoelementos y minerales que favorecen el crecimiento de estos (Microkit, 2017; Merk, 2017).

Además de la composición de los medios estudiados, la diferencia entre los recuentos se puede deber a múltiples factores que en cierta forma pueden inhibir la recuperación fúngica en los medios objeto de análisis; en primer lugar se debe considerar la microbiota presente en el momento del análisis, ya que se trabajaron con alimentos inocuos pero no estériles. En el anexo 3 se muestran recuentos iniciales; donde se evidenció la presencia de microorganismos mesófilos, por lo que en el momento de la siembra en los diferentes medios existía microbiota competitiva que hizo parte de un proceso antagónico compitiendo por los nutrientes, el espacio de adhesión/unión y/o producción de metabolitos que inhiben el crecimiento de la microbiota inoculada (Bhat, et al, 2012).

Por otro lado, también se deben considerar interferentes asociados a las matrices alimentarias evaluadas que pueden inhibir el crecimiento de las cepas utilizadas en

el estudio, como son los agentes antimicrobianos naturales del alimento o agregados en estos para alargar la vida útil del mismo, otro factores como la estructura del alimento, el potencial redox, pH, la formulación del alimento, entre otros. Un factor importante son las características genéticas asociadas a los microorganismo utilizados en el estudio, debido a que estas permiten metabolizar de forma más eficiente los nutrientes ofrecidos por el medio, ofreciendo un mejor desarrollo de aquellas especies que poseen las capacidades metabólicas para utilizarlos. Otro motivo que pudo haber generado diferencias entre los recuentos de colonias es la presencia de algunas variables que llevan al analista a cometer errores durante el conteo como son la dispersión de las colonias y el solapamiento de las mismas (Bhat, et al, 2012).

Un factor importante a considerar, es la metodología empleada en la estandarización de los inóculos, debido a que como se observa en el anexo 2, los resultados evidencian 3 unidades logarítmicas por debajo del recuento esperado en la primera dilución, así mismo, entre la segunda y la tercera dilución no se evidencia la disminución de la unidad logarítmica correspondiente, por lo que se puede inferir un error del analista en el recuento o en el procedimiento. En el presente estudio se utilizaron las 3 primeras diluciones para diferenciar los 3 niveles de contaminación, los resultados evidencian que los medios de cultivo evaluados proporcionan conteos similares a los reportados inicialmente en la estandarización del inóculo.

La estandarización de inóculos para mohos y levaduras por medio de escala Mcfarland presenta varias limitaciones; en primer lugar este método se diseñó para células microbianas, por lo que, en el momento de ser aplicado en este grupo presenta errores debido al tamaño celular, que provocan que un menor número de células ocupen un mayor espacio, es decir, el fenómeno de superficie/volumen; así mismo, la coloración o pigmentación de colonias como las de *Aspergillus brasiliensis*, pueden conducir a densidades incorrectas y por ende a contar un mayor o menor número de células. Adicionalmente, factores como: la edad de cultivo inicial y estadio del mismo, puede conducir a errores en la estandarización, generalmente se debe trabajar con cultivos jóvenes (menos de 24Hrs), sin embargo, los mohos y las levaduras pueden tardar hasta 5 días para lograr un desarrollo celular completo. Es importante acompañar la estandarización de los inóculos con otros métodos de medida de crecimiento diferentes al recuento en placa y turbidez con patrones comerciales, algunos de estos pueden ser: espectrometría, filtración e impedancia eléctrica, que permita garantizar que el número de células presentes sea el requerido (Hill, 2017).

En general, los resultados obtenidos en este estudio permitieron corroborar que las placas Petrifilm son una alternativa viable para el análisis de hongos en alimentos debido a que generan recuentos equivalentes, ofreciendo ventajas adicionales de un recuento rápido, resultados veraces y aumentado la productividad, sin embargo, se deben determinar las interferencias que inhiben la recuperación de los microorganismos de interés. A si mismo los resultados obtenidos en esta

investigación permitieron determinar, al igual que en el estudio de Taniwaki et al. (2010), una alta correlación entre los medios de cultivo tradicionales y las placas Petrifilm, infiriendo que el método alternativo usando placas de Petrifilm pueden ser utilizados como una opción factible para el análisis de alimentos independiente de la actividad de agua de este.

Como se observa en la tabla 17, existen diferencias significativas entre los costos establecidos para los medios tradicionales y las placas de Petrifilm, brindando una ventaja adicional del uso de estas placas listas para el análisis de mohos y levaduras en alimentos. En promedio un paquete de placas Petrifilm permite analizar 25 muestras, mientras que los medios de cultivo dependiendo de sus instrucciones de preparación en promedio permitirían el análisis de 900 muestras, esto se infiere que a partir de su contenido total que son 500g se preparen para análisis de alimentos. Sin embargo, es importante considerar que las placas Petrifilm son instrumentos de análisis microbiológico listo para usar en tres simples pasos: inocular, incubar y contar, en contra parte para el uso de los medios tradicionales se hace necesario considerar en el costo del análisis gastos de material como cajas de Petri, agua destilada para la preparación del medio de cultivo, gastos de luz en el procesos de esterilización mediante el uso de autoclave, además de tiempo del analista para llevar a cabo la preparación y servido de esta placas tradicionales.

Una ventaja de las placas tradicionales de YGC y las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® es que a diferencia de los medios referidos por la norma, no están sujetos a la actividad del agua del alimento para poder ser utilizados en el análisis de mohos y levaduras, esto influye directamente en la productividad dentro del laboratorio. A si mismo las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® son un método de enumeración más rápido y fácil con resultados en 48-72hrs que el método tradicional que proporciona resultados entre 3-5 días, las placas Petrifilm son un método aprobado y validado, y por tanto su uso es tan confiable como el extendido en placa utilizando los agares DG18, DRBC y YGC, además el uso de estas placas listas eliminan los problemas mencionados anteriormente que conlleva la preparación de los medios tradicionales, así mismo disminuye el volumen de residuos generados normalmente por este tipo de análisis. Las placas Petrifilm al generar un resultado más rápido, pero igual de eficiente, permiten monitorear los procesos de producción de forma más eficaz, simplificando el proceso de análisis y de esta manera cumpliendo con los parámetros de calidad cada vez más estrictos (3M ciencia para la vida, 2020).

7. CONCLUSIONES

- Las placas 3M™ Petrifilm™ RYM® son eficientes para el recuento de mohos y levaduras en matrices alimentarias con diferente actividad de agua, esto se determinó a partir de los análisis estadísticos que muestran que no existen diferencias significativas entre los recuentos en placa con medios tradicionales y las placas Petrifilm.
- Se determinó que no existen diferencias entre, la capacidad de recuperación de las metodologías alternativas con agar YGC y Petrifilm, y los recuentos con Agar DRBC y DG18. Esto se evidenció debido a que los métodos alternativos recuperan el mismo número de células que el método de referencia, determinado por las pruebas estadísticas F y gráficos de barras, que permiten considerar a estas metodologías alternativas como viables para el análisis de mohos y levaduras en alimentos.
- El análisis de económico permitió determinar que el uso de placas 3M™ Petrifilm™ RYM® es una metodología viable económicamente para el análisis este grupo microbiano en alimentos.

8. RECOMENDACIONES

- Extender este tipo de estudios para evaluar otras metodologías alternativas que permitan el recuento rápido, veraz y oportuno de microorganismos indicadores, así mismo que se realice este estudio comparativo con otros grupos microbianos de interés en la industria alimentaria, de forma que los laboratorios dedicados al análisis y los clientes cuenten con alternativas económicas para el análisis de sus productos.
- Comparar otros medios de cultivo disponibles en el mercado para el análisis de mohos y levaduras como: OGY, M-GREEN, Sabouraud, PDA, Malta y Czapek, de forma que los laboratorios de análisis puedan contar con una amplia variedad de medios que permitan el análisis de este grupo microbiano pero garantizando la capacidad de estos para la recuperación de las células presentes en los alimentos.
- En próximos estudios se recomienda trabajar con alimentos estériles o realizar una caracterización inicial de la microbiota presente en el alimento a fin de garantizar que no hayan otros grupos microbianos que influyan en el desarrollo del microorganismo de interés, así mismo de realizar un estudio de los posibles interferentes en los alimentos que puedan inhibir el crecimiento de los microorganismos objeto de análisis.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alonso, L., Poveda, J. (2017). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y las placas de Petrifilm para el análisis de alimentos. Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana. <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>.

Beuchat, L. R., & Mann, D. A. (2016). Comparison of New and Traditional Culture-Dependent Media for Enumerating Foodborne Yeasts and Molds. *Journal of food protection*, 79(1), 95–111. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-357>

Bird, P., Flannery, J., Crowley, E., Agin, J., Goins, D., & Jechorek, R. (2015). Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for the Enumeration of Yeast and Mold in Food: Collaborative Study, First Action 2014.05. *Journal of AOAC International*, 98(3), 767–783. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.5740%2Fjaocaint.15-006>

Blackwell, M., Rytas, V., Timothy, Y., Taylor, J. (2012). Hongos. Eumycota: hongos, hongos del saco, levaduras, mohos, royas, obscenidades. Versión 30 de enero de 2012. <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30>

Bhat, R., Alias, K., Paliyath, G. (2012). Factors Affecting the Growth of Microorganisms in Food. Cap. 20. (p.p 406-408). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119962045.ch20>.

Cabeza, E., Cabeza R. (2014). Fundamentos de Microbiología Predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas. (p.p37-92). Universidad de Pamplona. Documento en pdf.

Chulze, S. (2017). Food mycology: ¿An emerging discipline? *Revista Argentina de Microbiología*. 49(4): 303-304. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.001>

Dueñas, Y. (2017). Validación microbiológica de un método rápido para la cuantificación de hongos en harina de maca. Tesis de pregrado, Universidad Ricardo Palma. Perú. Repositorio institucional URP. http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1696/Due%C3%B1as_y.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Estrada, G., Ramírez, M. (2019). Microbiología General. 1^{ra} edición. Cap. 1. Universidad de Manizales. Colombia. (p.p 36-40). http://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/libros/Micologia_general.pdf

FDA (Administración de medicamentos y alimentos). (2001). Bacteriological Analytical Manual. 8^a edición. Cap. 18. [HTTPS://WWW.FDA.GOV/FOOD/LABORATORY-METHODS-FOOD/BAM-CHAPTER-18-YEASTS-MOLDS-AND-MYCOTOXINS](https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins).

Guzmán, F. (2011). Linealidad: Líneas de ajuste, interpolación y extrapolación. (p 2). <http://www.metas.com.mx/guiametas/La-Guia-MetAs-08-01-linealidad.pdf>.

Hamilton, S. (2020). Advantages and disadvantages of selective media. Recuperado https://www.ehow.co.uk/info_8707617_advantages-disadvantages-selective-media.html

Hill, R. (2017). McFARLAND STANDARD. DALYNN BIOLOGICALS. https://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM59.pdf

Humphreys, E. (2016). Yeasts and Molds: The Hungry Invaders. <https://www.thermofisher.com/blog/food/yeasts-and-molds-the-hungry-invaders/>

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2007) Análisis microbiológico de la harina de trigo. Norma número 267. <http://www.analisisambiental.com.co/wp-content/uploads/2014/03/NTC267.pdf>

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2008^a). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (aW) superior a 0,95". Norma número 5698-1.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2008^b). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (aW) inferior o igual a 0,95". Norma número 5698-2.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.(2014). Productos derivados de molinería. Norma número 1363. es.calameo.com/books/

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2018). Productos lácteos leche concentrada azucarada. Norma número 879. <http://sectorlacteoencolombia.blogspot.com/2011/12/ntc-879-productos-lacteosleche.html>

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2000). Derivados lácteos Fermentados. Norma numero 805. https://www.academia.edu/11858788/NORMA_T%C3%89CNICA_NTC_COLMBIANA_805

ISO (Organización Internacional de Normalización). (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Norma número 21527. Documento en pdf.

ISO (Organización internacional de normalización). (2016). Validación. Parte 2: protocolo de validación de métodos alternativos frente a métodos de referencia. Norma número 16140-2. Documento pdf.

ISO (Organización internacional de normalización). (2014). Validación. Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un solo laboratorio. Norma número 16140-3. Documentos pdf.

ISO (Organización internacional de normalización). (2017) Microbiology of the food chain — Method validation —Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory. Norma número 16140-3. Documento pdf

3M ciencia para la vida. (2020). Placas Petrifilm™ para el Recuento Rápido de Mohos y Levaduras. <https://multimedia.3m.com/mws/media/1409680O/guia-interpretacion-petrifilm-hongos-y-levaduras-rapida.pdf>

3M FOOD SAFETY. (2016). Placas 3M Petrifilm® mejorando la productividad reduciendo los costos. 3M FOOD SAFETY MAGAZINE. 5ª edición. (p.4). <https://multimedia.3m.com/mws/media/1533820O/revista-safefood-5a-edicion-2016.pdf>

Medina, L., Jordano, R.(2019). Petrifilm – A Simplified Technique for Microbiological Testing of Foods and Beverages. El sevier. 20(3). 35-49. <http://doi.org/978-0-12-384730-0.00250-0>

Merk (2017). YGC Agar 95765. [online] Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/95765?lang=en®ion=CO>

McGinnis, M. Tuning, S. (2010). Introduction to Mycology.4ª edición. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8125/>.

Microkit (2017). Dicloran Rosa Bengala Cloranf. <http://www.medioscultivo.com/dicloran-rosa-bengala-cloranf-agar-drbc/>

MicroPop.(2012). Multicellular Yeast Primer.<http://micropop.cbs.umn.edu/projects/multicellular-yeast/multicellular-yeastprimer.html>.

Ministerio de salud y protección social, (2017). Seguridad alimentaria y nutrición. <https://www.minambiente.gov.co/index.php/asuntos-ambientales-sectorial-y-urbana/sostenibilidad-sectores-productivos/seguridad-alimentaria-y-nutricional>

Ministerio de protección social, (2013). Legislación de alimentos en Colombia. <https://foman.com.co/legislacion-alimentos-colombia/>

Pérez, R. (2017). Evaluación de condiciones higiénicas sanitarias en el proceso de elaboración y envasado de alimentos en polvo con técnica de siembra rápida para microorganismos indicadores. Tesis de pregrado, Universidad autónoma de México. <https://core.ac.uk/download/pdf/154796047.pdf>.

Resolución 4393 (1991). Requisitos para pastas alimenticias. Ministerio de protección social. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resolucion-4393-de-1991.pdf>

Resolución 1511 (2011). Ministerio de salud y protección social. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resolucion-1511-de-2011.pdf>

Sanchez, R. (2015). Fisher's t. Uses and abuses. Scielo. 26(1). 113-120. México. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-21982015000100009 .

Snyder, A., Worobo, R., (2018). Fungal Spoilage in Food Processing. <https://meridian.allenpress.com/jfp/article-abstract/81/6/1035/174121/Fungal-Spoilage-in-Food-Processing?redirectedFrom=fulltext>

Taniwaki, M. H., Silva, N., Banhe, A. A., & Iamanaka, B. T. (2010). Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. Journal of food protection. 64(10). 1592-1596. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.10.1592>

Warren, A., Weber, F., Crespo R., (2016). Comparison of conventional plating methods and Petrifilm™ for the recovery of aerobic bacteria and mold from hatchery fluff samples. 25(1). 48-3. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv060>

10. ANEXOS

Anexo 1. Datos crudos del análisis comparativo

LEVADURAS	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	M6	M6
	DRBC UFC/g		DG18 UFC/g		DG18 UFC/g		DRBC UFC/MI		DRBC UFC/g		DG18 UFC/g	
BAJO	1000	1200	1500	1800	1700	1600	1500	1800	1000	1100	1600	1800
MEDIO	4000	4800	4200	3900	4400	4700	4500	4300	4500	3900	4700	4900
ALTO	12000	11000	10000	10000	11000	10000	10000	12000	1100	10000	10000	10000

MOHOS	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	M6	M6
	DRBC UFC/g		DG18 UFC/g		DG18 UFC/g		DRBC UFC/ml		DRBC UFC/g		DG18 UFC/g	
BAJO	900	700	1000	1100	1000	1000	1200	1100	900	1000	1200	1100
MEDIO	3500	3800	4100	4200	4400	3900	4200	3800	4000	4300	4700	4300
ALTO	10000	9000	12000	12000	10000	10000	10000	1100	10000	10000	10000	9000

Levadura	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	M6	M6
	PETRIFILM UFC/g		PETRIFILM UFC/g		PETRIFILM UFC/g		PETRIFILM UFC/ml		PETRIFILM UFC/g		PETRIFILM UFC/g	
BAJO	1100	1100	1200	900	1500	1200	1100	1200	1500	1300	1400	1200
MEDIO	4400	4900	4000	3700	4400	5100	5000	5300	4200	5000	4500	5800
ALTO	10000	10000	9000	9000	10000	10000	9800	10000	10000	10000	10000	10000

Mohos	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	M6	M6
	PETRIFILM UFC/g		PETRIFILM UFC/g		PETRIFILM UFC/g		PETRIFILMUFC/ml		PETRIFILM UFC/g		PETRIFILM UFC/g	
BAJO	1100	1100	1200	900	1500	1200	1100	1200	1500	1300	1400	1200
MEDIO	4400	4900	4000	3700	4400	5100	5000	5300	4200	5000	4500	5800
ALTO	10000	10000	9000	9000	10000	10000	9800	10000	10000	10000	10000	10000

Levadura	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	M6	M6
	YGC UFC/g		YGC UFC/g		YGC UFC/g		YGC UFC/ml		YGC UFC/g		YGC UFC/g	
BAJO	1000	12000	1600	1800	900	1200	1200	1300	1100	1500	1500	1400
MEDIO	4800	5100	4200	4400	5000	4700	3800	3900	5000	4300	4700	4300
ALTO	10000	10400	11000	11400	10900	11300	10800	11200	11000	12100	10400	11000

Mohos	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	M6	M6
-------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

	YGC UFC/g		YGC UFC/g		YGC UFC/g		YGC UFC/ml		YGC UFC/g		YGC UFC/g	
BAJO	1500	2000	2400	2600	1800	1800	2100	1800	2100	2200	2400	2500
MEDIO	6500	7000	6100	5700	5100	6000	4500	4500	5300	6000	5500	5900
ALTO	11000	11000	11000	11000	11000	11000	10000	11000	12000	11000	10000	10000

Anexo 2. Recuento de la escala McFarland.

Recuento de mohos	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Caja 1	14500	5400	1300	480	98	9	<10
Caja 2	15000	4900	1500	450	86	9	<10

Recuento de lavaduras	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Caja 1	17800	8700	2500	670	59	6	<10
Caja 2	15500	7700	3000	560	86	5	<10

Anexo 3. Análisis microbiológico inicial.

Recuento inicial de Aerobios mesófilos.	M1 Pan Tajado	M2 Leche en polvo	M3 Harina de trigo	M4 Jugo de Fruta	M5 Mayonesa	M6 Croqueta
10^{-1}	50	10	70	10	50	10
10^{-2}	<10	<10	<10	<10	<10	<10
10^{-3}	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Recuento inicial de mohos y levaduras.	M1 Pan Tajado	M2 Leche en polvo	M3 Harina de trigo	M4 Jugo de Fruta	M5 Mayonesa	M6 Croqueta
10^{-1}	<10	<10	<10	<10	<10	<10
10^{-2}	<10	<10	<10	<10	<10	<10
10^{-3}	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Nota: El resultado <10 manifiesta ausencia de crecimiento.