

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

IMPLEMENTACIÓN DE LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA EN PLANTA DE
CONSERVAS DE ALIMENTOS

Trabajo de graduación presentado por
Nancy Aracely Linde Corado para optar al
grado académico de Licenciada en
Ingeniería en Ciencia de los Alimentos

Guatemala

2011

IMPLEMENTACIÓN DE LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA EN PLANTA DE
CONSERVAS DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

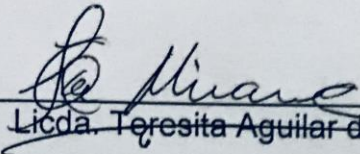
IMPLEMENTACIÓN DE LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA EN PLANTA DE
CONSERVAS DE ALIMENTOS

**Trabajo de graduación presentado por Nancy
Aracely Linde Corado para optar al grado
académico de Licenciada en Ingeniería en
Ciencias de los Alimentos**

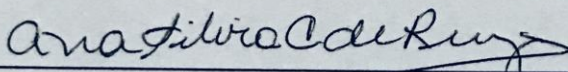
Guatemala

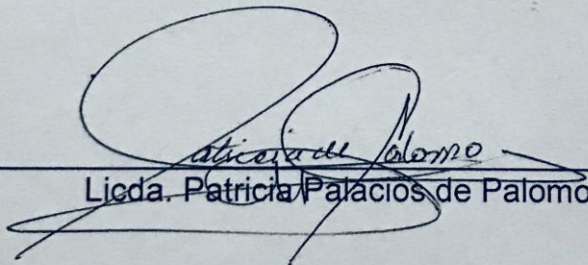
2011

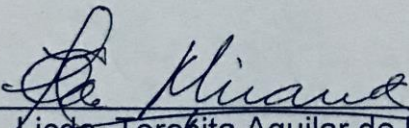
Vo. Bo. :

(f) 
Licda. Teresita Aguilar de Miranda

Tribunal Examinador:

(f) 
Licda. Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f) 
Licda. Patricia Palacios de Palomo

(f) 
Licda. Teresita Aguilar de Miranda

Fecha de aprobación: Guatemala, 25 de noviembre de 2011✓

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	VII
RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
A. Generales	3
B. Específicos	3
III. MARCO TEÓRICO	4
A. CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR RIESGO:	4
B. FACTORES DE RIESGO	4
C. ORIGEN DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN LOS ALIMENTOS.	4
D. PUNTOS CRÍTICOS PARA LA CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS:	4
E. IMPORTANCIA PATOLÓGICA	5
F. PRINCIPALES ENFERMEDADES TRASMITIDAS POR ALIMENTOS:	5
G. GRUPOS DE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE ALTERACIONES EN ALIMENTOS ENLATADOS SEGÚN EL GRADO DE ACIDEZ	6
H. PRINCIPALES MICROORGANISMOS CAUSANTES DE ALTERACIONES EN ALIMENTOS ENLATADOS	7
1. EN ALIMENTOS POCO ÁCIDOS O SEMIÁCIDOS ($\text{pH} > 4.5$)	7
2. EN ALIMENTOS DE ÁCIDOS O ACIDIFICADOS: ($3.7 < \text{pH} < 4.5$)	8
I. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS	8
J. MICROORGANISMOS INDICADORES	9
K. PRINCIPALES MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS	10
L. ESPECIFICACIONES, EQUIPO E INSTRUMENTAL BÁSICO EN LA IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO MICROBIOLÓGICO	11
IV. DELIMITACIÓN E IMPACTO DEL TEMA	14
V. METODOLOGÍA DE LOS EXPERIMENTOS	15
A. DISEÑO 1 Recuento en placa:	15
1. Equipo e Instrumental de Laboratorio	15
2. Consumibles	15
3. Procedimiento	16
4. Inversión	17
5. Resultados Diseño 1	18

B. DISEÑO 2 Recuento con Placas PETRIFILM:	19
1. Equipo e instrumental de Laboratorio	19
2. Consumibles	19
3. Procedimiento	20
4. Inversión	21
5. Resultados Diseño 2	21
C. DISEÑO 3 Recuento con Sistema Simplate:	23
1. Equipo e instrumental de Laboratorio	23
2. Consumibles	23
3. Procedimiento	23
4. Inversión	24
5. Resultados Diseño 3	25
VI. RESULTADOS	27
A. TABLAS COMPARATIVAS DE COSTOS	27
Tabla 22: COMPARATIVO DE COSTOS POR PRUEBA PARA DIFERENTES MÉTODOS PARA COLIFORMES	27
Tabla 23. COMPARATIVO DE COSTOS POR PRUEBA PARA DIFERENTES MÉTODOS PARA RECuento TOTAL	28
Tabla 24. RESUMEN DE COSTO POR PRUEBA PARA LOS MÉTODOS ANALIZADOS	28
TABLA 25. COMPARATIVA DE TÉCNICAS DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS	29
B. TABLAS DE RESULTADOS EMPRESA SUBCONTRATADA	30
Tabla 26. Resultados empresa sub contratada. Producto: Palmito en salmuera muestras incubadas	30
Tabla 27. Resultados empresa sub contratada. Producto: Palmito en salmuera muestras no incubada	30
Tabla 28. Resultados empresa sub contratada. Producto: Piña en almíbar muestra incubada	31
Tabla 29. Resultados empresa sub contratada. Producto: Piña en almíbar muestra no incubada	31
VI. DISCUSIÓN	33
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
VIII. BIBLIOGRAFÍA	36
IX. ANEXOS	38
DISEÑO DE LABORATORIO	38
TABLA DE CONVERSIÓN SIMPLATE	39

LISTA DE TABLAS

I.	:Puntos críticos para la contaminación alimentos.....	4
II.	Principales enfermedades transmitidas por alimentos.....	5
III.	Grupos de microorganismos causantes de alteraciones en alimentos enlatados según el grado de acidez.....	7
IV.	Inversión equipo e instrumental de Laboratorio para el método de recuento en placa.....	17
V.	Inversión Material consumible para 500 pruebas con el método de recuento en placa.....	17
VI.	Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Palmito en Salmuera muestras incubadas.....	18
VII.	Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Palmito en Salmuera no incubadas.....	18
VIII.	Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Piña en almíbar muestras incubadas.....	18
IX.	Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Piña en almíbar muestras no incubadas.....	19
X.	Inversión equipo e instrumental de Laboratorio para el método recuento con placas Petrifilm.....	21
XI.	Inversión en material Consumible para 500 pruebas con método recuento con placas Petrifilm.....	21
XII.	Resultados método Petrifilm. Producto: Palmito en salmuera muestras incubadas.....	21
XIII.	Resultados método Petrifilm. Producto: Palmito en salmuera muestras no incubadas.....	22
XIV.	Resultados método Petrifilm. Producto: Piña en almíbar.....	22
XV.	Resultados método Petrifilm. Producto: Piña en almíbar muestras no incubadas.....	22
XVI.	Inversión equipo e instrumental de Laboratorio método con sistema Simplate.....	24
XVII.	Inversión material consumible para 500 pruebas método con sistema Simplate.....	25
XVIII.	Resultados método de Recuento en sistema Simplate. Producto: Palmito en salmuera muestras incubadas.....	25
XIX.	Resultados método de Recuento en sistema Simplate. Producto: Palmito en salmuera muestras no incubadas.....	25
XX.	Resultados método de Recuento en sistema Simplate. Producto: Piña en almíbar muestra incubada.....	26
XXI.	Resultados método de Recuento en sistema Simplate. Producto: Piña en almíbar muestras no incubadas.....	26
XXII.	Comparativo de costos por prueba para diferentes métodos para Coliformes.....	27
XXIII.	Comparativo de costos por prueba para diferentes métodos para Recuento Total.....	28
XXIV.	Resumen de costo por prueba para los métodos analizados.....	28
XXV.	Comparativa de técnicas de los métodos utilizados.....	29
XXVI.	Resultados empresa sub contratada. Producto: Palmito en salmuera muestras incubadas.....	30

XXVII.	Resultados empresa sub contratada. Producto: Palmito en salmuera muestras no incubada.....	30
XXVIII.	Resultados empresa sub contratada. Producto: Piña en almíbar muestra incubada	31
XXIX.	Resultados empresa sub contratada. Producto: Piña en almíbar muestra no incubada.....	31

RESUMEN

Este trabajo surge debido a la necesidad de realizar análisis microbiológicos en los alimentos que se producen debido a la necesidad de ofrecer alimentos inocuos en el mercado. Adicionalmente, realizar análisis microbiológico es un requisito legal para poder comercializar y vender el producto en los distintos mercados.

Existen varias empresas que ofrecen el servicio de análisis de forma externa a la empresa, sin embargo este trabajo se basa en la implantación de un laboratorio de microbiología en una planta de conservas de alimentos. Las principales razones para hacer el estudio comparativo de hacer las pruebas en la planta vs. la subcontratación del servicio son las siguientes:

1. Los resultados se tienen de forma más rápida, lo que permite la liberación de lotes.
2. Se puede incrementar la frecuencia de algunos análisis, ejemplo: superficies y manos
3. Se pueden tomar acciones correctivas de forma inmediata.

Para poder determinar los costos de la implementación de un laboratorio de microbiología se realizó una comparación de los costos de inversión del montaje de laboratorio partiendo de los requisitos del método de análisis a utilizar.

Para este estudio se llevó a cabo la comparación del método recuento en Placa tradicional, método de recuento en placa Petrifilm y método Simplate. Se hace un análisis del costo de utilizar cada método, en lo referente a materiales de laboratorio y materiales consumibles. Con cada método se validan los resultados obtenidos.

Es importante mencionar que todos los métodos son válidos y que cada uno tiene sus ventajas. La elección del método dependerá de los siguientes factores: Recursos disponibles para la inversión inicial, tamaño de la empresa que se relaciona directamente con la cantidad de muestras a analizar, disponibilidad de mano de obra calificada.

Para la empresa en la que se hizo el estudio el método más adecuado es el Simplate debido a lo siguiente: rapidez en la realización de la prueba, precio más bajo por análisis de los métodos comparados y no requiere personal especializado para la interpretación de los resultados por ser un método colorimétrico.

Por todo lo mencionado anteriormente, este trabajo recomienda la implementación de un laboratorio de microbiología en todas aquellas empresas que requieran de realizar múltiples análisis rutinarios de identificación de microorganismos

I. INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido que los alimentos pueden ser transmisores de enfermedades infecciosas. Incluso hoy día, a pesar de que existe una mayor información acerca de los microorganismos y su propagación, la contaminación de alimentos por microorganismos es un gran problema. (OMS,2001)

Los consumidores de la actualidad están más conscientes de dichas transmisiones por lo que exigen alimentos inocuos. (Libres de microorganismos patógenos que pueden ocasionar enfermedades). (OMS,2001)

Así mismo los microorganismos son un factor importante en las empresas de alimentos porque el desarrollo microbiano destruye grandes cantidades de alimentos, causando problemas económicos. (Frances, Pouch Downes, 2001)

En todo Control Microbiológico de Calidad destacan dos aspectos:

- **Aspecto Higiénico-Sanitario:** Busca que no proliferen microorganismos patógenos, que pueden ocasionar problemas para la salud.
- **Aspecto Comercial:** Busca evitar la presencia de microorganismos alterantes que descompongan el alimento, haciéndolo no apto para el consumo. (OMS,2001)

La pérdida de calidad de un alimento, por tanto, puede ser debida a la presencia de microorganismos patógenos o de microorganismos alterantes.

De ahí surge la necesidad que todas las industrias productoras de alimentos conozcan la calidad microbiológica de sus productos a todo nivel: materias primas, procesos de elaboración (personal y superficies de contacto) y producto final. En el producto final es sumamente importante verificar la calidad microbiana en el tiempo, para poder establecer la vida útil de los productos. (Caballero Torres, 2008)

Para el control de los microorganismos presentes en los alimentos existen diferentes métodos que lo que buscan es llevar la carga microbiana a niveles que no ocasionen problemas a la salud del consumidor. El control básicamente se realiza en dos formas: por eliminación o por inhibición de crecimiento microbiano. (Frazier, 2003)

Los métodos a utilizar para el control de los microorganismos dependen de varios factores: sensibilidad de los microorganismos a controlar, sensibilidad al calor o al frío de los microorganismos, necesidades de agua, sensibilidad a los

álcalis, a la radiación, sensibilidad a productos químicos y a la carga inicial de microorganismos en el alimento. (Downing Donald,1996)

El análisis microbiológico dentro de una planta de alimentos permite garantizar al consumidor un abastecimiento de productos inocuos y evitar el deterioro de los mismos.

Para poder obtener información acerca de la calidad microbiológica de un producto es necesario llevar a cabo análisis microbiológicos. La cantidad y técnicas de análisis, así como la frecuencia de los mismos varían según el producto. (Downing Donald,1996)

Para el análisis microbiológico se cuenta con diferentes metodologías: Las metodologías tradicionales de recuento en placa Petrí y recientemente se han hecho muchas investigaciones desarrollando métodos alternativos. (Michanie Silvia, 2005)

Dentro de las principales razones para el desarrollo de métodos alternativos se pueden mencionar las siguientes: liberación rápida de lotes de producción, reducir el trabajo manual, facilitar la eliminación de desechos biológicos, entre otros. (Michanie Silvia, 2005)

Dentro de los métodos alterativos se pueden mencionar: membranas rehidratables (Petrifilm, Sanita Kun, Compact Dry), Spiral Plater, Redigel, Membranas Hidrofóbicas Cuadrículadas, SimPlate, etc. (Michanie Silvia, 2005)

Antes de elegir el método a utilizar es importante tomar en cuenta los microorganismos a analizar, las ventajas reales del método en comparación con los métodos tradicionales, que el método esté disponible en el mercado y que este validado por autoridades internacionales reconocidas. (Michanie Silvia, 2005)

II. OBJETIVOS

A. Generales

Realizar un estudio de los diferentes tipos de microorganismos involucrados en el deterioro de los alimentos, determinar los métodos utilizados para su detección y en base a esto hacer una propuesta concreta sobre la implementación de un laboratorio de microbiología en una planta productora de conservas de alimentos.

B. Específicos

1. Determinar por medio de la investigación los principales microorganismos que están relacionados con la descomposición de los alimentos en conserva, (específicamente piña en almíbar y palmito en salmuera).
2. Realizar un estudio de los distintos métodos de análisis microbiológicos que existen en la actualidad y hacer una comparación de costo-beneficio, para poder determinar el método más adecuado a utilizar en una planta de conservas de alimentos.
3. Determinar las características generales con que debe contar el laboratorio de microbiología para una empresa de conservas, incluyendo área de trabajo, mobiliario, utensilios, materiales y personal para realizar los análisis.
4. Analizar la factibilidad de la implementación del laboratorio en la empresa procesadora, mediante una comparación de los costos de implementación y de seguimiento vrs. los costos de la subcontratación del servicio.

III. MARCO TEÓRICO

A. CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR RIESGO:

Para registro y vigilancia sanitaria se clasifican los alimentos basándose en los factores de riesgo de la siguiente manera:

- Riesgo tipo A: Alimentos que tienen una alta probabilidad de causar daño a la salud.
- Riesgo tipo B: Alimentos que tienen una mediana probabilidad de causar daño a la salud.
- Riesgo tipo C: Alimentos que tienen una baja probabilidad de causar daño a la salud. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2008).

B. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo de los alimentos, dependen de su composición, pH, acidez, actividad de agua, del proceso de elaboración, condiciones de almacenamiento y conservación. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2008).

C. ORIGEN DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN LOS ALIMENTOS.

Según la procedencia de los agentes biológicos se agrupan en dos categorías:

1. **Origen endógeno:** Están presentes en el producto o materia prima antes de su obtención o procesado.
2. **Origen exógeno:** No están presentes en el producto o materias primas en el momento de la obtención, sino que se sumaron posteriormente a él, a partir del ambiente, manipulación, procesado, transporte, etc. (Nutrición y Salud Pública, 2006)

D. PUNTOS CRÍTICOS PARA LA CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS:

Tabla I. Puntos críticos para la contaminación de alimentos.

ETAPA DEL PROCESO	FUENTE DE LA CONTAMINACIÓN	AGENTE (s)	ALIMENTOS EN LOS QUE ESTA PRESENTE
Recepción de materia prima	agua de riego, manipulación, almacenamiento o transporte	<i>C.perfringens</i> , <i>S.aureus</i> y <i>Salmonella</i>	carnes rojas
		<i>V.parahaemolyticus</i>	Huevos
		<i>C.perfringens</i> y <i>B.cereus</i>	vegetales y especias
		<i>B.cereus</i>	arroz y cereales

Tabla II.

TAPA DEL PROCESO	FUENTE DE LA CONTAMINACIÓN	AGENTE (s)	ALIMENTOS EN LOS QUE ESTA PRESENTE
Proceso	contaminación cruzada, inadecuadas temperaturas y tiempos de cocción	Esporas o Enterotóxicas de microorganismos patógenos (<i>S. aureus</i>)	Principalmente carnes rojas
Post-Proceso	manipulación por personas portadoras de algún microorganismo o enfermas	<i>S.aureus</i>	pescado, leche y sus derivados, pollo y productos cárnicos
		<i>C.perfringens</i>	carne y aves de corral, productos de cereales y salsas
		virus de la hepatitis	leche, mariscos, agua
		<i>Salmonella</i>	leche cruda y productos lácteos; carne: de ave y bovina; mariscos, hortalizas crudas; huevo

Fuente SSA, México 2001

E. IMPORTANCIA PATOLÓGICA

La enfermedad transmitida por alimentos ha sido determinada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico, causada por el consumo de alimentos o agua contaminados. Estas enfermedades tienen el denominador común de un corto período de incubación y de un cuadro clínico gastroentérico: diarrea, vómitos, dolor abdominal, etc. muchas veces acompañado de fiebre. En general, son de corta duración y es habitual la recuperación total de los pacientes sin tratamiento médico, aunque pueden surgir complicaciones, incluso mortales, en niños, ancianos o personas inmuno comprometidas. (OMS,2001)

F. PRINCIPALES ENFERMEDADES TRASMITIDAS POR ALIMENTOS:

Tabla II. Principales enfermedades transmitidas por alimentos

1. ENFERMEDADES BACTERIANAS:

ENFERMEDAD	AGENTE QUE LA CAUSA	ALIMENTOS INVOLUCRADOS
Salmonelosis	<i>Salmonella spp.</i>	Leche cruda y productos lácteos; carne: de aves y bovina, mariscos, hortalizas crudas, huevos

Botulismo	AGENTE QUE LA CAUSA ENFERMEDAD	ALIMENTOS INVOLUCRADOS Conservas de alimentos industrializadas; alimentos envasados al alto vacío
Infección Enteropatógena	<i>Escherichia coli</i>	Leche cruda, hortalizas regadas con aguas negras; alimentos manipulados con manos sucias
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Alimentos marinos crudos
ENFERMEDAD	AGENTE QUE LA CAUSA	ALIMENTOS INVOLUCRADOS
Disentería Bacilar (Shigellosis)	<i>Shigella s.p.</i>	Frutas y hortalizas, frijoles, atún, camarones; carnes y aves de corral
Escarlatina, dolor de garganta	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Leche, huevo y sus derivados
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Pescado, frutas y hortalizas, agua
Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Leche

2. ENFERMEDADES VIRALES:

ENFERMEDAD	AGENTE QUE LA CAUSA	ALIMENTOS INVOLUCRADOS
Hepatitis infecciosa	Virus de la hepatitis A	Leche, mariscos, agua

3. ENFERMEDADES PARASITARIAS:

ENFERMEDAD	AGENTE QUE LA CAUSA	ALIMENTOS INVOLUCRADOS
Taeniasis	<i>Taenia saginata, Taenia solium</i>	Carne de cerdo y bovino mal cocinada
Cisticercosis	Huevos de <i>Taenia solium</i>	Alimentos contaminados con agua negras
Ascariasis	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Hortalizas y frutas crudas
Enterobiasis	<i>Enterobius vermicularis</i>	Alimentos contaminados con aguas negras
Giardiasis	<i>Giardia lamblia</i>	Alimentos crudos contaminados con aguas negras

Fuente, INCAP (1992)

G. GRUPOS DE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE ALTERACIONES EN ALIMENTOS ENLATADOS SEGÚN EL GRADO DE ACIDEZ

Tabla III. Grupos de microorganismos causante de alteraciones según el grado de acidez

Grupos según grado de acidez	Rango de pH	Grupos de alimentos	Microorganismos
Grupo 1: poco ácidos	≥ 5	Productos cárnicos	Aerobios esporulados

		Productos marinos Leche Hortalizas	Anaerobios esporulados Levaduras, mohos y bacterias no esporuladas
Grupos según grado de acidez	Rango de pH	Grupos de alimentos	
Grupo 2: semiácidos	$4,5 \leq 5,0$	Mezclas de carne y vegetales Sopas Salsas	
Grupo 3: ácidos o acidificados	$3,7 \leq 4,5$	Tomates Peras Higos Piña Otras frutas	Bacterias esporuladas Bacterias no esporuladas Levaduras Mohos
Grupo 4: muy ácidos	$< 3,7$	Encurtidos Pomelo Zumos cítricos	No hay presencia debido al pH

Fuente, (Cameron y Esty, 1940)

H. PRINCIPALES MICROORGANISMOS CAUSANTES DE ALTERACIONES EN ALIMENTOS ENLATADOS

1. EN ALIMENTOS POCO ÁCIDOS O SEMIÁCIDOS (pH>4.5)

a. Aerobios esporulados: Los más difundidos son los del género *Bacillus*, que tiene su origen en el suelo y agua, por lo que casi siempre están presentes en las materias primas empleadas en conservas. Se pueden encontrar aerobios obligados, como anaerobios facultativos, estos últimos capaces de crecer en condiciones de vacío. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 28 y 40 °C para la mayoría, aunque existen algunos termófilos, que pueden desarrollarse a 55 °C e incluso 70 °C.

Los tipos de alteraciones que pueden tener lugar son: la fermentación simple, que es la más común y no produce gas (*B. stearothermophilus* y *B. coagulans* son los principales termófilos causantes), la producción de gas y la producción de ácido y gas. (Downing Donald,1996)

b. Anaerobios esporulados: Los anaerobios esporulados proceden principalmente del suelo. El más importante es el género *Clostridium*: termófilos y mesófilos. Dentro de los *Clostridium* termófilos los sacarolíticos son los más importantes en alimentos en conserva, ya que produce una gran cantidad de gas con formación de hidrogeno que provoca abombamiento en las latas, esto va acompañado de olor butírico sin presencia de ácido sulfhídrico. Su temperatura óptima es de 55°C. También pueden provocar alteración sulfurosa con producción de ácido sulfhídrico.

De los *Clostridium* mesófilos el de mayor importancia es *Clostridium botulinum*. por ser el microorganismo más resistente y dañino para la salud, por lo

que se requiere que los alimentos con un pH mayor de 4.5 tengan como mínimo un proceso de esterilización durante 2.8 minutos a 121.1°C. (Downing Donald,1996)

La temperatura óptima de crecimiento de los organismos mesófilos oscila entre los 20 y 50 °C (óptima es de 37 °C) (Downing Donald,1996)

c. Levaduras, mohos y bacterias no esporuladas: Para los alimentos con acidez baja y media solo son relevantes los de baja resistencia térmica, comúnmente presentes por fugas en los envases. (Downing Donald,1996)

2. EN ALIMENTOS DE ÁCIDOS O ACIDIFICADOS: (3.7 < pH < 4.5)

a. Bacterias esporuladas: Son del tipo anaerobio sacarolíticas, siendo las más importantes *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus macerans* que producen la alteración en frutas en conserva y *Bacillus polymixa* que produce alteración en vegetales y frutas enlatadas. (Downing Donald,1996)

b. Bacterias no esporuladas: Se pueden desarrollar en condiciones de poco oxígeno (vacío) y se les relaciona con la fermentación en vegetales, generalmente forman gas. No son resistentes a altas temperaturas. La de mayor importancia en la alteración de frutas en conserva es *Leuconostoc mesenteroides* que se asocia a producción gaseosa en piña. (Downing Donald,1996)

c. Levaduras: No se suelen encontrar en alimentos en conserva sometidos a proceso térmico debido a su baja resistencia al calor. Se pueden encontrar luego de haberse presentado una fuga en el envase. (Downing Donald,1996)

d. Hongos: La especie de mayor relevancia en los alimentos enlatados ácidos es *Byssochlamys fulva* que afecta principalmente a frutas y ocasiona abombamiento en los envases debido al desprendimiento de dióxido de carbono. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C y es resistente a 90°C por 12 minutos.

Byssochlamys Nivea se asocia a alteración de fresas enlatadas al igual que *Aspergillus*. *Rhizopus nigricans* es responsable de la degradación de las frutas enlatadas y especialmente del albaricoque. (Downing Donald,1996)

I. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

El control microbiológico en los alimentos es de vital importancia debido al aumento de la producción de alimentos industrializados en los que se incrementa el riesgo de contaminación que podría ocasionar alguna enfermedad. Además las autoridades legales están más pendientes en la actualidad del cumplimiento de

normas que garanticen la inocuidad de los alimentos que se comercializan. (Caballero Torres, 2008)

El principal objetivo del control microbiológico de alimentos es detectar la presencia de los microorganismos patógenos o tóxicos y las fuentes de contaminación que los ocasionan para poder tomar las acciones correctivas necesarias. De la misma forma, sirve para determinar la aceptabilidad comercial, por medio de la determinación de ausencia de microorganismos que pueden provocar alteraciones en las características del alimento y para poder establecer la vida útil de los alimentos. (Caballero Torres, 2008)

Por esta razón el control microbiológico está orientado a la investigación de:

- Microorganismos alteradores
- Microorganismos indicadores y
- Microorganismos patógenos y/o sus toxinas. (Caballero Torres, 2008)

J. MICROORGANISMOS INDICADORES

La presencia de determinados microorganismos en los alimentos se puede aprovechar como un indicador potente sobre algunos aspectos fundamentales relacionados con los mismos. A estos microorganismos se les conoce como microorganismos indicadores y sirven para determinar la calidad microbiológica de los alimentos y para evaluar la posible presencia de ciertos patógenos y/o toxinas. (Y.H, Huy,2006).

Los microorganismos indicadores más utilizados son:

- Microorganismos aerobios mesófilos
- Coliformes
- *Escherichia coli*.
- Hongos filamentosos
- Levaduras viables
- Enterobacterias totales. (Caballero Torres, 2008)

En las conservas se exige esterilidad comercial o estabilidad microbiológica, que se define como: «Ausencia de microorganismos patógenos o no patógenos capaces de producir alteraciones en los alimentos en las condiciones normales de almacenamiento».

El análisis realizado se basa en mantener una muestra a temperatura ambiente como testigo, e incubar otras muestras del mismo lote a distintas combinaciones de temperatura y tiempo de incubación según la norma que se consulte, para comprobar al final de dichas incubaciones que las muestras incubadas no se han alterado (ausencia de abombamiento del envase y de alteración del alimento así como un límite de variación de pH y vacío en relación a la muestra testigo). (Frances, Pouch Downes, 2001)

De acuerdo con el Reglamento Técnico Centroamericano para los vegetales y frutas en conserva se deben realizar los siguientes análisis microbiológicos para registro sanitario y para vigilancia.

Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
Recuento de aerobios mesófilos (previa incubación a 35°C por 10 días)	4	B	< 10 UFC/ml

K. PRINCIPALES MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

Son cuatro los métodos básicos utilizados para el recuento de microorganismos en alimentos:

- Recuento en placa (SPC) para la determinación del número de células viables.
- Método del número más probable (NMP) de gérmenes como cálculo estadístico del número de células viables.
- Técnicas de reducción de colorantes para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora..
- Recuento microscópico directo (DMC) tanto para células viables como para las no viables

El recuento en placa es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias en un alimento. (Allaert Carrie, 2002)

Sin embargo, realizar un análisis microbiológico con las metodologías tradicionales de recuento en placa consume gran cantidad de tiempo y trabajo, y en la industria de alimentos es necesario tomar decisiones de forma rápida lo cual no siempre es posible debido a:

- Se debe esperar a que los microorganismos crezcan en los medios de cultivo para poder visualizarlos. (48 horas)
 - Se debe utilizar gran cantidad de material y cristalería
 - En algunas ocasiones es necesario hacer un pre enriquecimiento en medios selectivos, debido a que el microorganismo de interés está presente en cantidades muy pequeñas. (Michanie Silvia, 2005)
- Por esta razón se han desarrollado métodos alternativos y rápidos en el mercado. Dentro de estos métodos podemos mencionar:

- **Membranas re hidratables** (Petrifilm, Sanita Kum, Compact Dry): Con estos kits se ahorra la preparación del material y se pueden utilizar en laboratorios de baja complejidad. Entre las pruebas microbiológicas de

rutina está la determinación de: *Mesófilos aerobios*, *Coliformes* y *hongos y levaduras*. Además con las Placas Petrifilm (MR) podrá realizar también análisis de patógenos como *E. coli* y *S. aureus*.

- **Spiral Plater:** Son membranas rehidratables, pero automáticas. Las placas se siembran en gradiente, no requiere hacer diluciones. Cuenta con lector automático de placas. Existen varias marcas comerciales.
- **Sistema Redigel:** Se produce la gelificación en la placa por la presencia de cloruro de calcio en ésta y la presencia de metoxil en el diluyente.
- **HGMF**(Filtración de Membranas Hidrofóbicas Cuadrículadas): Combina el recuento en placa, la membrana filtrante y la técnica de Número Más Probable. Es método oficial de Canadá.
- **Simplat:** Es un sistema de recuento en placas especiales basados en Número Más Probable y el uso de sustancias cromo y fluorogénicas. (Michanie Silvia, 2005)

L. ESPECIFICACIONES, EQUIPO E INSTRUMENTAL BÁSICO EN LA IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO MICROBIOLÓGICO

Un laboratorio de análisis microbiológico debe contar con las instalaciones adecuadas para el óptimo desempeño del trabajo a realizar.

En el caso de nuevos instrumentos y nuevos equipos, estos deben ser instalados y/o calibrados por el distribuidor y se debe dejar por escrito un informe de la visita el cual pasará a formar parte del expediente.

Para poder obtener un Laboratorio de Análisis Microbiológico con estas características, debemos considerar los siguientes aspectos: (Wealthorwax, 1986)

1. Instalaciones: Las Instalaciones deben contar con las siguientes características:

- a. Área para la preparación y distribución de los medios de cultivo.
- b. Paredes, pisos y techos lisos y de fácil limpieza.
- c. Las uniones pared-pared, pared-piso y pared-techo deben tener terminaciones sanitarias de acuerdo con las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio.
- d. Área para las incubadoras.
- e. Área aséptica para la realización del Ensayo de esterilidad.
- f. Área para Instrumental: Área específica centralizada, destinada para colocar y emplear instrumentos analíticos especializados, con temperatura y humedad relativa controlada.
- g. Área de lavado, preparación y esterilización: Deben tenerse todas las condiciones necesarias para poder realizar las actividades de lavado, preparación y esterilización de materiales.
- h. Área de Control y Archivo de la Documentación: Se realizará el procesamiento y archivo de la documentación (POES, manuales, instructivos, registros y otros).

- i. Depósitos: Se deben almacenar los reactivos, medios de cultivo y otros materiales en locales que estén separados, teniendo especial cuidado con los líquidos y sólidos inflamables, tóxicos y radioactivos. Se debe controlar la temperatura y la humedad relativa en las áreas requeridas.
- j. Áreas específicas para desechos de residuos contaminantes químicos y biológicos:
 1. Desechos químicos: Se debe contar con un lugar específico, aislado de las áreas de trabajo con contenedores de acuerdo al tipo de solventes a desechar (corrosivos, volátiles, radioactivos, mezclas, etc.) o en base a sus propiedades físico-químicas.
 2. Desechos biológicos: Se debe contar con contenedores especiales para este tipo de desechos. (Wealtherwax,1986)

2. Equipos e instrumentos

a. Equipo e instrumental de laboratorio

- 1) Incubadora
- 2) Pipetas electrónicas
- 3) Balanza
- 4) Autoclave
- 5) Mechero
- 6) Lupa con luz
- 7) Equipo de refrigeración
- 8) Equipo para mezclar
- 9) Asa de Drigalski estéril.
- 10) Cuenta colonias

b. Consumibles

- 1) Placas para análisis microbiológico
- 2) Hisopos estériles listos para usarse
- 3) Papel indicador pH
- 4) Bolsas estériles
- 5) Solución diluyente

(Wealtherwax,1986)

c. Equipo e Instrumental para muestreo

- 1) Envases para la toma de muestras: Envases de vidrio de boca ancha, envases de plástico esterilizable, bolsas de plástico esterilizadas, envases metálicos.

- 2) Instrumentos para la apertura de envases: Tijeras, pinzas, cuchillos, taladros.
- 3) Etiquetas y material para marcar: Etiquetas adhesivas, lápiz grueso, rotuladores, bolígrafos.
- 4) Equipo de esterilización: En el trabajo de campo se puede utilizar un mechero de alcohol.
- 5) Termómetro: (Wealtherwax,1986)

IV. DELIMITACIÓN E IMPACTO DEL TEMA

Este Trabajo de Graduación pretende exponer la Implementación de un Laboratorio de Microbiología dentro de una planta de conservas de alimentos, como una ventaja representativa para la realización de análisis rutinarios. Las ventajas serán enfocadas desde el punto de vista de costo – beneficio; es decir, la comparación de realizar los análisis por la empresa o subcontratar el servicio.

La investigación dará a conocer los principales microorganismos causantes de alteraciones en los alimentos enlatados ácidos o acidificados, específicamente para frutas (piña) y vegetales en conservas (palmito). Otros productos enlatados como carnes, leches y otras hortalizas quedan excluidos del presente estudio.

En este documento conoceremos y compararemos los métodos de análisis más comunes e identificaremos, en términos de resultado y costo, las técnicas más rentables para la detección de dichos microorganismos.

Se realizará una comparación entre el método tradicional de placa con medio de cultivo a rehidratar y dos métodos rápidos: placas Petrifilm y método Simplate.

Por la importancia que tiene la liberación de lotes para la comercialización del producto se hará la comparación de los dos métodos rápidos. Específicamente para validar su eficacia y poder hacer una comparación en el costo y en las ventajas de cada método.

El estudio revelará la estructura y organización de un Laboratorio básico de Microbiología para este propósito específico; así como el personal necesario para el trabajo y el perfil del mismo. Se planteará la distribución y características requeridas, equipo y material indispensable para su buen funcionamiento.

Este trabajo se fundamenta en la necesidad e importancia del control microbiológico, necesarios para el óptimo desarrollo de productos inocuos dentro de cualquier planta dedicada a la elaboración de productos alimenticios.

V. METODOLOGÍA DE LOS EXPERIMENTOS

En este estudio se realizará recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales y E-coli.

El recuento de aerobios mesófilos es el solicitado por el reglamento técnico Centroamericano para vegetales y frutas en conserva. Coliformes totales y E. coli se analizan porque están reconocidos por la FAO como indicadores de la calidad sanitaria de un alimento, de las condiciones adecuadas de manipulación y las condiciones higiénicas de la materia prima.

El recuento de estos microorganismos se realizará basado estrictamente en el Método de Esterilidad Comercial.

El diseño del laboratorio es el mismo independientemente del método que se utilice para la determinación de contaminación microbiana. El costo de la inversión en mobiliario es de Q.30, 000.

El análisis se hará por separado y para cada uno se describirá adelante el equipo, reactivos y perfil del personal responsable; así también se determinará la inversión necesaria para cada metodología.

Los métodos a utilizar y comparar en este trabajo son:

1. Recuento en placa
2. Recuento con placas Petrifilm
3. Recuento con sistema Simplate

A. DISEÑO 1 Recuento en placa:

1. Equipo e Instrumental de Laboratorio

- a. Incubadora
- b. Pipetas
- c. Balanza
- d. Cuenta Colonias
- e. Refrigerador
- f. Estufa con agitador
- g. Esterilizador de cristalería
- h. Esterilizador medios de cultivo
- i. Asa de Drigalski estéril
- j. Cristalería (Erlenmeyers, Pipetas y Tubos de ensayo)
- k. Licuadora

2. Consumibles

- l. Placas Petri
- m. Agar plate Count (recuento total) y Agar Chromocult (coliformes y E coli)
- n. Solución diluyente (Agua peptonada)

3. Procedimiento

- a. Preparar agua peptonada en tubos de ensayo. Esterilizarlos.

Preparación de Agar para recuento total:

- b. Pesar la cantidad necesaria de agar Plate Count, tomando en cuenta el número de muestras a analizar. Se debe agregar agua estéril.
- c. Llevar a ebullición con agitación lenta.
- d. Esterilizar el agar en autoclave.
- e. Colocar el agar en las cajas Petri (15mL/placa)
- f. Preparar muestra colocando en licuadora previamente esterilizada la totalidad del contenido del envase.
- g. Pesar 10 +/-1 gramo de la mezcla y diluir en 90 ml de solución diluyente. Esta es la dilución 10^{-1} .
- h. Agitar hasta homogenizar.
- i. Tomar 1ml de la dilución y colocarlo en un tubo que contenga 9ml de solución diluyente. Esta es la dilución 10^{-2} .
- j. Colocar 0.1ml de la muestra de la segunda dilución utilizando pipeta en el centro de la caja Petri.
- k. Agitar con varilla de vidrio para evitar el crecimiento en la orilla de la caja.
- l. Incubar 48 horas +/-3 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- m. Leer en cuenta colonias.
- n. Presentar resultados en UFC/g. El valor del paso anterior se multiplica por la inversa del factor de dilución.

Preparación de Agar para Coliformes y E Coli:

- a. Pesar la cantidad necesaria de agar Chromocult para Coliformes, tomando en cuenta el número de muestras a analizar. Se debe agregar agua estéril.
- b. Llevar a ebullición con agitación lenta.
- c. Colocar el agar en las cajas Petri (15mL/placa)
- d. Preparar muestra colocando en licuadora previamente esterilizada la totalidad del contenido del envase.
- e. Pesar 10 +/-1 gramo de la mezcla y diluir en 90 ml de solución diluyente. Esta es la dilución 10^{-1} .
- f. Agitar hasta homogenizar.
- g. Tomar 1ml de la dilución y colocarlo en un tubo que contenga 9ml de solución diluyente. Esta es la dilución 10^{-2} .
- h. Colocar 0.1ml de la muestra de la segunda dilución utilizando pipeta en el centro de la caja Petri.
- i. Incubar 24 horas.
- j. Leer en cuenta colonias, tomar en cuenta que un cambio de color de amarillo a azul-verdoso indica la presencia de bacterias coliformes. Para la confirmación de la identificación de E. coli se

cubren las colonias coloreadas de violeta azul oscuro con una gota del reactivo de Indol. Una coloración rojo cereza del reactivo al cabo de aproximadamente 1 minuto indica la formación positiva de Indol

k. Presentar resultados como presencia o ausencia.

4.Inversión

Tabla IV. **Inversión equipo e instrumental de Laboratorio para el método de recuento en placa.**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO
Incubadora Lab Line Imperial III	1	Q19,915.90
Refrigerador de Laboratorio 5.5´	1	Q 3,160.00
Cuenta Colonias W50971	1	Q 8,041.42
Tubos de Ensayo 13X100 mm	1000	Q 279.58
Pipetas 10ml	10	Q 55.23
Steam Sterilizer	1	Q 9,890.40
Agitador Mag	1	Q 1,730.10
Mechero Portátil de propano	1	Q 474.00
Purificador de Aire	1	Q20,697.61
L-C Oven Lab Line	1	Q 6,912.50
Erlenmeyers 250ml	10	Q 203.82
Licuada de cristal 1Lt	1	Q 675.00
pH metro Digital	1	Q 395.00
Total de inversión		Q72,430.56

Tabla V. **Inversión Material consumible para 500 pruebas con el método de recuento en placa.**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO
Agua Peptonada 500 gr.	1	Q1,010.30
Agar Plate count 100gr	1	Q 150.53
Agar Chromocult para Coliformes 100 gr.	1	Q 630.09
Total de inversión		Q1790.92

5. Resultados Diseño 1

Tabla VI. **Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Palmito en Salmuera muestras incubadas**

INCUBADOS				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	Negativo	4,05	-15
Palmito 15 onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	Negativo	4,14	-18
Palmito 29 onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	Negativo	4,34	-15
Palmito 29 onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	Negativo	4,31	-12

Tabla VII. **Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Palmito en Salmuera no incubadas**

NO INCUBADOS				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	Negativo	4,16	-14
Palmito 15 onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	Negativo	4,12	-20
Palmito 29 onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	Negativo	4,21	-17
Palmito 29 onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	Negativo	4,33	-11

Tabla VIII. **Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Piña en almíbar muestras incubadas**

INCUBADOS				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,56	-8
Piña 29 onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,71	-6
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,64	-5
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,85	-3
Piña 29 onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,74	-6
Piña 29 onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,60	-7
Piña 29 onz 21/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,54	-3
Piña 29 onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,58	-4
Piña 29 onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,70	-4
Piña 29 onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,54	-6
Piña 29 onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,75	-6
Piña 29 onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,55	-5
Piña 29 onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,45	-3
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	Negativo	3,52	-3

MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	Negativo	3,64	-3
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,73	-3
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,57	-2

Tabla IX. Resultados método de Recuento en Placa. Producto: Piña en almíbar muestras no incubadas

NO INCUBADOS				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,50	-8
Piña 29 onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,70	-8
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,81	-6
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,11	-2
Piña 29 onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,71	-6
Piña 29 onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,53	-8
Piña 29 onz 21/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,45	-6
Piña 29 onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,58	-4
Piña 29 onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,55	-6
Piña 29 onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,52	-9
Piña 29 onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,81	-8
Piña 29 onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,48	-7
Piña 29 onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,49	-6
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	Negativo	3,51	-4
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	Negativo	3,51	-3
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,65	-9
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,59	-4

B. DISEÑO 2 Recuento con Placas PETRIFILM:

1. Equipo e instrumental de Laboratorio

- a. Incubadora
- b. Refrigerador
- c. Cuenta Colonias
- d. Licuadora de cristal
- e. Cristalería (Tubos de ensayo y Pipetas)

2. Consumibles

- f. Placas Petrifilm Aerobic Count (recuento total) y Placas Petrifilm coliformes y E. coli
- g. pH metro digital
- h. Solución diluyente (Agua Peptonada)

3. Procedimiento

- i. Preparar muestra colocando en licuadora previamente esterilizada la totalidad del contenido del envase.
- j. Pesar 10 +/-1 gramo de la mezcla y diluir en 90 ml de solución diluyente. Esta es la dilución 10^{-1} .
- k. Agitar hasta homogenizar.
- l. Tomar 1ml de la dilución y colocarlo en un tubo que contenga 9ml de solución diluyente. Esta es la dilución 10^{-2} .
- m. En una superficie plana, levante la película superior de la Placa Petrifilm.
- n. Colocar 1ml de la segunda dilución en el centro de la Placa Petrifilm
- o. Bajar con cuidado la película para evitar burbujas de aire.
- p. Presione suavemente el dispersor sobre el inoculo para distribuir sobre toda el área.
- q. Esperar 1 minuto hasta que se solidifique el gel.
- r. Incubar por 24hrs a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para Coliformes.
- s. Incubar por 48hrs a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para E-Coli.
- t. Incubar por 48 hrs a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para recuento total
- u. Contar las colonias utilizando Cuenta Colonias.
- v. Forma de presentar resultado:
 - El área de crecimiento circular del Petrifilm es aproximadamente de 20 cm². Pueden realizarse estimaciones en placas que contengan más de 300 colonias contando el número de colonias en uno o más cuadrados representativos y obteniendo el promedio. Multiplicar dicho número por 20 para obtener el recuento total por placa
 - Altas concentraciones de colonias en las placas ocasionará que toda el área de crecimiento se vuelva roja o rosada.. Cuando esto ocurre, diluir más la muestra para obtener un recuento más preciso.
 - Se informará como UFC/ g.
 - En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica. Por ejemplo: <1UFC/g para dilución 10^{-2} .

4. Inversión

Tabla X. **Inversión equipo e instrumental de Laboratorio para el método recuento con placas Petrifilm**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO
Incubadora Lab Line Imperial III	1	Q19,915.90
Refrigerador de Laboratorio 5.5´	1	Q 3,160.00
Cuenta Colonias W50971	1	Q 8,041.42
Tubos de Ensayo 13X100 mm	1000	Q 279.58
Pipetas 10ml	10	Q 55.23
Licuada de cristal 1Lt	1	Q 675.00
Ph metro Digital	1	Q 395.00
Total de inversión		Q 32,522.13

Tabla XI. **Inversión en material Consumible para 500 pruebas con método recuento con placas Petrifilm**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO
Agua Peptonada 500 gr.	1	Q1,010.30
Petrifilm Coliformes E. coli	500	Q5,104.50
Petrifilm Aerobic Count	500	Q2,137.25
Total de inversión		Q8,252.05

5.Resultados Diseño 2

Tabla XII. **Resultados método Petrifilm. Producto: Palmito en salmuera muestras incubadas**

INCUBADOS (Petrifilm)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 Onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	<1UFC/g	4,05	-15
Palmito 15 Onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	<1UFC/g	4,14	-18
Palmito 29 Onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	<1UFC/g	4,34	-15
Palmito 29 Onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	<1UFC/g	4,31	-12

Tabla XIII. Resultados método Petrifilm. Producto: Palmito en salmuera
muestras no incubadas

NO INCUBADOS (Petrifilm)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 Onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	<1UFC/g	4,16	-14
Palmito 15 Onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	<1UFC/g	4,12	-20
Palmito 29 Onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	<1UFC/g	4,21	-17
Palmito 29 Onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	<1UFC/g	4,33	-11

Tabla XIV. Resultados método Petrifilm. Producto: Piña en almíbar
muestras incubadas.

INCUBADOS (Petrifilm)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 Onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,56	-8
Piña 29 Onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,71	-6
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,64	-5
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,85	-3
Piña 29 Onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,74	-6
Piña 29 Onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,60	-7
Piña 29 Onz 21/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,54	-3
Piña 29 Onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,58	-4
Piña 29 Onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,70	-4
Piña 29 Onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,54	-6
Piña 29 Onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,75	-6
Piña 29 Onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,55	-5
Piña 29 Onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,45	-3
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	<1UFC/g	3,52	-3
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	<1UFC/g	3,64	-3
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,73	-3
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,57	-2

Tabla XV. Resultados método Petrifilm. Producto: Piña en almíbar
muestras no incubadas.

NO INCUBADOS (Petrifilm)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 Onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,50	-8
Piña 29 Onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,70	-8
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,81	-6
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,11	-2

MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 Onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,71	-6
Piña 29 Onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,53	-8
Piña 29 Onz 21/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,45	-6
Piña 29 Onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,58	-4
Piña 29 Onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,55	-6
Piña 29 Onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,52	-9
Piña 29 Onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,81	-8
Piña 29 Onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,48	-7
Piña 29 Onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,49	-6
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	<1UFC/g	3,51	-4
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	<1UFC/g	3,51	-3
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,65	-9
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,59	-4

C.DISEÑO 3 Recuento con Sistema Simplate:

1. Equipo e instrumental de Laboratorio

- a. Incubadora
- b. Refrigerador
- c. Balanza digital
- d. Lámpara UV
- e. Licuadora de cristal
- f. Cristalería (Tubos de ensayo y Pipetas)

2. Consumibles

- g. Placas Simplate
- h. Preparado Simplate para Recuento Total (Este determina mesófilos aerobios)
- i. Preparado Simplate para Coliformes, E-coli
- j. Solución diluyente (Agua Peptonada)

3. Procedimiento

Preparación de la muestra:

- k. Preparar muestra colocando en licuadora previamente esterilizada la totalidad del contenido del envase.
- l. Pesar 50 gramos de la mezcla en 450 ml de agua desionizada.

Preparación del Simplate:

- m. Hidratar el medio de cultivo con 9.0ml de diluyente estéril (agua peptonada al 0.1%)
- n. Transferir 1 ml de la muestra homogenizada al frasco que contiene el medio. El volumen final dentro del frasco debe ser de 10ml +/-0.2ml.
- o. Agitar para disolver el medio totalmente.
- p. Retirar la tapa de la placa Simplate y vaciar la solución medio/muestra en el centro de la placa.
- q. Cerrar la placa.
- r. Sobre la superficie plana agitar suavemente en círculos, con el fin de distribuir la mezcla del medio y la muestra en todos los pocillos.
- s. Verificar que no existan burbujas de aire atrapadas en los pocillos.
- t. Inclinar el plato hacia cualquiera de los lados para que la esponja absorba el exceso de medio.
- u. Incubar de 24 a 48 Hrs. a 35°C ± 1°C

Lectura e Interpretación de resultados:

- v. Después de Incubar, observe el cambio de color del líquido en los pocillos.
- w. Cuente el número de pocillos que tengan un cambio de color con respecto al color base. El cambio de color producido por microorganismos en rosa para recuento total. El cambio de color producido por Coliformes Totales de naranja a rojo oscuro.
- x. Colocar el plato bajo luz UV y hacer el recuento de los pocillos que presente fluorescencia azul (E-coli).
- y. Para determinar la concentración por plato:
 - Cuente el número de pocillos positivos en el plato
 - Utilice la tabla Simplate (anexo) para determinar el número de microorganismos por plato.
 - Si el tamaño de la muestra es de 0.1ml multiplique el número anterior por 10.
- z. Para calcular el número de microorganismos por muestra:
 - Multiplicar el resultado del inciso anterior por el factor de dilución
- aa. Si no hay pocillos positivos, pero la esponja tiene cambio de color la concentración por plato es 1.
- bb. Si no hay pocillos positivos y la esponja no tiene cambio de color la concentración es <1UFC/g.

4. Inversión

Tabla XVI. Inversión equipo e instrumental de Laboratorio método con sistema Simplate.

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO
Incubadora Lab Line Imperial III	1	Q19,915.90
Refrigerador de Laboratorio 5.5'	1	Q 3,160.00

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO
Balanza Digital	1	Q 2,841.42
Tubos de Ensayo 13X100 mm	1000	Q 279.58
Pipetas 10ml	10	Q 55.23
Lámpara Luz UV	1	Q 430.10
Licuada de cristal 1Lt	1	Q 675.00
Total de inversión		Q27,357.23

Tabla XVII. **Inversión material consumible para 500 pruebas método con sistema Simplate**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO
Agua Peptonada 500 gr.	1	Q 1,010.30
Placas Simplate	500	Q 3,012.01
Preparados Simplate Coliformes E. coli	500	Q 5,917.50
Preparados Simplate recuento total	500	Q 3,013.98
Total de inversión		Q12,953.79

5. Resultados Diseño 3

Tabla XVIII. **Resultados método de Recuento en sistema Simplate. Producto: Palmito en salmuera muestras incubadas**

INCUBADOS (Simplite)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 Onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	<1UFC/g	4,05	-15
Palmito 15 Onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	<1UFC/g	4,14	-18
Palmito 29 Onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	<1UFC/g	4,34	-15
Palmito 29 Onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	<1UFC/g	4,31	-12

Tabla XIX. **Resultados método de Recuento en sistema Simplate. Producto: Palmito en salmuera muestras no incubadas**

NO INCUBADOS (Simplite)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 Onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	<1UFC/g	4,16	-14
Palmito 15 Onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	<1UFC/g	4,12	-20
Palmito 29 Onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	<1UFC/g	4,21	-17
Palmito 29 Onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	<1UFC/g	4,33	-11

Tabla XX. Resultados método de Recuento en sistema Simplate.

Producto: Piña en almíbar muestra incubada

INCUBADOS (Simplite)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 Onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,56	-8
Piña 29 Onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,71	-6
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,64	-5
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,85	-3
Piña 29 Onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,74	-6
Piña 29 Onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,60	-7
Piña 29 Onz 21/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,54	-3
Piña 29 Onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,58	-4
Piña 29 Onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,70	-4
Piña 29 Onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,54	-6
Piña 29 Onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,75	-6
Piña 29 Onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,55	-5
Piña 29 Onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,45	-3
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	<1UFC/g	3,52	-3
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	<1UFC/g	3,64	-3
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,73	-3
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,57	-2

Tabla XXI. Resultados método de Recuento en sistema Simplate.

Producto: Piña en almíbar muestras no incubadas

NO INCUBADOS (Simplite)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 Onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,50	-8
Piña 29 Onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,70	-8
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,81	-6
Piña 29 Onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,11	-2
Piña 29 Onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,71	-6
Piña 29 Onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,53	-8
Piña 29 Onz 21/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,45	-6
Piña 29 Onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,58	-4
Piña 29 Onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,55	-6
Piña 29 Onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,52	-9
Piña 29 Onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,81	-8
Piña 29 Onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,48	-7
Piña 29 Onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	<1UFC/g	3,49	-6
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	<1UFC/g	3,51	-4
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	<1UFC/g	3,51	-3
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,65	-9
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	<1UFC/g	3,59	-4

VI. RESULTADOS

A. TABLAS COMPARATIVAS DE COSTOS

Tabla XXII. COMPARATIVO DE COSTOS POR PRUEBA PARA DIFERENTES MÉTODOS PARA COLIFORMES

PARA COLIFORMES						
MATERIAL	DURACIÓN	SIMPLATE	PETRIFILM	PLACA TRADICIONAL	CANTIDAD	COSTO UNITARIO
Tubo de ensayo 13 x 100 mm.	6 meses	Q 0.56	Q 0.56	Q 0.28	1 tubos /muestra	Q 0.28
Caja Petri de vidrio.	6 meses			Q 1.20	1 placas /muestra	Q 1.20
Pipetas	6 meses	Q 0.05	Q 0.05	Q 0.05		Q 55.23
Tapón de rosca para tubo.	6 meses			Q 0.04	4tapones/muestra	Q 2.00
Placa Simplate esteril	6 meses	Q 6.02			1 placa / muestra	Q 6.02
Agua peptonada		Q 2.02	Q 2.02	Q 2.02	9ml / muestra	Q 2.02
SUBTOTAL DE CONSUMIBLES		Q 8.65	Q 2.63	Q 3.59		
Depreciacion Refrigerador	60 meses		0.08	0.08	1	Q 3,160.00
Mechero de propano	60 meses			0.01	1	Q 474.00
Purificador de aire	60 meses	0.54	0.54	0.54	1	Q 20,697.61
Agitador magnetico	60 meses			0.04	1	Q 1,730.10
Licuadora	60 meses	0.02	0.02	0.02	1	Q 675.00
L-C Oven Lab Line	60 meses			0.18	1	Q 6,912.50
Ph metro Digital	60 meses		0.01	0.01	1	Q 395.00
Depreciación de Cuenta colonias	60 meses		0.21	0.21	1	Q 8,041.42
Depreciación balanza	60 meses		0.08	0.08	1	Q 3,200.00
Depreciación incubadora	60 meses	0.52	0.52	0.52	1	Q 19,915.90
Depreciación esterilizador	60 meses			0.26	1	Q 9,890.40
SUBTOTAL DE DEPRECIACIÓN		Q 1.08	Q 1.46	Q 1.95		
Medio de Cultivo Agar Chromocult para Coliformes				1.26	Para 1 analisis	Q 630.09
Placa Petrifilm para coliformes y E-coli			10.21		Para 1 analisis	Q 5,104.50
Simplate Coliformes y E coli		6.81			Para 1 analisis	Q 3,403.40
SUBTOTAL MEDIOS DE CULTIVO		Q 6.81	Q 10.21	Q 1.26		
Energía balanza	0,18 Kw / hr			0,00075 (5min)	Por placa = 0,18 Kw/ 60 min. x5 min.	
Energía autoclave	0,30 Kw / hr	0,015/hr		0,0375 (2,5h)	Por placa = 0,30 Kw x 2,5 H / 20	
Energía incubadora	0,57 Kw / hr	0,684 (24)		1,368 (48 h)	Por placa = 0,57 Kw x 48 h / 20 análisis	
Energía esterilizador	3,96 Kw / hr			0,792 (4 h)	Por placa = 3, 96 Kw x 4 h / 20 análisis /	
ENERGÍA ELÉCTRICA (Kw)		0,699 Kw	1,383 Kw	2,20 Kw		
TOTAL x 1.77 + IVA Q/ Kw / hora		Q 1.39	Q 2.74	Q 4.36		
TOTAL GENERAL DE MANO DE OBRA		2.67	13.37	21.39		
Tiempo de manipulación de análisis		5 min.	25 min.	40 min		
Tiempo de resultados		24 hrs	48 hrs	48 hrs		

Salario	Q 3,950.00 + 30% (Prestaciones) = Q 5,135.00
Costo por hora trabajada	Q 5,135.00 / 160h (8h/díax5díasx4semanas/mes = 160 hrs trabajadas.) = Q 32.09 por hora.
Costo de salario por análisis	Placa: 40min. X 32.09/60min. = Q 21.39 Simplat: 5 min. X 32.09/60 min. = Q 2.67 Petrifilm: 25min. X 32.09/60min. = Q 13.37

Tabla XXIII. **COMPARATIVO DE COSTOS POR PRUEBA PARA DIFERENTES MÉTODOS PARA RECuento TOTAL**

TABLA COMPARATIVAS DE COSTOS METODO TRADICIONAL Vs SIST. SIMPLATE Vs PETRIFILM PARA RECuento TOTAL							
MATERIAL	DURACIÓN	SIMPLATE	PETRIFILM	PLACA TRADICIONAL	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	
Tubo de ensayo 13 x 100 mm.	6 meses	Q 0.56	Q 0.56	Q 0.28	2 tubos /muestra	Q	0.28
Caja Petri de vidrio.	6 meses			Q 1.20	2 placas /muestra	Q	1.20
Pipetas	6 meses	Q 0.05	Q 0.05	Q 0.05		Q	55.23
Tapón de rosca para tubo.	6 meses			Q 0.04	4tapones/muestra	Q	2.00
Placa Simplate esteril	6 meses	Q 6.02			1 placa / muestra	Q	6.02
Agua peptonada		Q 2.02	Q 2.02	Q 2.02	9ml / muestra	Q	2.02
SUBTOTAL DE CONSUMIBLES		Q 8.65	Q 2.63	Q 3.59			
Depreciacion Refrigerador	60 meses		0.08	0.08	1	Q	3,160.00
Mechero de propano	60 meses			0.01	1	Q	474.00
Purificador de aire	60 meses	0.54	0.54	0.54	1	Q	20,697.61
Agitador magnetico	60 meses			0.04	1	Q	1,730.10
Licuadaora	60 meses	0.02	0.02	0.02	1	Q	675.00
L-C Oven Lab Line	60 meses			0.18	1	Q	6,912.50
Ph metro Digital	60 meses		0.01	0.01	1	Q	395.00
Depreciación de Cuenta colonias	60 meses		0.21	0.21	1	Q	8,041.42
Depreciación balanza	60 meses		0.08	0.08	1	Q	3,200.00
Depreciación incubadora	60 meses	0.52	0.52	0.52	1	Q	19,915.90
Depreciación esterilizador	60 meses			0.26	1	Q	9,890.40
SUBTOTAL DE DEPRECIACION		Q 1.08	Q 1.46	Q 1.95			
Medio de cultivo Agar Plate Count				0.30	Para 1 analisis	Q	150.40
Placa Petrifilm Recuento Total			4.27		Para 1 analisis	Q	2,137.25
Simplete Recuento Total		6.03			Para 1 analisis	Q	3,013.98
SUBTOTAL MEDIOS DE CULTIVO		Q 6.03	Q 4.27	Q 0.30			
Energía balanza	0,18 Kw / hr			0,00075 (5min)	Por placa = 0,18 Kw/ 60 min. x 5 min.		
Energía autoclave	0,30 Kw / hr	0,015/hr		0,0375 (2,5h)	Por placa = 0,30 Kw x 2,5 H / 20 análisis /		
Energía incubadora	0,57 Kw / hr	0,684 (24 horas)		1,368 (48 h)	Por placa = 0,57 Kw x 48 h / 20 análisis /		
Energía esterilizador	3,96 Kw / hr			0,792 (4 h)	Por placa = 3, 96 Kw x 4 h / 20 análisis /		
ENERGÍA ELÉCTRICA (Kw)		0,699 Kw	1,383 Kw	2,20 Kw			
TOTAL x 1.77 + IVA Q/ Kw / hora		Q 1.39	Q 2.74	Q 4.36			
TOTAL GENERAL DE MANO DE OBRA		2.67	13.37	21.39			
Tiempo de manipulación de análisis		5 min.	25 min.	40 min			
Tiempo de resultados		24 hrs	24-48 hrs	24-48 hrs			

Salario	Q 3,950.00 + 30% (Prestaciones) = Q 5,135.00
Costo por hora trabajada	Q 5,135.00 / 160h (8h/díax5díasx4semanas/mes = 160 hrs trabajadas.) = Q 32.09 por hora.
Costo de salario por análisis	Placa: 40min. X 32.09/60min. = Q 21.39 Simplete: 5 min. X 32.09/60 min. = Q 2.67 Petrifilm: 25min. X 32.09/60min. = Q 13.37

Tabla XXIV. **RESUMEN DE COSTO POR PRUEBA PARA LOS MÉTODOS ANALIZADOS**

COSTO TOTAL POR ANALISIS				
PRUEBA	SIMPLATE	PETRIFILM	TRADICIONAL	SUBCONTRATADA
Recuento Total	Q 19.81	Q 24.48	Q 31.59	Q 55.00
Coliformes / E-coli	Q 20.59	Q 30.41	Q 32.55	Q 55.00

Tabla XXV. **COMPARATIVA DE TÉCNICAS DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS**

TABLA COMPARATIVA DE TÉCNICAS DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS			
Característica	Simplate	Petrifilm	Método tradicional
Interpretación de resultados)	Cambio de color de pocillos del mismo tamaño. Cuento binario (positivo x negativo)	Colonias en forma de puntos en cuadrantes.	Colonias puntiformes y amorfas de acuerdo al microorganismo en cuadrantes. Colonias puntiformes y amorfas de acuerdo al microorganismo en cuadrantes.
Tiempo y temperatura para obtener resultados	Cuenta total 24 horas 35°C+/-2 Coli. total/E.coli 24 horas 35°C+/-2	Cuenta total 48 horas 35°C +/-2 Coli total/E.coli 48 horas 35°C+/- 2	Cuenta total 48 horas 35°C +/-2 Coli total/E.coli 48 horas 35°C+/- 2
Inoculación	inocular 1ml del preparado directo en la charola SimPlate.	Es necesario hacer una dilución adicional para poder inocular	Es necesario hacer una dilución adicional para poder inocular
Conteo	Permite conteo hasta 738 UFC sin dilución. Una charola Simplate sustituye por lo menos dos Petrifilm.	Conteo máximo de 300UFC sin dilución.	Conteo máximo de 300UFC sin dilución.
Interferencias	<ul style="list-style-type: none"> a) Partículas de alimentos NO se confunden con colonia, por lo tanto no interfiere en el resultado. b) Colonias invasoras se aíslan en los pocillos. c) El reactivo Simplate NO es agar por lo tanto las bacterias con enzima gelatinasa no interfieren. d) pH: muestras con pH < 3.5 NO deben ser inoculadas directamente en Simplate, en este caso debe hacerse una dilución 10-1 o neutralizar la muestra como se hace para el método tradicional. e) Presencia de gran cantidad de otras bacterias NO interfiere en los resultados. 	<ul style="list-style-type: none"> a) Partículas de alimentos se pueden confundir con colonias o dificultar la inoculación de la muestra, por esto se tiene que hacer una dilución adicional. b) Colonias invasoras se expanden compitiendo por el mismo alimento con otras colonias. c) Comprobado por varios autores las bacterias productoras de gelatinasa, muy común en gran parte de los alimentos, licúan el agar del Petrifilm, imposibilitando la formación de las colonias. d) pH: muestras con pH bajo no deben ser inoculadas directamente, en este caso debe hacerse una dilución 10-1 o neutralizar la muestra como se hace para el método tradicional. f) Estudio publicado por el fabricante de Petrifilm indica que la presencia de alto recuento de coliformes u otras bacterias pueden hacer el recuento difícil o imposible. 	<ul style="list-style-type: none"> a) Partículas de alimentos se pueden confundir con colonias o dificultar la inoculación de la muestra, por esto se tiene que hacer una dilución adicional. b) Colonias invasoras se expanden compitiendo por el mismo alimento con otras colonias. c) pH: neutralizar la muestra.
Burbujas	Buscar sacarlas pero la presencia de burbujas en algunos pocillos NO generan diferencia significativa en los resultados finales.	Según varios autores hay posibilidad de que puntos o colonias azules sin burbujas de aire no sean E. coli, generando falsos positivos.	No deben formarse burbujas

B. TABLAS DE RESULTADOS EMPRESA SUBCONTRATADA

Tabla XXVI. **Resultados empresa sub contratada. Producto: Palmito en salmuera muestras incubadas**

INCUBADOS (Empresa Subcontratada)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,45	-6
Piña 29 onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,64	-7
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,54	-6
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,68	-5
Piña 29 onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,57	-7
Piña 29 onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,54	-8
Piña 29 onz 21/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,68	-5
Piña 29 onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,85	-4
Piña 29 onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,65	-6
Piña 29 onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,58	-5
Piña 29 onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,75	-4
Piña 29 onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,73	-7
Piña 29 onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,45	-3
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	Negativo	3,45	-2
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	Negativo	3,78	-2
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,67	-2
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,57	-5

Tabla XXVII.

Tabla XXVIII. **Resultados empresa sub contratada. Producto: Palmito en salmuera muestras no incubada**

NO INCUBADOS (Empresa Subcontratada)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 onz 17/12/09 L1,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,45	-7
Piña 29 onz 17/12/09 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,68	-7
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,86	-8
Piña 29 onz 18/12/09 L5,1 To-9	<1UFC/g	Negativo	3,34	-2
Piña 29 onz 19/12/09 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,65	-8
Piña 29 onz 21/12/09 L1,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,46	-6
Piña 29 onz 21/12/09 L2,1	<1UFC/g	Negativo	3,65	-4

R/9				
Piña 29 onz 04/01/10 L2,1 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,34	-7

MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 onz 04/01/10 L4,1 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,56	-8
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Piña 29 onz 04/01/10 L5,2 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,57	t-5
Piña 29 onz 05/01/10 L1,1 R/7	<1UFC/g	Negativo	3,86	-6
Piña 29 onz 05/01/10 L2,2 R/9	<1UFC/g	Negativo	3,55	-5
Piña 29 onz 05/01/10 L4,2 D-9	<1UFC/g	Negativo	3,64	-8
Piña A-10 12/12/09 L6,3 TA	<1UFC/g	Negativo	3,74	-3
Piña A-10 19/12/09 L4,1	<1UFC/g	Negativo	3,65	-2
Piña A-10 04/01/10 L5,2 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,53	-7
Piña A-10 05/01/10 L1,1 TA-7	<1UFC/g	Negativo	3,45	-6

Tabla XXIX.

Tabla XXX. **Resultados empresa sub contratada. Producto: Piña en almíbar muestra incubada**

INCUBADOS (Empresa subcontratada)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	Negativo	4,05	-12
Palmito 15 onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	Negativo	4,18	-16
Palmito 29 onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	Negativo	4,24	-12
Palmito 29 onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	Negativo	4,28	-10

Tabla XXXI. **Resultados empresa sub contratada. Producto: Piña en almíbar muestra no incubada**

NO INCUBADOS (Empresa subcontratada)				
MUESTRA	Recuento total	Coliformes	pH	Presión de la lata (in.Hg)
Palmito 15 onz 18/12/09 L1	<1UFC/g	Negativo	4,12	-13
Palmito 15 onz 05/01/10 L3	<1UFC/g	Negativo	4,14	-18
Palmito 29 onz 18/12/09 L2	<1UFC/g	Negativo	4,18	-19
Palmito 29 onz 05/01/10 L4	<1UFC/g	Negativo	4,36	-13

Método utilizado por empresa sub contratada: Recuento aeróbico en placa (CMF cap 6 met. 6.33 y cap 7. APHA. 4ta ed. .2001.

VII. DISCUSIÓN

De acuerdo al reporte presentado por el laboratorio subcontratado y a los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en este trabajo, podemos observar que para los productos analizados (Piña en almíbar y Palmito en salmuera) todos los métodos son validos y aplicables, ya que, los resultados son similares.

El método de recuento en placa es un método confiable. El procedimiento es económico en términos de materiales consumibles, sin embargo, requiere de personal especializado para la elaboración de los agares y para la determinación y conteo de las colonias, así como también de una inversión elevada de equipo e instrumental.

Un factor importante a tomar en cuenta en el método de recuento en placa es el tiempo requerido a lo largo de todo el proceso, desde la esterilización del material, preparación de los agares, dilución de las muestras, así como la obtención de resultados luego de la incubación.

Es importante reiterar que para la perfecta ejecución de este método, es necesario contar con personal competente que tenga el conocimiento y la experiencia para poder diferenciar las colonias y cuantificarlas adecuadamente para minimizar los errores debido a la presencia de interferencias provenientes de la muestras.

Con el método Petrifilm se ahorra tiempo de preparación de agares y no se requiere de tiempo para la esterilización de cristalería. Sin embargo, se requiere cuidado al momento de trabajar las muestras a la hora del cerrado de placas y se requiere cuidado con el almacenaje de los Petrifilm. (Se deben mantener en refrigeración las placas a una temperatura estable para evitar el deterioro y caducidad).

Con Petrifilm se determina que el conteo de colonias requiere de personal calificado dada la complejidad que representa la identificación de colonias debido a su tamaño.

El método Simplate a diferencia del otro método rápido (Petrifilm), puede cuantificar los microorganismos con mayor precisión ya que tiene sensibilidad desde 1 UFC y comparado con el método tradicional (recuento en placa) el conteo de colonias es rápido y sencillo por ser este un método colorimétrico.

El método Simplate es el método más rápido en términos de preparación y obtención de resultados, requiere el menor tiempo de incubación (24 hrs.) en comparación con los métodos analizados, así como el no requerir de la preparación de medio de cultivo.

De la misma forma, se pudo notar que el método Simplate resultó ser muy práctico pues a diferencia de los dos métodos anteriores se pueden almacenar a temperatura ambiente y se puede desechar por cualquier método convencional.

Es importante resaltar que a diferencia de los métodos anteriores, el sistema Simplate no requiere de personal calificado; debido a la simplicidad de su manejo prácticamente puede ser usado por cualquier persona. (Por ser un método colorimétrico, que las celdas son individuales y a que no le afectan las interferencias). El método Simplate no requiere de hacer diluciones debido a que puede identificar hasta 738 UFC.

La utilización de métodos rápidos además de mostrar un ahorro significativo en el tiempo de preparación y obtención de resultados, también muestra ventajas al momento de implementar un laboratorio, pues existe una diferencia considerable en la inversión inicial dependiendo del método que se desee utilizar. La inversión inicial oscila de los Q27,357.23 para el método Simplate a Q72,430.56 con el método tradicional en Cajas Petri. Esto se debe principalmente a la cantidad de equipo e instrumental requerido por el método tradicional.

Sin embargo, debemos mencionar que el uso del método tradicional representa la menor inversión de materiales consumibles (Q3,371.18) a diferencia de los métodos Petrifilm (Q8,252.05) y Simplate (Q12,953.79) tomando como base 500 pruebas

Se debe tomar en cuenta que el método de recuento en placa tradicional y el método de recuento con placas Petrifilm representan la mayor inversión en mano de obra, pues a diferencia del método Simplate, éstos necesitan ser manipulados por personal calificado, lo que eleva los costos por prueba individual.

Se debe tomar en cuenta que al momento de involucrar todos los factores requeridos para la realización de los análisis como: materiales consumibles, instrumental, depreciación de equipo, consumo de energía eléctrica, medios de cultivo y mano de obra, el método de análisis con el sistema Simplate resulta ser el más económico tomando como base 500 pruebas individuales.

Los análisis realizados por la empresa subcontratada son confiables y seguros, sin embargo el costo por análisis es elevado. Adicionalmente tiene el inconveniente de no poder disponer de los resultados de forma inmediata por lo que hace el procedimiento de toma de decisión lento. Lo antes mencionado deja a esta opción en desventaja con los métodos anteriores y presentan un punto a considerar en las recomendaciones de este trabajo.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Independientemente del método que se seleccione (recuento en placa, Petrifilm o sistema Simplate) resulta ser más económico el realizar los análisis microbiológicos en un laboratorio propio que subcontratar el servicio.
2. Todos los métodos utilizados presentaron resultados similares por lo que quedan validados, además todos los métodos evaluados están aprobados por AOAC.
3. El método de recuento en placa Tradicional representa la mayor inversión para su implementación, sin embargo, es el método más económico en el rubro de materiales consumibles.
4. El recuento en placas con Sistema Simplate fue el método más práctico y sencillo de utilizar.
5. Los métodos de recuento en placa Tradicional y recuento en placas Petrifilm necesitan de personal calificado para su realización. En el caso de recuento en placa se requiere de conocimiento para la preparación de agar y en ambos se requiere de personal especializado para la interpretación y cálculo del número de colonias.
6. Debido a la facilidad de preparación de la muestra, a que los agares son líquidos, a que no requiere personal especializado, y a la rapidez en la obtención de resultados, se recomienda el uso del Sistema Simplate para la realización de estos análisis.
7. El método Simplate es el más económico para la realización de análisis de Coliformes y E-coli, con un costo final por prueba de Q 20.59.
8. El método Simplate es el más económico para la realización de análisis de Recuento total, con un costo final por prueba de Q 19.81.
9. Por todo lo mencionado anteriormente, este trabajo recomienda la implementación de un laboratorio de microbiología en todas aquellas empresas que requieran realizar múltiples análisis rutinarios de identificación de microorganismos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Allaert Vandevenne, C Escolá Ribes, M. 2002. *Métodos de análisis microbiológicos de alimentos*. Ed. Díaz Santos, S.A. España.
2. Caballero, Torres. 2008. *Temas de Higiene de los Alimentos*. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, Cuba.
3. Downing, Donald. 1996. *A Complete Course in Canning*. Book 2. CTI publication, New York. 13 ed. pp 11-38.
4. Frances, Pouch Downes. American Public Health Association. 2001. 4th Edition. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA. USA.
5. Frazier, W. L. 2003. *Microbiología de los alimentos*. 4ª ed Ed. Acribia. Zaragoza, España
6. Fung, D. 1995. *Microbiological control for foods and agricultural products*. Ed. VCH, Inglaterra
7. Fusté, O.V. 2000. *Cuidado y manejo de los alimentos*. Washington State University, Washington. pp: 1-14.
8. Gamazo, Carlos. López-Goñi, Ignacio. Díaz, Ramón. 2005. 3ª Edición. *Manual práctico de Microbiología*. Ed. Masson S.A. Barcelona
9. Jay, J.M. Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. 7th edition. *Modern food microbiology*. Springer-Verlag. Food Science Tex Series. USA.
10. Lund, Barbara, M.; Baird-Parker, Tony C.; Gould, Grahame W. 2000. *Microbiological safety and quality of food*, Volumes 1-2 Springer Verlag. <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=946>. (Libro electrónico).
11. Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parkder J. 2002. Brock *Biology of Microorganisms*. 10th ed. Prentice Hall California, USA. pp.: 695-964
12. Michanie, Silvia. 2005. *Métodos Alternativos, Precisos y Rápidos para el control microbiológico de alimentos*. Énfasis Alimentación, año XI No.1:64.71 (febrero-marzo)
13. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 2000. 126.a Sesión del Comité Ejecutivo. Washington, D.C. EUA. pp.:3-16.

14. Pascual Anderson, M.R. 1992. *"Microbiología alimentaria"*. Ed. Díaz de Santos. Madrid.
15. Ramírez-Gama, R., Luna-Millán, B.; Mejía-Chávez, A.; Velázquez-Madrado, O.; Tzuzuki-Reyes, G.; Vierna-García, L.; Hernández-Gómez, L.; Müggelburg, I. 1996. *Manual de prácticas de microbiología general*. Facultad de Química. UNAM. México
16. Robinson R. K. *Encyclopedia of food microbiology*. Ed. Elsevier Ltd. <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780122270703> (Libro electrónico).
17. Rosenberg, E. 1999. Microbial ecology and infectious disease. American Society for Microbiology. Rendón, V.A. U.S.A. pp15:20-35
18. Sanz Pérez Bernabé (traductor). 2001. *Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios*. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies (ICMSF). Ed. Acibia, Zaragoza, España.
19. Serra Luis. 2006. *Nutrición y Salud Pública: Métodos, bases científicas y aplicaciones*. 2da ed. Elsevier.
20. Trujillo-Arriaga, F. J. 2005 *Inocuidad Alimentaria: Pasado, Presente y Futuro*. Cuautitlan2.unam.mx/30inocuidad-aliment.htm
21. Yousef, Ahmed Elmeleigy, Carlstrom, Carolyn (cop. 2003). *Food microbiology: a laboratory manual*. Hoboken: John Wiley & Sons.

X. ANEXOS

DISEÑO DE LABORATORIO

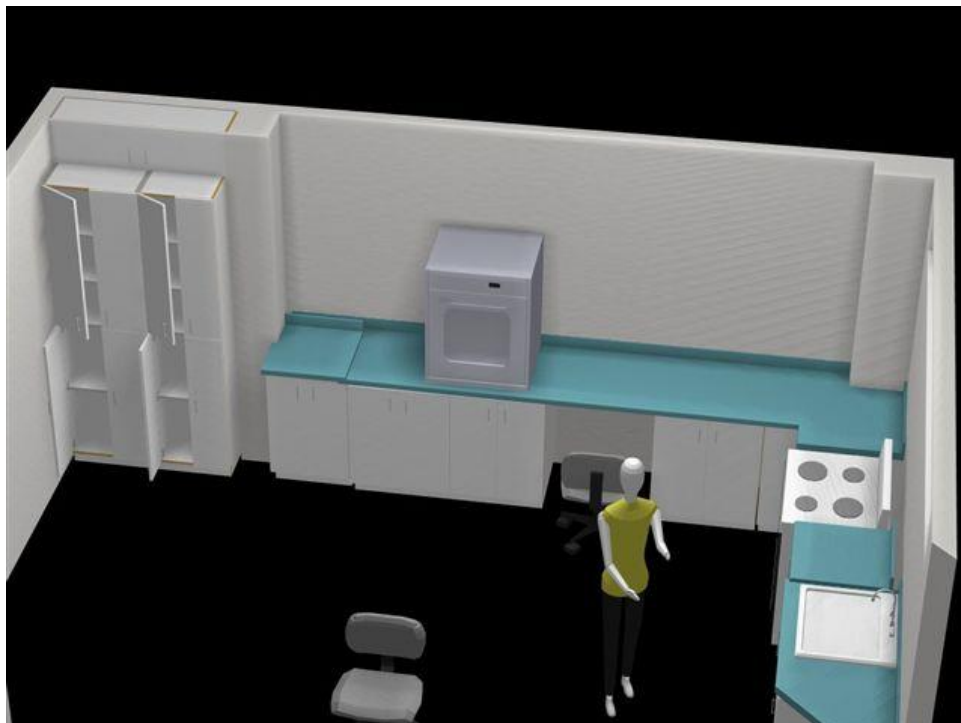


Tabla 30. TABLA DE CONVERSIÓN SIMPLATE

1 = 2	29 = 70	57 = 190
2 = 4	30 = 74	58 = 196
3 = 6	31 = 76	59 = 202
4 = 8	32 = 80	60 = 208
5 = 10	33 = 84	61 = 216
6 = 12	34 = 86	62 = 224
7 = 14	35 = 90	63 = 232
8 = 16	36 = 94	64 = 240
9 = 18	37 = 96	65 = 248
10 = 22	38 = 100	66 = 256
11 = 24	39 = 104	67 = 266
12 = 26	40 = 108	68 = 276
13 = 28	41 = 112	69 = 288
14 = 30	42 = 116	70 = 298
15 = 32	43 = 120	71 = 312
16 = 36	44 = 124	72 = 324
17 = 38	45 = 128	73 = 338
18 = 40	46 = 132	74 = 354
19 = 42	47 = 136	75 = 372
20 = 46	48 = 142	76 = 392
21 = 48	49 = 146	77 = 414
22 = 50	50 = 150	78 = 440
23 = 54	51 = 156	79 = 470
24 = 56	52 = 160	80 = 508
25 = 58	53 = 166	81 = 556
26 = 62	54 = 172	82 = 624
27 = 64	55 = 178	83 = 738
28 = 68	56 = 184	84 = >738

NÚMERO DE POCILLOS POSITIVOS = POBLACION POR PLATO