



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN CONSERVACIÓN DE
DISTINTOS VEGETALES EN REFRIGERADORES DE TIPO A Y TIPO B ”**

Tesis previa a la obtención del
Título de Bioquímico Farmacéutico

AUTORES:

KATHERINE JANNETH MEJÍA MUÑOZ

JENNY FERNANDA ORELLANA GONZÁLEZ

DIRECTORA:

DRA. SILVANA PATRICIA DONOSO MOSCOSO

CUENCA – ECUADOR

2014



RESUMEN

En el presente estudio se analizó una comparación del crecimiento microbiano en la conservación de distintos vegetales almacenados en las refrigeradoras tipo A y tipo B.

Se consideraron tres vegetales diferentes: cebolla blanca, espinaca y lechuga, los cuales se obtuvieron en el Mercado “10 de Agosto”. Para el recuento de microorganismos indicadores de calidad aerobios mesófilos, mohos y levaduras, las muestras fueron sometidas a refrigeración en el sistema tipo A y tipo B. Posteriormente se hizo un recuento inicial a tiempo cero al momento de adquirir los alimentos, a los 7 días después de permanecer en refrigeración en cada uno de los sistemas y luego a los 15 días en las mismas condiciones de refrigeración.

Los resultados de los recuentos se analizaron estadísticamente mediante la prueba “T student” demostrándose que en el recuento de aerobios mesófilos se observó una diferencia significativa entre los dos sistemas, mientras que en el recuento de mohos y levaduras no existió diferencia significativa, lo que indica que el sistema A de refrigeración podría ser mejor en la conservación de vegetales en cuanto a aerobios mesófilos se refiere.

Palabras claves: Refrigeración, conservación, aerobios mesófilos y mohos – levaduras.



ABSTRACT

In the present study we analyzed a comparison between the microbial growth in the conservation of different vegetables that they were stored in the refrigerator type A and type B.

We considered three different vegetables: “white onion”, spinach and lettuce. They were obtained in the Market “10 de Agosto”. For counting of indicator microorganisms such aerobic mesophilic, molds and yeasts, the vegetables were refrigerated in the type A and type B system. Later, we did an initial recount at time zero in the moment we got the vegetables, seven days after of staying in refrigeration in the both systems, and also 15 days after in the same conditions.

The results of the recounts were analyzed statistically with the test “T student”. We demonstrated that the aerobic mesophilic recount had significant difference between the two systems, meanwhile, in the molds and yeasts recount did not have significant difference. They showed that the refrigerator type A could be better in the conservation of vegetables.

Key words: Cooling, conservation, aerobic mesophilic and molds - yeasts.



CONTENIDO

	pág.
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 REFRIGERACIÓN.....	15
1.1.1 ASPECTOS GENERALES.	15
1.1.2 CONSERVACIÓN EN ESTADO REFRIGERADO DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL.....	16
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS DE REFRIGERACIÓN BIOACTIVO Y NO-FROST.....	17
1.2.1 SISTEMA DE REFRIGERACIÓN BIOACTIVO.....	17
1.2.2 SISTEMA DE REFRIGERACIÓN NO-FROST.....	18
1.3 INFLUENCIA DE LAS BAJAS TEMPERATURAS EN LA FISIOLOGÍA DE LOS VEGETALES.....	18
1.3.1 TRANSPIRACIÓN.	18
1.3.2 RESPIRACIÓN.	19
1.3.3 MADURACIÓN.	20



1.4 FACTORES DEL ALIMENTO CAPACES DE MODIFICAR SU CONSERVACIÓN.....	20
1.4.1 POTENCIAL DE HIDRÓGENO.....	20
1.4.2 ACTIVIDAD DEL AGUA (AW).....	21
1.4.3 TEMPERATURA.	22
1.4.4 OXÍGENO.	23
1.5 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE DETERIORO EN VEGETALES.....	23
1.5.1 MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD.....	24
2. METODOLOGÍA.....	26
2.1 VARIABLES	26
2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO.....	28
2.2.1 POBLACIÓN.	28
2.2.2 MUESTREO.....	28
2.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	29
2.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	29
2.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	29
2.4 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, MÉTODOS Y TÉCNICAS	30
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE REFRIGERACIÓN.....	35
3.2 CRECIMIENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS EN VEGETALES	35



3.3 CRECIMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS EN VEGETALES	38
3.4 DISCUSIÓN.....	40
4. CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES.....	43
REFERENCIAS	44
ANEXOS	48



Universidad de Cuenca
Cláusula de propiedad intelectual

Yo, Katherine Janneth Mejía Muñoz, autora de la tesis "**COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN CONSERVACIÓN DE DISTINTOS VEGETALES EN REFRIGERADORES DE TIPO A Y TIPO B**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 15 de diciembre de 2014

KATHERINE JANNETH MEJÍA MUÑOZ

0105627582



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo, Jenny Fernanda Orellana González, autora de la tesis "COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN CONSERVACIÓN DE DISTINTOS VEGETALES EN REFRIGERADORES DE TIPO A Y TIPO B ", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 15 de diciembre de 2014

JENNY FERNANDA ORELLANA GONZÁLEZ

0105315824



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

Yo, Katherine Janneth Mejía Muñoz, autora de la tesis **"COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN CONSERVACIÓN DE DISTINTOS VEGETALES EN REFRIGERADORES DE TIPO A Y TIPO B "**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **BIOQUIMICA FARMACÉUTICA**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 15 de diciembre de 2014

KATHERINE JANNETH MEJÍA MUÑOZ

0105627582



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, Jenny Fernanda Orellana González, autora de la tesis **"COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN CONSERVACIÓN DE DISTINTOS VEGETALES EN REFRIGERADORES DE TIPO A Y TIPO B "**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **BIOQUIMICA FARMACEUTICA**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 15 de diciembre de 2014

JENNY FERNANDA ORELLANA GONZÁLEZ

0105315824



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis en primera instancia agradecemos a Dios por las bendiciones derramadas para poder cumplir este tan anhelado sueño.

A nuestras familias y a nuestros padres quienes siempre fueron el pilar fundamental para impulsarnos a continuar y no rendirnos.

A la Universidad de Cuenca por darnos la oportunidad de realizar nuestros estudios en la institución y ser profesionales.

A nuestra directora de tesis Dra. Silvana Donoso por todo su tiempo, esfuerzo y dedicación, quien con su experiencia y conocimientos supo guiarnos y motivarnos a culminar con éxito esta meta planteada.

De igual manera a la Dra. Johana Ortiz quien fue un apoyo importante en nuestro trabajo, porque siempre estuvo dispuesta a compartir su tiempo y conocimientos con nosotras, siendo quien aclaró nuestras dudas y nos asesoró en todo momento para poder conseguir el resultado esperado en este proyecto.

A todos nuestros profesores durante la carrera, que no escatimaron esfuerzos y contribuyeron en nuestra formación profesional y que ahora también son parte de este logro.

También extendemos nuestro agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente colaboraron en la elaboración de este trabajo, ya que fueron un apoyo y gran ayuda para poder culminarlo, y sin ellos no lo hubiéramos logrado.

Incluso a todas aquellas personas que pusieron una piedrita en el camino, gracias porque todos esos tropiezos nos ayudó a ser más fuertes y a salir victoriosas en este desafío

A todos ellos muchas gracias y que Dios los bendiga.

KATHERINE Y JENNY



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios porque estuvo en sus planes que yo pudiera realizar este sueño.

A mis padres amados Mario y Sonia quienes no escatimaron esfuerzos, ni recursos y fueron el impulso para continuar, porque siempre estuvieron pendientes de que no decaiga y no desista de la lucha.

A los tesoros más importantes de mi vida Kiara y Lucas que con su inocencia y ternura se convirtieron en estímulo y el motivo por el cual continuar.

A Vicente, gracias porque pese a todas las dificultades siempre estuvo pendiente de que pueda culminar con éxito este proceso.

A mis hermanos Paúl, Adriana y Mati gracias porque siempre estuvieron presentes y dispuestos a ayudarme en todo lo posible con el único afán de verme culminar esta meta, fueron apoyo e impulso indescriptible.

A mi compañera de tesis Katherine porque pese a todas las adversidades supimos seguir en la lucha, gracias por la paciencia y la confianza. ¡Qué alegría amiga, LO LOGRAMOS!

Y me faltara papel para mencionar a cada una de las personas a quienes pudiera dedicar este trabajo por su apoyo y ayuda constante, quienes formaron parte de mi vida en algún momento, gracias amigos.

JENNY



Dedico este trabajo al creador de todas las cosas, mi Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades de la vida.

Con mucho cariño a mis padres que me dieron la vida, que me formaron con buenos sentimientos, hábitos y valores. Gracias mami, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre tu cariño y apoyo incondicional. Gracias papi por brindarme tu amor.

A todos mis hermanos en especial a Sonia y Tatiana por compartir momentos significativos conmigo y por estar dispuestas a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mi querida compañera de tesis, Jenny, a pesar de todos los obstáculos formamos un equipo y alcanzamos esta meta.

De manera especial a las personas que creyeron siempre en mí y que con su apoyo supieron darme ánimos en momentos de decline y cansancio. A ellos este proyecto, que sin ellos, no hubiese podido ser.

KATHERINE



INTRODUCCIÓN

La conservación de los alimentos ha sido una tarea importante para el ser humano desde sus orígenes, estos alimentos en su mayoría son perecederos y las causas de esto se debe a los procesos físico-químicos, enzimáticos y microbianos que alteran los productos. Estos problemas hicieron necesario el desarrollo de métodos de conservación más efectivos que permitieran disponer de los alimentos por un tiempo más prolongado, desarrollándose así la refrigeración. Por ello es importante realizar un estudio comparativo de los tipos de sistemas de refrigeración en base al análisis microbiológico realizado a vegetales, determinando así, que sistema de refrigeración es más apto para su conservación.

Por refrigeración se entiende la conservación de alimentos a temperaturas inferiores a 10°C y superiores al punto de congelación del agua. La baja temperatura es, evidentemente, un factor limitante del crecimiento microbiano. Los sistemas de refrigeración utilizados son: Biactivo y No-Frost, el primero de ellos se caracteriza por poseer una placa en la parte posterior del refrigerador encargada de irradiar el frío dentro del sistema y el segundo sistema presenta múltiples salidas de aire en el interior del ambiente de refrigeración que permitirá controlar el grado de humedad.

Con este estudio se busca colaborar con la Empresa "X" para mejorar la calidad de sus productos.



CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Refrigeración

1.1.1 Aspectos generales. La mitad de la producción mundial de alimentos necesita de uno de los procesos de conservación más importantes: la refrigeración. Se entiende por refrigeración, la conservación de alimentos a temperaturas inferiores a 10° C y superiores al punto de congelación del agua. La baja temperatura es evidentemente un factor limitante del crecimiento microbiano. A temperatura de refrigeración (0-5°C) los organismos psicrófilos crecen más rápidamente que los mesófilos y por tanto la baja temperatura, supone un factor de selección de la flora del alimento de gran importancia. Este hecho unido a que a temperaturas inferiores a la óptima los períodos de latencia se alargan mucho, especialmente en bacterias mesófilas, hace que la población bacteriana esperable tras largos períodos de refrigeración esté constituida mayoritariamente por psicrófilos, y que por lo consiguiente los procesos que se producen a esta temperatura sean predominantemente de alteración más que de microorganismos patógenos (ROJAS, 2000)

Si bien la refrigeración es un proceso sencillo y conocido desde hace décadas, es sabido que los diferentes tipos de productos perecederos requieren tratamientos muy diversos y que la refrigeración aplicada genéricamente puede dar lugar a efectos indeseables. Es necesario hacer una clasificación a los productos perecederos en dos grupos: los que están aún vivos y aquellos que no. Los productos "vivos" tales como vegetales, frutas, huevos, ostras, deben ser mantenidos a temperaturas arriba del punto de congelación para evitar daños



fisiológicos. Los procesos de vida siguen su curso a velocidades más bajas de lo que lo hacen a temperaturas normales. (ROJAS, 2000)

Los alimentos de origen vegetal, frutas y vegetales, van a vivir después de ser cosechados una larga temporada, fuera de su hábitat natural y a una temperatura diferente a la de su fase de desarrollo, por lo que se presentan una serie de problemas y numerosos factores que van a influir en el mantenimiento de sus funciones vitales y de sus características organolépticas. Además se tendrá que considerar la susceptibilidad de estos productos a las alteraciones fisiológicas y microbiológicas que se presentan luego de la cosecha incluso sí para su conservación se utilizan bajas temperaturas. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

Para productos "no vivos" tales como carne, pescado y productos lácteos, las condiciones son diferentes. El propósito de la refrigeración es retardar el deterioro por microorganismos, el deterioro por procesos químicos y por procesos físicos. Es posible lograr una extensión limitada del tiempo de almacenaje por enfriamiento a temperaturas arriba del punto de congelación y esto es, con frecuencia, suficiente para hacer una distribución y comercialización segura. (CIARLO, y otros, 2011)

1.1.2 Conservación en estado refrigerado de alimentos de origen vegetal. El almacenamiento refrigerado correcto de vegetales se efectúa, en términos generales, lo más pronto posible después de la recolección y se aplica tan sólo a productos de un grado de madurez adecuado y de buena calidad. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

Cada vegetal, una vez cosechado, tiene un potencial de vida, que está determinada fundamentalmente por su intensidad respiratoria y por sus reservas metabólicas. Este potencial de vida es la expresión directa de la calidad de conservación; sin embargo, el marchitamiento, la podredumbre y la supermadurez pueden reducir sensiblemente la duración de la vida en el curso del



almacenamiento en frío. Sin embargo los factores más importantes que influyen en la conservación de los vegetales al estado refrigerado son la calidad inicial del producto y las condiciones de conservación.

- a. **Calidad inicial del producto.**_ Los vegetales frescos que van a ser conservadas por el frío deben estar libres de daño mecánico que puedan ser vía de acceso para la invasión y posterior desarrollo de los microorganismos causantes de podredumbres. Solamente el almacenamiento de vegetales de alta calidad inicial puede alcanzar una conservación adecuada con el tiempo. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)
- b. **Condiciones de conservación.** Entre las condiciones de conservación tenemos diferentes factores que influyen para mantener las vegetales conservadas de manera correcta: humedad, temperatura, flujo de aire, entre otros.

1.2 Características de los sistemas de refrigeración Bioactivo y No-Frost

1.2.1 Sistema de refrigeración Bioactivo. Es un sistema de dos cámaras independientes, el congelador tiene un sistema No-Frost con descongelación automática y preservación a muy baja temperatura, con movimiento de aire para ganar velocidad de enfriamiento y que además está completamente separado de la cámara del refrigerador.

En el refrigerador, se dispone de una placa posterior, encargada de irradiar frío, conservando así la frescura y humedad natural de los alimentos, sin exponerlos a un flujo de aire, evitando la resequedad y conservando frutas y verduras por mayor tiempo. Este sistema ayuda a conservar el medio ambiente, ya que cada cámara utiliza un sistema de aire; al abrir una puerta, solo entra calor del ambiente a ese compartimento, lo que no ocurría con sistemas de refrigeración tradicionales, cuya respuesta a la apertura de una puerta era generar una corriente de frío en todo el artefacto. (EMPRESA FABRICANTE, 2012)



1.2.2 Sistema de refrigeración No-Frost. El sistema No Frost se compone de un motor que enfría el congelador y de un ventilador que reparte el aire seco de forma homogénea, no genera escarcha porque la humedad no se condensa y además proporciona una mayor calidad de congelación. La tecnología No Frost refrigera y distribuye el aire frío más rápidamente en el interior gracias a las múltiples salidas de aire, permite controlar el grado de humedad, y evitar que se acumule la escarcha sobre las paredes o sobre los alimentos. (EMPRESA FABRICANTE, 2009)

1.3 Influencia de las bajas temperaturas en la fisiología de los vegetales

La conservación a bajas temperaturas de los alimentos ha sido una tarea importante para el ser humano desde la alborada de la humanidad, constituyendo una faceta fundamental de la ciencia y tecnología actual de los alimentos. Las bajas temperaturas actúan modificando la fisiología de los vegetales mediante los procesos de transpiración, respiración y maduración.

1.3.1 Transpiración. Los vegetales están constituidos fundamentalmente por agua y la transpiración no es sino la evaporización de parte del agua, lo que origina su deshidratación o marchitamiento que puede impedirse reduciendo la intensidad de transpiración. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

Los vegetales transpiran cuando hay una diferencia entre la presión de vapor de la atmósfera interna de los tejidos y la del ambiente donde se encuentran. La pérdida de agua se traduce a pérdida de peso, es más rápida y más importante a temperaturas elevadas que a bajas. No todos los vegetales pierden agua y peso al mismo ritmo o en el mismo grado cuando se almacenan en las mismas condiciones; cuando mayor es la superficie expuesta por unidad de volumen, tanto más rápida y mayor es la pérdida; las hortalizas foliáceas pierden, por su estructura y elevado porcentaje de agua en su composición, más agua que las frutas o vegetales esféricos. Ésta pérdida de agua causa deshidrataciones o



marchitamientos importantes que traen como consecuencia pérdida de calidad. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

Un buen mantenimiento de alto contenido de agua en las hortalizas es una de las mayores exigencias para la conservación de la calidad durante el almacenamiento en frío y por lo tanto, a lo que el proceso de transpiración se refiere, una buena conservación frigorífica ha de caracterizarse por una temperatura suficientemente baja, una humedad relativa adecuadamente alta y una circulación de aire apropiada. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

1.3.2 Respiración. Consiste en una oxidación de sustancias orgánicas ricas en energía potencial. En presencia de oxígeno molecular la respiración es aerobia y los productos finales de la combustión de la glucosa, fundamentalmente son, el anhídrido carbónico, agua y calor. La reacción general de la respiración aerobia se lleva a cabo gradualmente, en dos etapas: glucólisis y respiración propiamente dicha, en cada una de las cuales tienen lugar una serie de reacciones sucesivas catalizadas por las correspondientes enzimas. En ausencia de oxígeno la respiración es anaerobia, se puede transformar en un proceso fermentativo y es mucho menos eficiente como productora de energía. La respiración aerobia es la que domina en los frutos y vegetales recién recolectados. La intensidad respiratoria (IR), cantidad de oxígeno absorbida por un órgano vegetal de un peso determinado durante un tiempo definido, es una buena medida del metabolismo de los productos vegetales así como de su vida después de la recolección y de sus posibilidades de conservación. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

En general, los vegetales respiran más intensamente que las frutas, a una misma temperatura, y las variedades tempranas suelen respirar más que las tardías. La actividad respiratoria de los vegetales cesa y por lo tanto el producto muere si la temperatura del ambiente donde se encuentra es muy alta o muy baja. Hay una zona de temperatura, entre 0 y 35° C, donde la respiración aumenta a razón de 2 a 2,5 veces cada 10° C de incremento en la temperatura. Por encima de 35° C la



intensidad respiratoria se ve afectada favorablemente por el efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones, pero desfavorablemente por el efecto inhibitor de las temperaturas elevadas sobre la actividad enzimática, debido a la desnaturalización por el calor de las proteínas de las enzimas y por el deterioro que causan en la estructura e integridad de la membrana y organización celular. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

1.3.3 Maduración. Esta etapa de la vida de los vegetales se considera como el comienzo de la maduración y con ello la organización intracelular empieza a deteriorarse. La maduración está regulada por su almacenamiento, por lo que el frío frena e incluso inhibe la maduración. Durante la senescencia los vegetales se hacen cada vez más susceptibles a los ataques por microorganismos, hecho debido no solamente a una mayor facilidad para su desarrollo como consecuencia de los cambios bioquímicos sino también a una pérdida gradual de su inmunidad natural. (MUÑOZ-DELGADO, 1995)

1.4 Factores del alimento capaces de modificar su conservación

Los alimentos son un excelente vehículo para el transporte de microorganismos. Debido a la presencia de agua y nutrientes existe un ambiente favorable para el crecimiento natural de bacterias en un período muy corto de tiempo. En condiciones como las que ofrecen los climas cálidos, el crecimiento de los microorganismos es aún más rápido. Además, si se siguen prácticas antihigiénicas durante el manejo de productos alimentarios, los microorganismos pueden ser transferidos a la superficie de los alimentos desde muchas fuentes lo que genera riesgos en su conservación. Por lo que existen diferentes factores como el pH, actividad acuosa y temperatura capaces de modificar su conservación. (BERMÚDEZ AGUIRRE y otros, 2010)

1.4.1 Potencial de hidrógeno. Es un parámetro crítico en el cultivo de microorganismos ya que estos sólo pueden crecer en un rango estrecho de pH



fuera del cual mueren rápidamente. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica.

Cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere.

Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son, también, distintos. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH=1.0 y otros alcalófilos que toleran pH=10.0

El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6.0 a 7.0. Las bacterias suelen crecer mejor en condiciones cercanas a la neutralidad mientras que los mohos pueden tolerar pH más bajos y crecer incluso en alimentos a pH 2 y 3. (BARREIRO, y otros, 2006).

La mayoría de los vegetales presentan niveles de pH en un rango entre 2 y 7. (BEDÓN GÓMEZ, y otros, 2013). Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de cultivo suele tender a bajar durante el cultivo. Por consiguiente, es necesario controlar el pH de los cultivos industriales para evitar que un descenso excesivo pueda producir la auto - esterilización del cultivo.

Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos competidores. La bajada del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. (Navarre, y otros, 2006)

1.4.2 Actividad del agua (a_w). Se define como el índice de la presión de vapor de agua de los alimentos (P) sobre la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (P_o) ($a_w = P/P_o$). La mayor parte de microorganismos que



descomponen los alimentos poseen una a_w menor de 0.91, aunque algunas levaduras o mohos pueden crecer en un valor de a_w tan bajo como 0.80. La mayoría de las bacterias crecen bien con una a_w entre 0.98 y 0.99; por lo que a valores bajos de a_w la velocidad de crecimiento y la masa celular disminuyen, ya que mientras el valor de a_w se encuentre más cercano de cero, menos probabilidad existe de que crezcan microorganismos (ROBINSON K, 1987)

1.4.3 Temperatura. Los microorganismos presentan una temperatura óptima para su crecimiento, a la cual presentan su mayor desarrollo. Igualmente presentan una temperatura máxima por encima del cual no crecen y una temperatura mínima, por debajo de la cual tampoco se reproducen. Si la temperatura aumenta por encima del máximo, la tasa decrece y cuando se llega a un nivel suficientemente alto se detiene y el microorganismo llega a ser inactivado por efecto del calor. Cuando la temperatura desciende la tasa de crecimiento también se disminuye, hasta que se alcanza la temperatura mínima de crecimiento, en la cual este se detiene. Por debajo de la temperatura mínima de crecimiento los microorganismos no se reproducen, pero sufren un efecto letal muy lento mediante el cual el número decrece paulatinamente, pero sin llegar a ser la inactivación total, quedando por consiguiente siempre microorganismos viables, aunque en menor cantidad.(BARREIRO, y otros, 2006)

El uso de las bajas temperaturas para conservar los alimentos aplica este principio, al permitir el crecimiento de microorganismos psicrófilos en el caso de la refrigeración, reduciendo o deteniendo el crecimiento de los microorganismos mesófilos termófilos, mientras que si la temperatura llega a ser lo suficientemente baja de forma que se sobrepase la temperatura mínima de todos los microorganismos presentes se llegara a detener el crecimiento microbiano y a estabilizar al alimento desde el punto de vista microbiológico.(BARREIRO y otros, 2006)



1.4.4 Oxígeno. Los microorganismos de acuerdo a su requerimiento de oxígeno se clasifican en aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos. Los microorganismos aerobios necesitan el oxígeno presente en el aire para su crecimiento; en este grupo se incluyen los mohos y la mayoría de levaduras y bacterias. Los microorganismos anaerobios no necesitan el oxígeno para su crecimiento debiéndolo tomar de otros compuestos mediante sus procesos metabólicos; a este grupo pertenecen algunas bacterias. Al grupo de anaerobios facultativos pertenecen los microorganismos que pueden comportarse tanto en forma aeróbica como anaeróbica dependiendo del ambiente que los rodee, como algunas bacterias y levaduras. (BARREIRO y otros, 2006)

1.5 Aspectos microbiológicos de deterioro en vegetales

Existen microorganismos que alteran los constituyentes de los alimentos de forma que los estabilizan permitiendo su mayor duración y, además, proporcionan compuestos que confieren sabores característicos a los alimentos por ellos producidos. (ANDINO RUGAMA y otros, 2010).

Otros microorganismos de mucha importancia son los que no afectan al hombre pero son capaces de alterar los alimentos y se denominan alterativos o corruptivos; éstos descomponen los alimentos originando pérdidas en todos los niveles de procesamiento y comercialización de alimentos, afectando consumidores, productores y vendedores. (GORRIS, y otros, 2006).

Muchas veces la causa de la contaminación del alimento se debe a medidas higiénicas inadecuadas en la producción, preparación y conservación; lo que facilita la presencia y el desarrollo de microorganismos, que producto de su actividad y haciendo uso de las sustancias nutritivas presentes en éste, lo transforman volviéndolo inaceptable para la salud humana. (ANDINO RUGAMA y otros, 2010)



El análisis microbiológico de vegetales no tiene carácter preventivo sino que simplemente es una inspección que permite valorar la carga microbiana por lo que siendo un proceso analítico es necesario seguir una serie de criterios sobre la toma de muestras y el análisis microbiológico de los productos finales (FAO, 2002). En este sentido, es necesario considerar:

- La distribución desigual de los microorganismos en los vegetales, lo que hace necesario seguir un esquema de toma de muestras para obtener resultados representativos (FAO 2002; LUCAM, 1988).
- El número de criterios utilizados a la hora de juzgar la calidad microbiológica debe limitarse al mínimo necesario para así poder aumentar el número de análisis. (FAO, 2002).

1.5.1 Microorganismos indicadores de calidad. Son microorganismos de riesgo indirecto bajo (indicadores). La selección de indicadores en un alimento depende fundamentalmente de los riesgos implicados y de lo que se requiera saber para liberar, controlar o mejorar el alimento. (GORRIS y otros, 2006; ANDINO RUGAMA y otros, 2010)

Los microorganismos indicadores se pueden dividir en dos grupos:

Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia o calidad

- a. Aerobios mesófilos
- b. Hongos y levaduras
- c. Coliformes totales

Indicadores de contaminación fecal

- a. Coliformes fecales
- b. *E. coli*
- c. *Enterococos*
- d. *Cl. perfringens*

El estudio comparativo de los ambientes de refrigeración se considera los microorganismos indicadores de calidad:



a. ***Aerobios mesófilos.*** Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se lo realiza por recuento estándar en placa por gramo o centímetro cúbico de muestra de alimento (REP).

b. ***Mohos y levadura.***

Mohos: Son ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma el llamado "micelio" que puede ser coloreado o no. Los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas. Provocan la alteración de productos alimenticios, especialmente los ácidos: yogur, jugos, frutas, etc., o los de presión osmótica elevada: productos deshidratados, jarabes, algunos productos salados, etc.

Levaduras: Son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovóidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias. Al igual que los mohos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.

El recuento de mohos y levaduras viables se refiere a la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22° C y 25°C.

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

El estudio realizado corresponde a una investigación de campo, de tipo descriptivo, prospectivo en corte longitudinal, cuasi-experimental.

Se define a esta investigación como descriptiva debido a que con la descripción de datos de los recuentos podemos comparar la calidad de los sistemas de refrigeración de tipo A y tipo B.

El diseño del presente trabajo fue de tipo Cuasi-Experimental de corte Longitudinal, pues las variables son medidas en 3 momentos diferentes a lo largo del tiempo.

2.1 Variables

Las variables que se utilizaron dentro del proceso de análisis microbiológico para proyecto investigativo se detallan a continuación:

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	CONCEPTO	DIMENSION	INDICADOR
Vegetales	Independiente	Alimentos de procedencia vegetal que se caracterizan por ser ricos en fibra y carbohidratos complejos.	Clase de alimento	-----

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	CONCEPTO	DIMENSION	INDICADOR
Microorganismo	Dependiente	Seres vivos microscópicos capaces de desarrollarse y multiplicarse en un medio con condiciones adecuadas, que causan el deterioro en alimentos.	Aerobios mesófilos. Mohos y levaduras.	UFC/ g o ml. UPC/ g o ml.
Sistema de Refrigeración	Independiente	Ambiente determinado al que se reduce la temperatura con el fin, de conservar los alimentos.	Refrigerador A Refrigerador B	-----

La descripción de las variables que gobiernan el análisis microbiológico realizado en laboratorio es la siguiente:

La primera variable que corresponde a los vegetales, fue seleccionada mediante encuestas realizadas por el proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Nutrición y Salud”.

Para determinar o definir los Microorganismos se seleccionaron indicadores de calidad los cuales están relacionados con métodos de conservación: aerobios mesófilos, mohos y levaduras.

Los Sistemas de Refrigeración se obtuvieron directamente de la Compañía “X” y los registros de temperatura, humedad, actividad acuosa, pérdida de humedad son obtenidos a partir de estudios realizados por el proyecto complementario de Ingeniería Química de la Universidad de Cuenca “Determinación de la vida de estante de alimentos en refrigeradores Bioactivo® y No-Frost®”. El ambiente utilizado para este estudio fue el cajón de vegetales.



2.2 Población, muestra y muestreo

2.2.1 Población. La población en estudio la constituyeron la lechuga, la cebolla blanca y la espinaca.

2.2.2 Muestreo. El muestreo fue aleatorio, realizando la compra en el “Mercado 10 de Agosto” en la sección de verduras, aleatoriamente en el tercer estante del pasillo central. Se realizaron tres compras diferentes de los vegetales para lograr un mejor control con cada uno de ellos. El peso total del lote fue de 350g de cebolla, 500 g de lechuga y 500 g de espinaca para cada sistema, usando 25 g de muestra para cada análisis. El período de tiempo transcurrido entre la obtención de las muestras y la realización de los ensayos no fue de más de 1 hora.

Este monitoreo se realizó en tres tiempos:

- El tiempo cero que es el día inicial de compra del alimento.
 - El tiempo a 7 días una vez almacenado el alimento inicial en condiciones de refrigeración dentro de las refrigeradoras tipo A y tipo B.
 - Y finalmente el tiempo a 15 días en las mismas condiciones de refrigeración.
- a. **Proceso de monitoreo:** Durante el análisis práctico, el muestro de cada grupo de vegetales mencionados anteriormente fue el siguiente.
- El monitoreo de las muestras de la cebolla se llevó a cabo partiendo de muestras diferentes de cebolla pero de un mismo lote, el número de cebollas se dividió de manera equitativa en refrigeradora A y refrigeradora B. Se analizan dos muestras diferentes del alimento.
 - El monitoreo de las muestras de la espinaca fue a partir de 2 atados de dicho vegetal para cada uno de los ambientes de refrigeración, obtenidos



de un mismo lote y conservados de manera equitativa en refrigeradora A y refrigeradora B. Se analizan dos muestras diferentes del alimento.

- El monitoreo de la lechuga fue a partir de muestras diferentes de lechuga pero de un mismo lote, el número de lechugas se dividió de manera equitativa en refrigeradora A y refrigeradora B. Se analizan dos muestras diferentes del alimento.

Adicionalmente se realizó una repetición del análisis de la espinaca escogida aleatoriamente del grupo de vegetales estudiados, esta nueva muestra de espinaca se obtuvo del mismo lugar que las anteriores y se conserva en la refrigeradora A y refrigeradora B, de manera equivalente.

2.3 Criterios de inclusión y exclusión

2.3.1 Criterios de inclusión. Se incluyen para el cálculo de mohos y levaduras las muestras que, por lo menos dos de las tres diluciones tengan recuentos entre 10 y 150 colonias.

Se incluyen para el cálculo de aerobios mesófilos las muestras que, por lo menos dos de las tres diluciones tengan recuentos entre 15 y 300 colonias.

2.3.2 Criterios de exclusión. Se excluye para el cálculo de mohos y levaduras las muestras que, en todas las diluciones contenga recuentos menores 10 o mayores a 150 colonias.

Se excluye para el cálculo de aerobios mesófilos las muestras que, en todas las diluciones contenga recuentos menores 15 o mayores a 300 colonias.



Se excluye para el cálculo de mohos y levaduras las muestras que, en las dos primeras diluciones contenga recuentos menores 10 o mayores a 150 colonias.

Se excluye para el cálculo de aerobios mesófilos las muestras que, en las dos primeras diluciones contenga recuentos menores 15 o mayores a 300 colonias.

Las muestras que contengan en todas sus diluciones placas MNP.

Las muestras que contengan en las dos primeras diluciones placas MNP.

2.4 Instrumentos de recolección de datos, métodos y técnicas

Para los análisis de conservación de los alimentos, los vegetales se obtuvieron del Mercado “10 de Agosto” lugar de consumo y compra de la población de Cuenca. Los vegetales fueron trasladados inmediatamente al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca para el análisis respectivo.

Para obtener datos de las muestras se usó hojas de recolección de datos con la siguiente información: Identificación de la muestra, características organolépticas y condiciones de transporte. (Anexo 3)

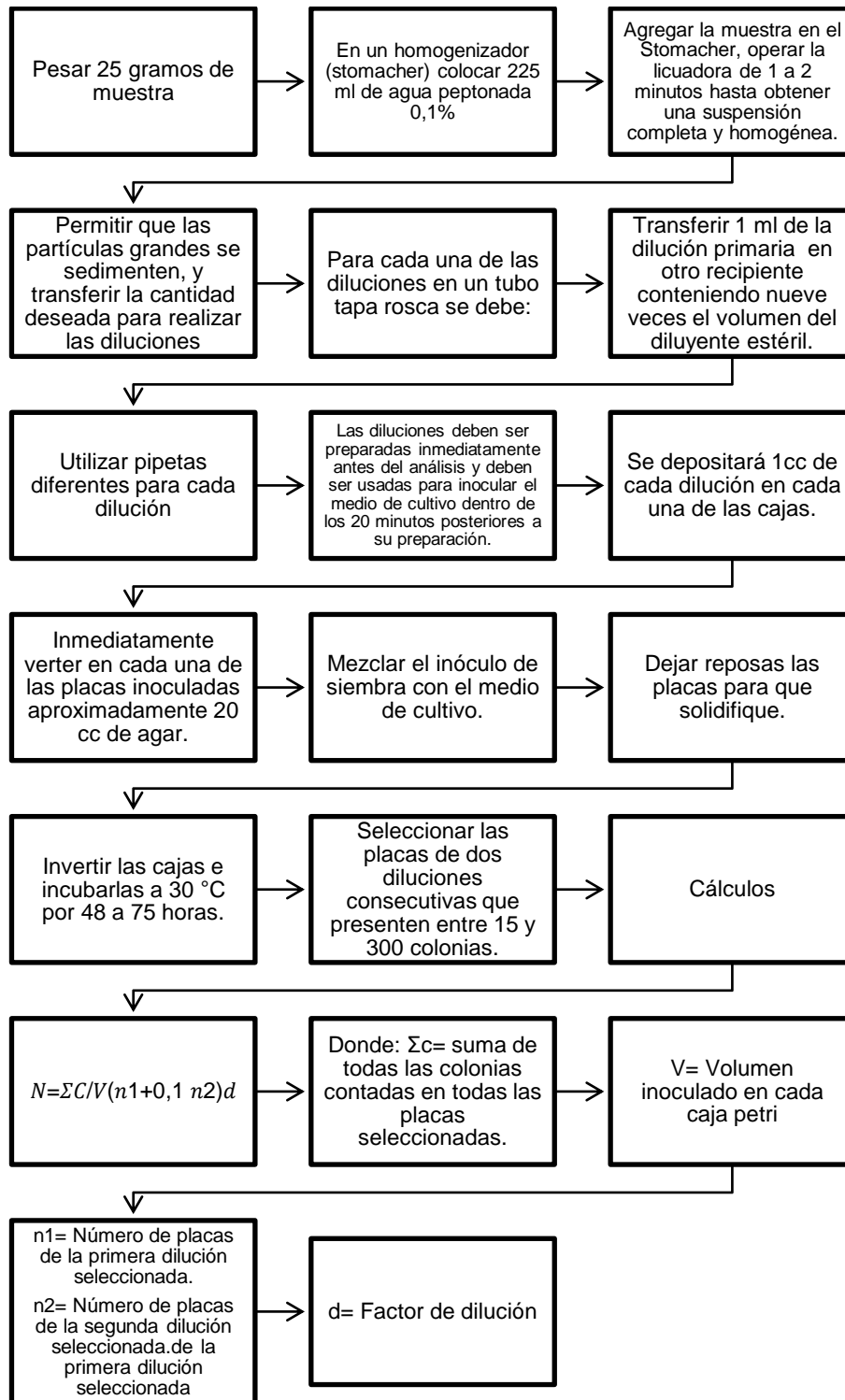
Métodos y técnicas:

1. *Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos.* NORMA: NTE INEN 1 529-5:2006. (Anexo 1)
2. *Determinación de mohos y levaduras viables.* NORMA: NTE INEN 1 529-10:98. (Anexo 2)

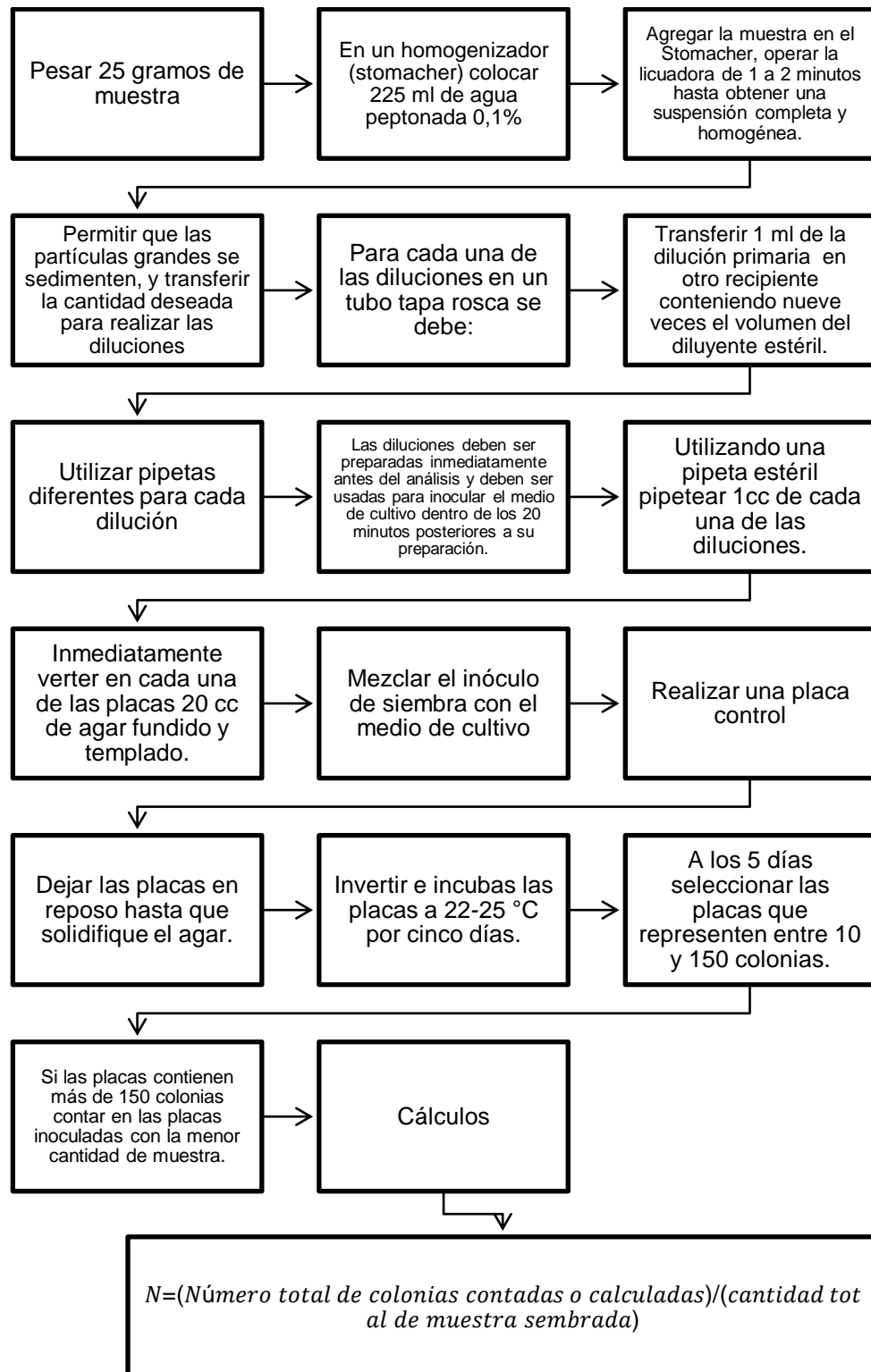


FLUJOGRAMAS DE PROCESO

**DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS
MESÓFILOS. REP.**



DETERMINACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECUENTOS EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD.





2.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos para proveer la información general de los resultados obtenidos y ver la variabilidad de cada grupo vegetal de muestras. La diferencia entre el almacenamiento en los dos tipos de refrigeradoras medidos en base al recuento de mesófilos totales y el recuento de mohos y levaduras fue analizada utilizando la prueba T (unilateral o de 1 cola). El nivel de significancia establecido fue $P < 0.05$ para todos los análisis. El análisis de los datos se realizó en el programa Stata 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX).

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los sistemas de refrigeración

Para el presente estudio se trabajó con dos sistemas de refrigeración de la Empresa “X”, los estudios físico-químicos se realizaron por separado como estudio complementario de “Determinación de la vida de estante de alimentos en refrigeradores Bioactivo® y No Frost®”, tesis desarrollada por Ingeniería Química.

Las características de estos sistemas de refrigeración se presentan en la siguiente tabla

Tabla 3.1: Características Físico- Químicas de los sistemas de refrigeración.

Sistemas de refrigeración	de Humedad cajón de vegetales (%)	de Temperatura interna (°C)
Sistema A	13	8,32
Sistema B	9	8,52

Fuente: (Ordoñez y otros, 2014)

3.2 Crecimiento de aerobios mesófilos en vegetales

El estudio inició con el recuento aerobios mesófilos, en tres vegetales diferentes: lechuga (n=2), espinaca (n=2) y cebolla (n=2), conservados tanto en el sistema A como en el sistema B de refrigeración para el análisis de conservación a los 7 días

y 15 días partiendo de un recuento inicial a 0 días, realizando diluciones decimales de: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , obteniendo valores de recuentos. (Anexo 4)

El tiempo cero hace referencia a la carga microbiana con la que llegaron las muestras al laboratorio desde el momento de su compra, obteniendo valores elevados antes de ser sometidos a refrigeración por lo que no son incluidos en el análisis.

Tomando en consideración criterios de inclusión y exclusión, y basado en INEN 1 529-5:2006 (Anexo 1) a los recuentos obtenidos se aplicó la fórmula:

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n1 + 0,1 n2)d}$$

Obteniendo resultados expresados en la siguiente tabla.

Tabla 3.2.1: Recuento de colonias para aerobios mesófilos, en muestras de cebolla, espinaca y lechuga, en los diferentes tiempos de análisis, en los sistemas tipo A y tipo B.

			Aerobios mesófilos (UFC/g)	
			Sistema "A"	Sistema "B"
Cebolla	Tiempo 7 días	Muestra 1	2,5E+04	3,2E+05
		Muestra 2	Incontable	8,4E+05
	Tiempo 15 días	Muestra 1	2,6E+04	3,5E+05
		Muestra 2	Incontable	8,6E+05
Espinaca	Tiempo 7 días	Muestra 1	1,7E+04	1,8E+04
		Muestra 2	1,5E+04	2,5E+04
	Tiempo 15 días	Muestra 1	2,1E+04	2,2E+04
		Muestra 2	1,8E+04	3,0E+04
Lechuga	Tiempo 7 días	Muestra 1	1,5E+06	1,7E+06
		Muestra 2	2,5E+06	1,3E+06
	Tiempo 15 días	Muestra 1	Incontable	1,9E+06
		Muestra 2	Incontable	1,4E+06

Fuente: (ORELLANA y otros, 2014)

Estos valores fueron comparados estadísticamente mediante la prueba T en los dos sistemas de refrigeración tipo A y tipo B, representados en la siguiente tabla.

Tabla 3.2.2: Recuento total de aerobios mesófilos comparando sistemas A y B.

Aerobios mesófilos					
Tiempo	# de muestras	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
7 días	7	1844457	1348822	2200	3400000
15 días	11	1275364	1430293	12000	3400000
Total	18	1496678	1388159	2200	3400000

Fuente: (ORELLANA y otros, 2014)

No se observó una diferencia significativa entre el recuento de aerobios mesófilos en las muestras al ser almacenados en el cajón de los vegetales de los sistemas A y B durante 7 días ($n=7$) ($P=0.061$), ni durante 15 días ($n=11$) ($P=0.1214$).

Sin embargo, al analizar las diferencias entre los sistemas de refrigeración A y B con el recuento de aerobios mesófilos de ambos periodos ($n=18$), se observó una diferencia entre los dos sistemas ($P= 0.0267$) (Figura 1), siendo menor el recuento en el sistema A que en el sistema B (Figura 2). El nivel de significancia establecido fue $P<0.05$ para todos los análisis.

Figura 1: Recuento de aerobios mesófilos en los dos periodos de tiempo ($n=18$).

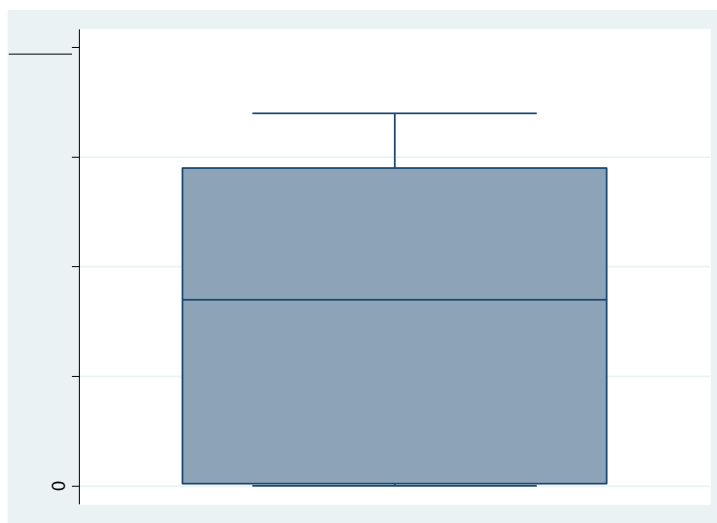
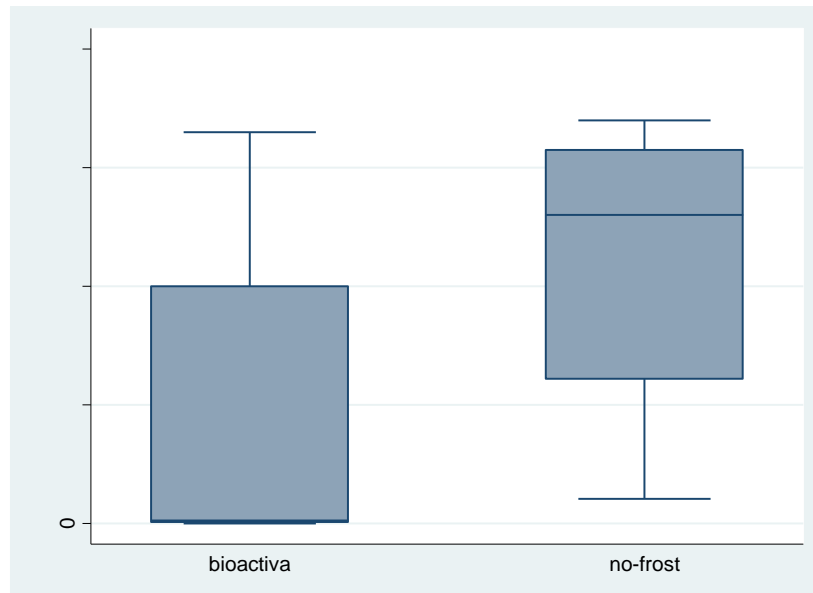


Figura 2: Recuento de aerobios mesófilos en los dos periodos de tiempo (n=18), en refrigeradores tipo A y tipo B.



Fuente: ((ORELLANA, y otros, 2014)

3.3 Crecimiento de mohos y levaduras en vegetales

Se realizó el recuento de mohos y levaduras, en tres vegetales diferentes: lechuga (n=2), espinaca (n=2) y cebolla (n=2), conservados tanto en el sistema A como en el sistema B de refrigeración para el análisis de conservación a los 7 días y 15 días partiendo de un recuento inicial a 0 días, realizando diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , obteniendo valores de recuentos. (Anexo 4)

El tiempo cero hace referencia a la carga microbiana con la que llegaron las muestras al laboratorio desde el momento de su compra, obteniendo valores elevados antes de ser sometidos a refrigeración por lo que no son incluidos en el análisis.

Tomando en consideración criterios de inclusión y exclusión, y basado en INEN 1 529-10:98 (Anexo 2) a los recuentos obtenidos se aplicó la fórmula:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

Obteniendo resultados expresados en la siguientes tabla. (Tabla 3.2.1).

Tabla 3.3.1: Recuento de colonias para mohos y levaduras, en muestras de cebolla, espinaca y lechuga, en los diferentes tiempos de análisis, en los sistemas tipo A y tipo B.

			Mohos y levaduras (UP/g)	
			Sistema "A"	Sistema "B"
Cebolla	Tiempo 7 días	Muestra 1	1,3E+04	2,9E+04
		Muestra 2	Incontable	4,3E+05
	Tiempo 15 días	Muestra 1	3,4E+05	5,1E+05
		Muestra 2	Incontable	Incontable
Espinaca	Tiempo 7 días	Muestra 1	4,1E+05	4,9E+05
		Muestra 2	8,5E+05	6,5E+05
	Tiempo 15 días	Muestra 1	4,7E+05	5,5E+05
		Muestra 2	Incontable	7,6E+05
Lechuga	Tiempo 7 días	Muestra 1	Incontable	Incontables
		Muestra 2	Incontable	1,6E+06
	Tiempo 15 días	Muestra 1	Incontable	Incontables
		Muestra 2	Incontable	2,0E+06

Fuente: ((ORELLANA y otros, 2014)

Estos valores fueron comparados estadísticamente mediante la prueba T en los dos sistemas de refrigeración tipo A y tipo B, representados en la siguiente tabla.

Tabla 3.3.2: Recuento total de mohos y levaduras comparando sistemas A y B.

Mohos y levaduras					
Tiempo	# de muestras	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
7 días	9	2033078	1624636	4700	4200000
15 días	6	1804000	1093076	24000	3000000
Total	15	1941447	1395875	4700	4200000

Fuente: ((ORELLANA y otros, 2014)

No se observó una diferencia significativa entre el recuento de mohos y levaduras en las muestras al ser almacenados en el cajón de los vegetales de los sistemas A y B, durante 7 días ($n=9$) ($P=0,4418$), durante 15 días ($n=6$) ($P=0,6077$), ni en el recuento total considerando ambos periodos de almacenamiento ($n=15$) ($P=0,4892$). El nivel de significancia establecido fue $P<0.05$ para todos los análisis.

3.4 Discusión

Debido a que los sistemas de refrigeración en estudio pertenecen a una marca comercial registrada y las condiciones de los sistemas son secretos de diseño industrial que no está revelado, se cuenta con información limitada. Sin embargo por los resultados obtenidos se observó que el sistema de refrigeración tipo A podría inhibir el crecimiento microbiológico de aerobios mesófilos debido a que este sistema presenta una placa posterior, encargada de irradiar frío, conservando así la frescura y humedad natural de los alimentos, sin exponerlos a un flujo de aire, y conservando los alimentos por un mayor tiempo. (Empresa fabricante)

Se esperaba que el sistema A presente mayor inhibición de crecimiento microbiano, pero esto se observó únicamente en aerobios mesófilos, no así en



mohos y levaduras que presentan un crecimiento lento y baja competitividad, además pueden manifestarse en los alimentos en condiciones de bajo nivel de pH y baja temperatura de almacenamiento. (Camacho y otros, 2009)

Además aunque se logró lo esperado hay que considerar que se tuvieron algunas limitaciones como el tamaño de la muestra debido al costo de los análisis, sería recomendable ampliar el estudio, tanto en tipos de alimentos como en los espacios de los refrigeradores.



4. CONCLUSIONES

- Al comparar los sistemas de refrigeración A y B, se concluye que existe diferencia significativa únicamente en la inhibición del crecimiento de aerobios mesófilos totales, tomando en cuenta 7 días y 15 días en conjunto. En el estudio de mohos y levaduras no existe diferencia significativa en las condiciones del estudio.
- Debido a la diferencia en el funcionamiento de los sistemas de refrigeración de acuerdo a sus características, el presente estudio probablemente es un indicio de que el refrigerador tipo A podrían dar ventajas para inhibir el crecimiento microbiano de aerobios mesófilos.



5. RECOMENDACIONES

- Incrementar el número de muestra y de parámetros, para poder trabajar con más observaciones.
- Determinar la dilución apropiada para cada alimento y para cada microorganismo indicador y considerarlo en los siguientes estudios.
- Continuar el estudio en varias refrigeradoras del mismo sistema para poder comprobar que todas las refrigeradoras del mismo sistema presentan condiciones similares.
- Realizar investigaciones con diferentes alimentos.

6. REFERENCIAS

- (FAO), Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2002. Control microbiológico. Comisión del Codex Alimentario. [En línea] 2 de Julio de 2002. [Citado el: 09 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <<http://www.fao.org>>.
- ANDINO RUGAMA, M. Sc Flavia y CASTILLO, Yorling. 2010. Curso Microbiología de los alimentos. *Enfoque práctico para la calidad alimentaria*. [En línea] Febrero de 2010. [Citado el: 17 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <<http://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>>.
- BARREIRO, José A y SANDOVAL, Aleida J. 2006. *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. 1. Caracas : Equinoccio, 2006. págs. 47-53.
- BEDÓN GÓMEZ, Melissa y NOLASCO CÁRDENAS, Oscar. 2013. ECIPerú, *Purificación Parcial y Caracterización de Alfa Amilasa de granos germinados de quinua*. Vol. 10, págs. 51-57. Disponible en Web: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf>.
- BERMÚDEZ AGUIRRE, Gustavo V y BARBOSA CÁNOVAS, Daniela. 2010. Nonthermal Processing of Food. [En línea] 08 de Enero de 2010. [Citado el: 09 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <<http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CD0QFjAD&url=http%3A%2F%2Fdialognet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F3711034.pdf&ei=ZjGWU4T2KO7esATxvYGwAw&usg=AFQjCNHWOZ7H2O2iAl4wu3bahK2Nqrbjw&bvm=bv.68445247,d.b2U&cad=rja>>.



- BOARD, R G. 1988. *Introducción a la Microbiología Moderna de los Alimentos*. Zaragoza : Editorial Acribia S.A., 1988. págs. 289-292. ISBN: 88-496-0367-8
- CASTAÑEDA, PABLO. 1999. Recuento de microorganismos viables "totales". *Salud Pública*. [En línea] 1999. [Citado el: 17 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <[http:// www.al-dia.cl/sistema/tablas/listar.asp](http://www.al-dia.cl/sistema/tablas/listar.asp)>.
- EMPRESA FABRICANTE. 2009. Funcionamiento de sistema No-Frost. [En línea] 27 de 04 de 2009. [Citado el: 03 de 11 de 2014.] Disponible en Web: <<http://linea-blanca.reparo.com/refrigeracion/funcionamiento-de-sistema-no-frost-t389327.html>>.
- -----, 2012. Sistema Bioactivo de Indurama una convergencia de tecnología, diseño y calidad. [En línea] 23 de 10 de 2012. [Citado el: 03 de 11 de 2014.] Disponible en Web: <<http://blog.indurama.com/Tendencias/tabid/89/EntryId/2/Sistema-Bioactivo-de-Indurama-Una-convergencia-de-tecnologia-diseno-y-calidad.aspx>>.
- Española, Real Academia. 2010. Diccionario. [En línea] 2010. [Citado el: 22 de Junio de 2014.] Disponible en Web: <<http://lema.rae.es/drae/srv/search?key=comparaci%C3%B3n>>.
- GORRIS, Leon. KASUGA, Fumiko y COLABORADORES. 2006. Microorganismos de los alimentos. [aut. libro] International Commissions on Microbial Specification. 2da Edición. Zaragoza : Editorial Acribia, 2006, Vol. Volumen I, págs. 123-129.
- LOPEZ, Javier. 2006. scielo . [En línea] febrero de 2006. [Citado el: 10 de enero de 2013.] Disponible en Web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872006000200009&script=sci_arttext>.



- MALDONADO, Ismael. 2012. Salud.es. [En línea] 2012. [Citado el: 23 de octubre de 2012.] Disponible en Web: <<http://www.salud.es/principio/mebendazol>>.
- MARTÍNEZ, Esteban. 2003. Journal of AOAC International Application of Strategically Designed Sample Composition to the Rapid Analytical Screening of milk Samples for Polychlorinated Biphenyls. [En línea] 2003. [Citado el: 11 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <<http://www.aldía.cl/sistema/tablas/listar.asp>>.
- MUÑOZ-DELGADO, José A. 1995. Refrigeración y congelación de alimentos vegetales. [En línea] Julio de 1995. [Citado el: 11 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <<http://www.fen.org.es/imgPublicaciones/12-Refrigeraci%C3%B3n%E2%80%A6y%20congelaci%C3%B3n.pdf>>.
- NAVARRE, University of y Department of Agrarian Production. 2006. Genetics and Microbiology Research Group. [En línea] 2006. [Citado el: 03 de 11 de 2014.] Disponible en Web: <<http://www.unavarra.es/genmic/index.htm>>.
- NTE INEN. Control microbiológico de alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. REP. 1529-5. Primera edición. Quito: 2006
- NTE INEN. Control microbiológico de alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placas por siembra en profundidad. 1529-10. Primera edición. Quito: 1998
- NUÑEZ, Gabriel. 2001. E. coli y Coliformes. *Complejo Nacional de la Salud*. [En línea] 2001. [Citado el: 17 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <<http://dian.gov.co/Dian/ActEcono.nsf>>.



- PARRILLA, Marco. 2002. Alimentos y su Control. *American Journal of Clinical Nutrition*. [En línea] 2002. [Citado el: 17 de 06 de 2014.] Disponible en Web: <<http://www.nutrifon.com.ar>>.
- RESTREPO, Angela. 2003. *Fundamentos de medicina Enfermedades Infecciosas*. cali : Fondo Editorial CIB, 2003.
- SHERWOOD, Linda M. CHRISTOPHER J. WOOLVERTON Joanne M. *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. 7ma edición. España : Editorial McGrawhil, 2008, pág. 1124.
- SIXTOS, Claudia. 2008. Virbac salud animal. [En línea] 2008. [Citado el: 23 de octubre de 2012.] Disponible en Web: <<http://www.webveterinaria.com/virbac/new25/compania.pdf>>.
- TORRADO, Susana. 1994. Universidad Complutense de Madrid. [En línea] julio de 1994. [Citado el: 14 de diciembre de 2012.] Disponible en Web: <<http://eprints.ucm.es/tesis/19911996/D/1/AD1012901.pdf>>.
- ULLOA, M. 1991. Diccionario Ilustrado de Micología. [aut. libro] Universidad Autónoma de México. México D.F : s.n., 1991, pág. 310.
- UREÑA, J. Liébana. 2002. *Microbiología Oral*. 2da Edición. Madrid : Editorial Mc Graw. Interamericana, 2002. 234 p. ISBN 8448604604608, 9788448604608



7. ANEXOS

Anexo 1



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA **NTE INEN 1 529-5:2006**
Primera revisión

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.

Primera Edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL IN FOODS. DETERMINATION OF THE QUANTITY OF AEROBIC MESOPHILIC MICROORGANISMS. PCA.

First Edition

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, ensayo, REP.
AL 01.05-303
CDU: 579.67
CIU: 9320
ICS: 07.100.30:67.050



CDU: 579.67
ICS: 07.100.30:67.050



CIU: 9320
AL 01.05-303

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.	NTE INEN 1 529-5:2006 Primera revisión 2006-01
<p style="text-align: center;">1. OBJETIVO</p> <p>1.1 Esta norma establece el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Este método de ensayo solo permitirá cuantificar la presencia de grupos de microorganismos aerobios mesófilos.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C.</p> <p>3.2 REP es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos por gramo o centímetro cúbico de muestra de alimento.</p> <p style="text-align: center;">4. RESUMEN</p> <p>4.1 Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento.</p> <p>4.2 Limitaciones del método. Se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos vitales (viables) en la muestra debido a las siguientes condiciones:</p> <p>4.2.1 Las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano.</p> <p>4.2.2 Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse;</p> <p>4.2.3 Las condiciones inadecuadas de aerobiosis, nutrición y temperatura; la presencia de inhibidores y el uso incorrecto.</p> <p style="text-align: center;">5. DISPOSICIONES GENERALES</p> <p>5.1 Todo el material a utilizarse en la determinación debe estar perfectamente limpio y estéril.</p> <p>5.2 El área de trabajo debe estar constituida por una mesa nivelada, de superficie amplia, limpia, desinfectada, bien iluminada, situada en una sala de aire limpio, libre de polvo y corrientes de aire.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <p>DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, ensayo, REP.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Bequerizo Moreno EB-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción



5.3 La carga microbiana del aire debe ser controlada durante el ensayo y, para una exposición del medio de cultivo a él por 15 min, no debe exceder de 15ufc/placa; de superarse este valor los ensayos deben ser anulados.

5.4 Todas las demás áreas del laboratorio deben estar libres de polvo, de insectos y guardar protegidos el material y suministros.

6. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

6.1 Materiales

6.1.1 Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 cm³ y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

6.1.2 Cajas Petri de 90 mm x 15 mm,.

6.1.3 Erlenmeyer y/o frasco de boca ancha de 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

6.1.4 Tubos de 150 mm x 16 mm

6.1.5 Gradillas

6.1.6 Contador de colonias

6.1.7 Balanza de capacidad no superior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad.

6.1.8 Baño de agua regulado a 45°C ± 1°C.

6.1.9 Incubador regulable (25°C - 60°C)

6.1.10 Autoclave.

6.1.11 Refrigeradora para mantener las muestras y medios de cultivo

6.1.12 Congelador para mantener las muestras a temperatura de -15°C a -20°C

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Agar para recuento en placa (Plate Count Agar). Preparación (ver Agares en la NTE INEN 1529-1)

6.2.2 Agua peptonada al 0,1 % (diluyente). Preparación (ver diluyentes en la NTE INEN 1 529-1)

7. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

7.1 Preparar la muestra según uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Para cada dilución el ensayo se hará por duplicado. En cada una de las cajas Petri bien identificadas se depositará 1 cm³ de cada dilución. Para cada depósito se usará una pipeta distinta y esterilizada.

8.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 cm³ de agar para recuento en placa-PCA, fundido y templado a 45°C ± 2°C. La adición del medio no debe pasar de más de 45 minutos a partir de la preparación de la primera dilución.

(Continúa)



8.3 Cuidadosamente, mezclar el inoculo de siembra con el medio de cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en el contrario.

8.4 Como prueba de esterilidad verter agar en una caja que contenga el diluyente sin inocular. No debe haber desarrollo de colonias.

8.5 Dejar reposar las placas para que se solidifique el agar.

8.6 Invertir las cajas e incubarlas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 a 75 horas.

8.7 No apilar más de 6 placas. Las pilas de placas deben estar separadas entre sí, de las paredes y del techo de la incubadora.

8.8 Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 300 colonias y utilizando un contador de colonias, contar todas las colonias que hayan crecido en el medio, incluso las pequeñas, pero, se debe tener cuidado para no confundirlas con partículas de alimentos o precipitados, para esto, utilizar lupas de mayor aumento.

8.9 Las colonias de crecimiento difuso deben considerarse como una sola colonia si el crecimiento de este tipo de colonias cubre menos de un cuarto de la placa; si cubre más la caja no será tomada en cuenta en el ensayo.

8.10 Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.

9. CALCULOS

9.1 Caso general (placas que contienen entre 15 y 300 colonias).

9.1.1 Calcular el número N de microorganismo por gramo o cm^3 de producto como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

En donde:

- $\sum c$ = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas;
- V = Volumen inoculado en cada caja Petri;
- n_1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada;
- n_2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada;
- d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

9.1.2 Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menor que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , donde x es la correspondiente potencia de 10.

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados (dos placas por dilución):
primera dilución seleccionada (10- 2): 225 y 178 colonias,
segunda dilución seleccionada (10- 3): 25 y 15 colonias,

(Continúa)

$$N = \frac{225 + 178 + 25 + 15}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$$

$$N = \frac{443}{0,022}$$

$$N = 20136$$

Redondeando:

$$20\ 000 = 2,0 \times 10^4$$

9.2 Recuentos estimados

9.2.1 Si dos placas inoculadas con muestra no diluida (productos líquidos), o con la suspensión inicial (otros productos) o con la primera dilución inoculada o retenida contienen menos de 15 colonias, calcular el número estimado N_E de microorganismos presentes por gramo o cm^3 de producto como una media aritmética m de las colonias contadas en las dos placas utilizando la siguiente ecuación:

$$N_E = \frac{\sum c}{V \times n \times d}$$

- $\sum c$ = suma de las colonias contadas en las dos placas;
 V = volumen inoculado en cada placa;
 n = número de placas seleccionadas (en este caso, $n = 2$).
 d = factor de dilución de la suspensión inicial o de la primera dilución inoculada o seleccionada ($d = 1$ cuando se inocula un producto líquido sin diluir).

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados:

Primera dilución retenida (10-2): 12 y 13 colonias.

$$N_E = \frac{12 + 13}{1 \times 2 \times 10^{-2}}$$

$$N_E = \frac{25}{0,02}$$

$$N_E = 1250$$

Redondeando

$$N_E = 1300$$

$$N_E = 1,3 \times 10^3$$

(Continúa)



En los productos líquidos, $N_E = m$

9.2.2 Si las dos placas inoculadas con la muestra sin diluir (productos líquidos), o con la primera dilución o con la suspensión inicial (otros productos) no presentan colonias, expresar los resultados de la siguiente manera:

$$N_E \leq 1/d$$

En donde:

N_E = cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico
 d = factor de dilución (ver numeral 9.2.1)

10. INFORME DE RESULTADOS

10.1 Informar como número N de microorganismos por gramo o cm^3 de muestra utilizando solo dos cifras significativas, según lo indicado en el numeral 9.1.

10.1.1 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.1.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N de microorganismos/g o $\text{cm}^3 = 2,0 \times 10^4$

10.1.2 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.1, se expresaría de la siguiente manera:

- N_E de microorganismos/g ó $\text{cm}^3 = 1,3 \times 10^8$

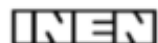
10.1.3 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N_E de microorganismos/g ó $\text{cm}^3 \leq 1,0/d$

(Continúa)



Anexo 2



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1 529-10:98

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS
Y LEVADURAS VIABLES. RECUENTOS EN PLACA POR
SIEMBRA EN PROFUNDIDAD.**

Primera Edición

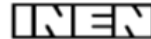
FOODS MICROBIOLOGICAL CONTROL. MOLDS AND YASTS. PPLATE ACCOUNT BY DEEP SOWING.

First Edition

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras.
AL 01.05-308
CDU: 614.31:579.67:582.28
CIIU: 9320
ICS: 07.100.30



CDU: 614.31:579.67:582.28
ICS: 07.100.30



CIU: 9320
AL 01.05-308

Norma Técnica Ecuatoriana Opcional	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECuento EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD	NTE INEN 1 529-10:98 1998-01
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma describe el método para cuantificar el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras en un gramo ó centímetro cúbico de muestra.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma especifica el método de recuento, en placa, por siembra en profundidad, para el recuento de mohos y levaduras.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Mohos. Son ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma el llamado "micelio" que puede ser coloreado o no. Los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas. Provocan la alteración de productos alimenticios, especialmente los ácidos: yogur, jugos, frutas, etc., o los de presión osmótica elevada: productos deshidratados, jarabes, algunos productos salados, etc.</p> <p>3.2 Levaduras. Son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovóidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias. Al igual que los mohos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.</p> <p>3.3 Recuento de mohos y levaduras viables. Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22°C y 25°C.</p> <p style="text-align: center;">4. RESUMEN</p> <p>4.1 Este método se basa en el cultivo entre 22°C y 25°C de las unidades propagadoras de mohos y levaduras, utilizando la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad y un medio que contenga extracto de levadura, glucosa y sales minerales.</p> <p style="text-align: center;">5. MATERIAL Y MEDIOS DE CULTIVO</p> <p>5.1 Materiales. La vidriería debe resistir esterilizaciones repetidas y todo el material debe estar perfectamente limpio y estéril.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <p>DESCRIPTORES: Productos alimenticios. Análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno EB-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

**5.1.1 Placas Petri**

5.1.2 Pipetas serológicas de boca ancha de 1; 5 y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

5.2 Medio de cultivo

5.2.1 Agar sal-levadura de Davis o similar. Ver NTE INEN 1 529-1.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

6.1 Preparar la muestra según su naturaleza, utilizando uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Utilizando una sola pipeta estéril, pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm³ de cada una de las diluciones decimales en placas Petri adecuadamente identificadas. Iniciar por la dilución de menor concentración.

7.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas, aproximadamente 20 cm³ de agar sal-levadura de Davis (SLD) fundido y templado a 45 ± 2°C. La adición del medio de cultivo no debe pasar más de 15 minutos, a partir de la preparación de la primera dilución.

7.3 Delicadamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección; hacerla girar cinco veces en sentido de las agujas del reloj. Volver a Imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y hacerla girar cinco veces en sentido contrario a las agujas de reloj.

7.4 Utilizar una placa para el control de la carga microbiana del ambiente, la cual no debe exceder de 15 colonias/placa, durante 15 minutos de exposición. Este límite es mantenido mediante prácticas adecuadas de limpieza y desinfección.

7.5 Como prueba de esterilidad del medio, en una placa sin inóculo verter aproximadamente 20 cm³ del agar.

7.6 Dejar las placas en reposo hasta que se solidifique el agar.

7.7 Invertir las placas e incubarlas entre 22°C y 25°C, por cinco días.

7.8 Examinarlas a los dos días de incubación y comprobar si se ha formado micelio aéreo. Las primeras colonias que se desarrollan son las de levaduras, que suelen ser redondas, cóncavas, estrelladas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas. En ciertos casos, apenas cambian al envejecer, otras veces se desecan y encogen. Las colonias de mohos tienen un aspecto algodonoso característico.

7.9 Cuando el micelio aéreo de los mohos amenace cubrir la superficie de la placa, dificultando las lecturas posteriores; pasados dos días, realizar recuentos preliminares en cualquier placa que se pueda distinguir las colonias.

(Continúa)



7.10 A los cinco días, seleccionar las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y contarlas sin el auxilio de lupas. A veces pueden desarrollarse colonias pequeñas, éstas son de bacterias acidófilas y, por tanto, deben excluirse del recuento. Las colonias de levaduras deben ser comprobadas por examen microscópico

7.11 Contar las colonias de mohos y levaduras en conjunto o separadamente. Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra.

7.12 Cálculos

7.12.1 *Cálculo del número (N) de unidades propagadoras (UP) de mohos y/o levaduras por centímetro cúbico ó gramo de muestra.* Calcular según la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1m_2)d}$$

Donde:

$\sum C$ = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegidas;

n_1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo 10^{-2} ;

V = volumen del inóculo sembrado en cada placa.

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{Volumen sembrado} &= 1 \text{ cm}^3 \\ \text{Dilución } 10^{-2} &= 83 \text{ y } 97 \text{ colonias} \\ \text{Dilución } 10^{-3} &= 33 \text{ y } 28 \text{ colonias} \\ \text{Número} &= \frac{83 + 97 + 33 + 28}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \\ &= \frac{241}{0,022} \\ &= 10\,954 \text{ expresado como } 1,1 \times 10^4 \end{aligned}$$

7.12.2 Redondeo. El valor obtenido redondear a dos cifras significativas de la siguiente manera (NTE INEN 52):

7.12.2.1 Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menor de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 553 000, redondeado a 550 000 y expresar como $5,5 \times 10^5$. Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito; por ejemplo, si el valor obtenido fue 10 954, redondearlo a 11 000 y expresar $1,1 \times 10^4$.

(Continúa)



7.12.2.2 Si el tercer dígito empezando por la izquierda es cinco y es seguido de, por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros a los restantes. Por ejemplo, si el valor obtenido fue 31 554, redondearlo a 32 000 y expresar como $3,2 \times 10^4$. Si el tercer dígito es cinco y no es seguido de otro (s) dígito (s) ó lo es únicamente por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si éste es impar; si es par ó cero conservarlo inalterado, ejemplo: 235 redondear a 240 y expresar como $2,4 \times 10^2$, 24 500 redondear a 24 000 y expresar como $2,4 \times 10^4$.

7.12.3 Presentación de resultados

7.12.3.1 Presentar el resultado como número, N, de unidades propagadoras UP de mohos y/o levaduras /cm³ ó g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^x (x es la respectiva potencia de 10). Las cifras significativas corresponden al primero y segundo dígitos (empezando por la izquierda) del número de las colonias calculadas (7.12.1).

7.12.3.2 Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la suspensión 10⁻¹, presentar como número estimado (N_E), de la siguiente forma:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ ó g} = < 1,0 \times 10^1$$

7.12.3.3 Si no hay desarrollo de colonias en las placas sembradas con 1 cm³ de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el resultado de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 = < 1,0 \times 10^0$$

7.12.3.4 Si todas las placas sembradas presentan más de 150 colonias, calcular el resultado a partir de las placas sembradas con la dilución más alta y expresar de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ ó g} = > \text{al valor obtenido } x^{-f}$$

f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra).

Indicar entre paréntesis la dilución utilizada. Este resultado sirve como guía para decidir el número de diluciones que se han de realizar en ensayos posteriores y, la decisión de aceptación o rechazo de una partida de alimentos debe basarse solo en valores N.

8. PRECISIÓN DEL MÉTODO

8.1 Repetibilidad del recuento de colonias y error personal.

8.1.1 Los resultados obtenidos por la misma persona al contar por segunda vez las colonias de una misma placa, no deben variar en más del 5% y del 10% cuando es realizado por otra persona.

8.1.2 Por razones estadísticas, el intervalo de confianza para este método varía, en el 95% de los casos, desde $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$. En la práctica, es posible observar variaciones mayores, especialmente entre resultados obtenidos por diferentes analistas.

(Continúa)



9. INFORME DEL ENSAYO

9.1 En el Informe del ensayo indicar la norma de referencia, la temperatura de incubación, los resultados obtenidos, todas las condiciones operativas no especificadas en esta norma o aquellas consideradas como opcionales y los incidentes que puedan haber influenciado en el resultado. Además, se debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra

(Continua)

**Anexo 3****Hoja de recolección de muestra**

DATOS DE RECOLECCION DE LA MUESTRA		
Identificación de la muestra:		
Muestra N°:	Fecha y hora de la toma:	
Registro Sanitario		
Fecha de caducidad	N° de lote	
Marca Comercial		
Fábrica		
Dirección del lugar de recolección:		
CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS		
Aspecto	Color	Olor
Consistencia	Sabor	
CONDICIONES DE TRANSPORTE		
Al ambiente:	Refrigerada	Congelada
Temperatura a la hora de la toma:		
Tipo de envase:		
Defectos del envase:		
Fecha y hora de la recepción en el laboratorio:		
Observaciones y datos iniciales:		

Anexo 4
Tablas de datos y resultados
Tabla 1. Tabla de diluciones y resultados para aerobios mesófilos del sistema A.

SISTEMA DE REFRIGERACIÓN "A"						
AEROBIOS MESOFILOS						
	DILUCIÓN		10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	RESULTADO (UFC/g)
	CEBOLLA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	228	40	4
MUESTRA 2			MNP	305	102	Incontable
7 DÍAS		MUESTRA 1	MNP	147	55	2,5E+04
		MUESTRA 2	22	7	2	Incontable
15 DÍAS		MUESTRA 1	MNP	285	45	2,6E+04
		MUESTRA 2	192	23	8	Incontable
ESPINACA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	115	10	1	1,2E+04
		MUESTRA 2	109	7	1	1,1E+04
	7 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	386	76	1,7E+04
		MUESTRA 2	MNP	MNP	70	1,5E+04
	15 DÍAS	MUESTRA 1	252	88	1	2,1E+04
		MUESTRA 2	MNP	144	12	1,8E+04
LECHUGA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	MNP	99	5	9,9E+05
		MUESTRA 2	MNP	89	8	9,8E+05
	7 DÍAS	MUESTRA 1	65	34	10	1,5E+06
		MUESTRA 2	MNP	225	38	2,5E+06
	15 DÍAS	MUESTRA 1	164	11	2	Incontable
		MUESTRA 2	120	6	4	Incontable

Fuente: (ORELLANA, y otros, 2014)

Tabla 2. Tabla de diluciones y resultados para mohos y levaduras del sistema A.

SISTEMA DE REFRIGERACION "A"						
MOHOS Y LEVADURAS						
	DILUCIÓN		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	RESULTADO (UP/g)
	CEBOLLA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	118	20	6
MUESTRA 2			MNP	149	75	2,2E+07
7 DÍAS		MUESTRA 1	MNP	MNP	MNP	1,3E+04
		MUESTRA 2	131	11	2	Incontable
15 DÍAS		MUESTRA 1	MNP	143	29	3,4E+05
		MUESTRA 2	188	58	21	Incontable
ESPINACA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	MNP	31	3	3,1E+05
		MUESTRA 2	MNP	36	7	3,6E+05
	7 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	296	47	4,1E+05
		MUESTRA 2	MNP	57	29	8,5E+05
	15 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	228	68	4,7E+05
		MUESTRA 2	MNP	149	48	Incontable
LECHUGA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	MNP	103	8	1,0E+06
		MUESTRA 2	MNP	MNP	90	Incontable
	7 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	136	74	Incontable
		MUESTRA 2	MNP	257	82	Incontable
	15 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	MNP	56	Incontable
		MUESTRA 2	MNP	103	8	Incontable

Fuente: (ORELLANA, y otros, 2014)

Tabla 3. Tabla de diluciones y resultados para aerobios mesófilos del sistema B.

SISTEMA DE REFRIGERACION "B"						
AEROBIOS MESOFILOS						
	DILUCIÓN		10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	RESULTADO (UFC/g)
	CEBOLLA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	252	18	2
MUESTRA 2			460	84	9	8,4E+05
7 DÍAS		MUESTRA 1	8	1	0	3,2E+05
		MUESTRA 2	MNP	184	18	8,4E+05
15 DÍAS		MUESTRA 1	MNP	206	28	3,5E+05
		MUESTRA 2	387	21	12	8,6E+05
ESPINACA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	128	9	3	1,3E+04
		MUESTRA 2	168	21	3	1,7E+04
	7 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	MNP	66	1,8E+04
		MUESTRA 2	MNP	MNP	74	2,5E+04
	15 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	213	129	2,2E+04
		MUESTRA 2	MNP	344	23	3,0E+04
LECHUGA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	MNP	142	16	1,6E+06
		MUESTRA 2	348	72	22	9,4E+05
	7 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	280	57	1,7E+06
		MUESTRA 2	MNP	189	105	1,3E+06
	15 DÍAS	MUESTRA 1	406	172	109	1,9E+06
		MUESTRA 2	MNP	44	4	1,4E+06

Fuente: (ORELLANA, y otros, 2014)

Tabla 4. Tabla de diluciones y resultados para mohos y levaduras del sistema B.

SISTEMA DE REFRIGERACION "B"						
MOHOS Y LEVADURAS						
CEBOLLA	DILUCIÓN		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	RESULTADO (UP/g)
	CEBOLLA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	272	49	8
MUESTRA 2			MNP	43	5	4,3E+05
7 DÍAS		MUESTRA 1	47	5	1	2,9E+04
		MUESTRA 2	MNP	92	11	4,3E+05
15 DÍAS		MUESTRA 1	MNP	100	6	5,1E+05
		MUESTRA 2	MNP	146	35	Incontable
ESPINACA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	298	35	0	3,2E+03
		MUESTRA 2	287	37	2	3,7E+05
	7 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	148	65	4,9E+05
		MUESTRA 2	MNP	244	173	6,5E+05
	15 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	MNP	284	5,5E+05
		MUESTRA 2	MNP	MNP	294	7,6E+05
LECHUGA	TIEMPO 0	MUESTRA 1	MNP	126	44	1,7E+06
		MUESTRA 2	286	61	14	7,5E+05
	7 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	143	63	Incontables
		MUESTRA 2	MNP	MNP	194	1,6E+06
	15 DÍAS	MUESTRA 1	MNP	MNP	171	Incontables
		MUESTRA 2	MNP	MNP	90	2,0E+06

Anexo 5

Imágenes de colonias obtenidas en el laboratorio

Aerobios Mesófilos

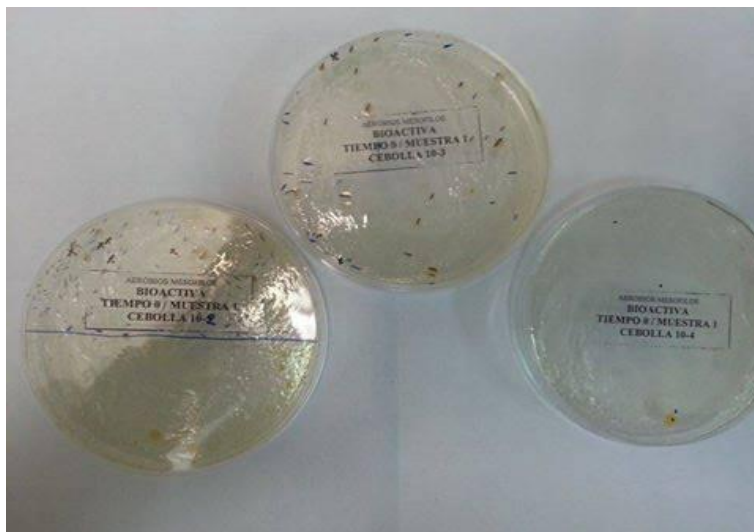


Gráfico 1. Colonias de aerobios mesófilos al tiempo 0.

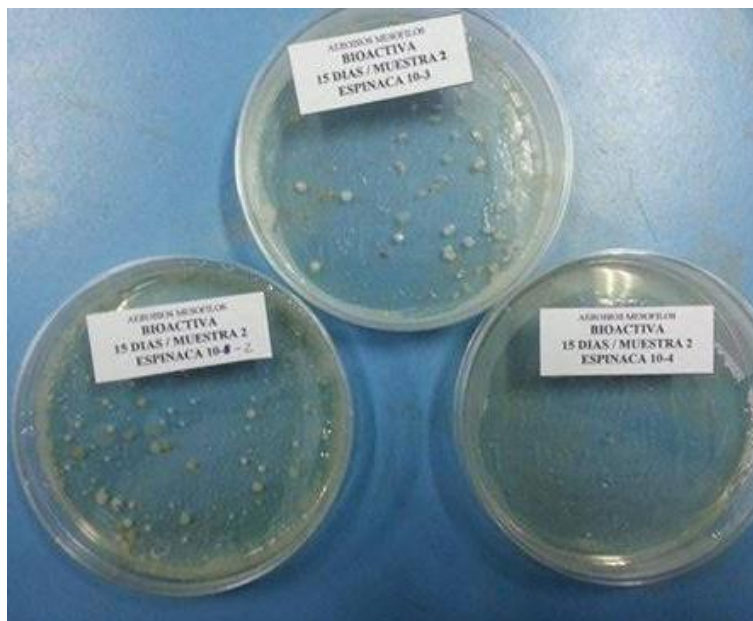


Gráfico 2. Colonias de aerobios mesófilos al tiempo 15.

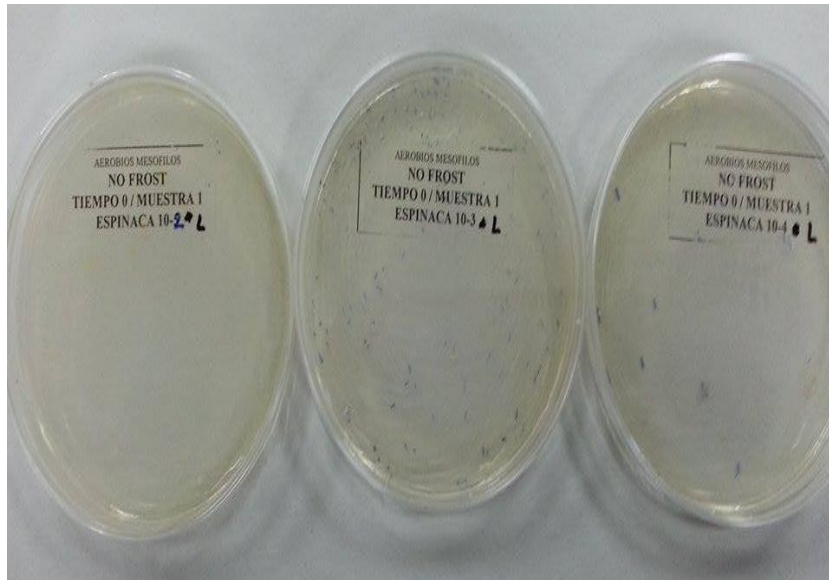


Gráfico 3. Colonias de aerobios mesófilos al tiempo 0.

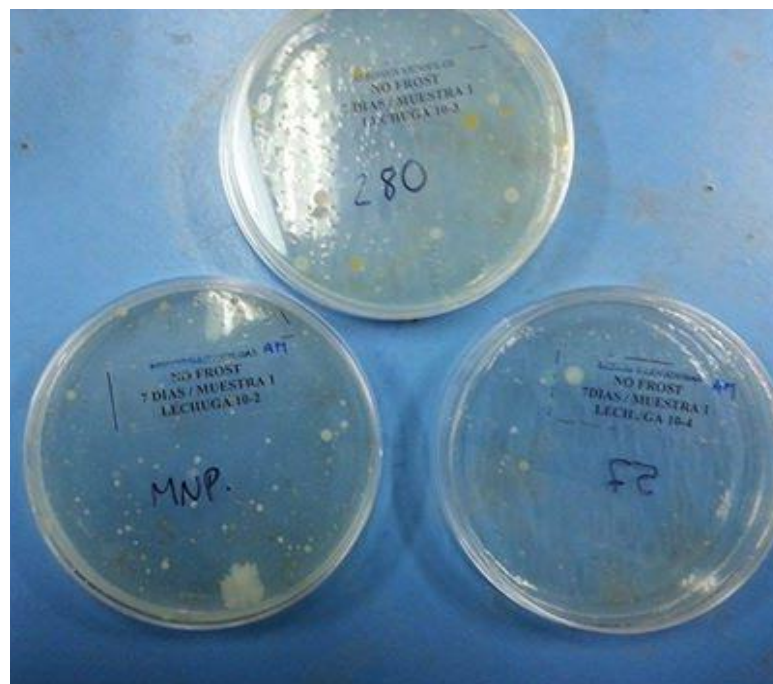


Gráfico 4. Colonias de aerobios mesófilos en tiempo 7.

Mohos y Levaduras

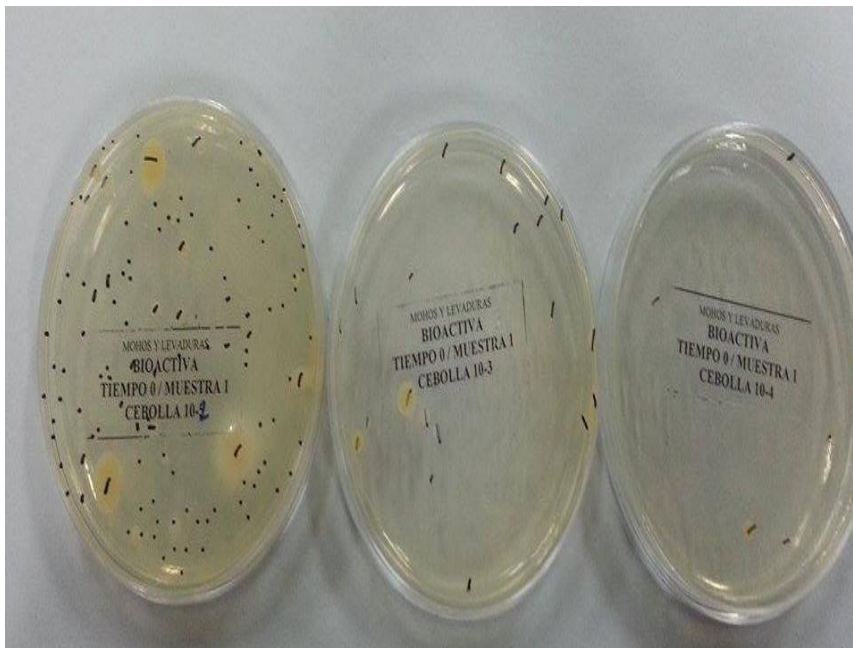


Grafico 5. Colonias de mohos y levaduras en tiempo 0.

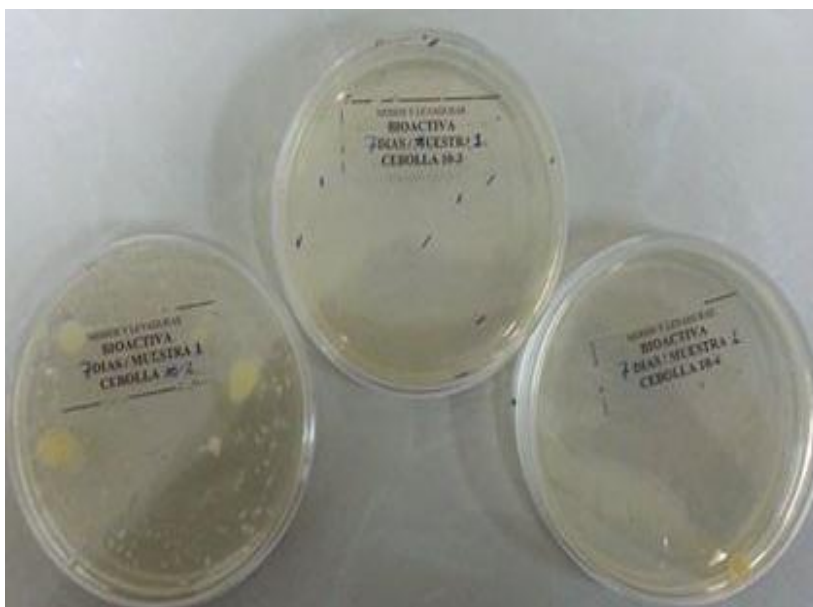


Grafico 6. Colonias de mohos y levaduras en tiempo.



Gráfico 7. Colonias de mohos y levaduras en tiempo 7.

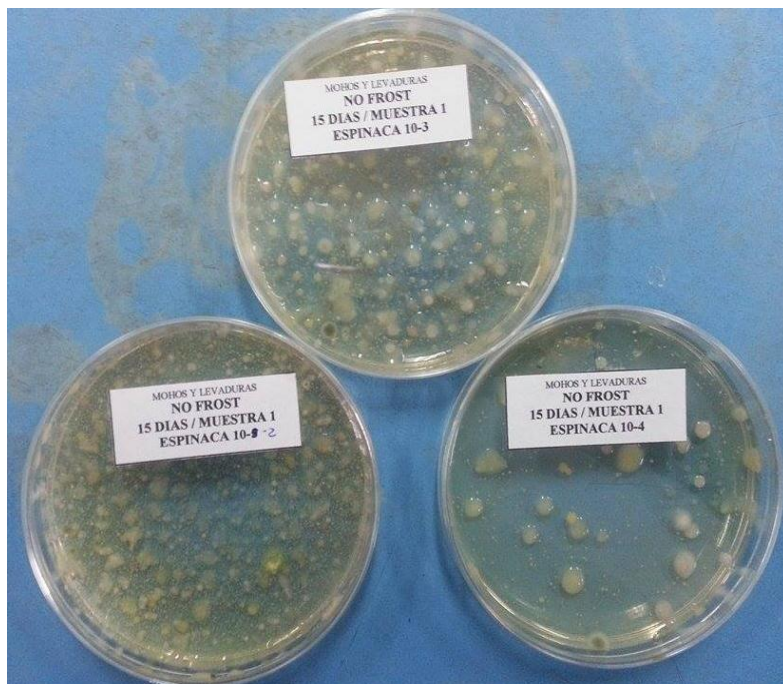


Gráfico 8. Colonias de mohos y levaduras en tiempo 15.