

**Desarrollo de un procedimiento para elaborar
un control interno de calidad para la
enumeración de grupos indicadores en el
Laboratorio de Microbiología de Alimentos
de Zamorano**

Oscar Alfredo Mich de León

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Desarrollo de un procedimiento para elaborar
un control interno de calidad para la
enumeración de grupos indicadores en el
Laboratorio de Microbiología de Alimentos
de Zamorano**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Oscar Alfredo Mich de León

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Desarrollo de un procedimiento para elaborar un control interno de calidad para la enumeración de grupos indicadores en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano

Oscar Alfredo Mich de León

Resumen. El sistema de acreditación de la norma ISO 17025:2005 certificado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ), recomienda el uso de un sistema de control interno de calidad para evaluar periódicamente la precisión y exactitud de los resultados. El objetivo del proyecto fue desarrollar un procedimiento para preparar un inóculo seco (IS) de *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922; determinar su estabilidad, homogeneidad y porcentaje de recuperación (PR) en tres alimentos: leche entera pasteurizada, vegetales mixtos enlatados y harina de avena esterilizada. Para la estabilidad se utilizó Bloques Completos al Azar (BCA) con medidas repetidas en el tiempo en los días de almacenamiento 0, 9, 20, 30 y 60; a temperatura ambiente (24.66 ± 0.47 °C). Tres analistas evaluaron la homogeneidad por triplicado y determinaron el valor asignado de cada IS. En el PR se utilizó BCA con un arreglo factorial de 3×3 , tres analistas y tres alimentos; se determinó el valor z de los resultados. *Bacillus* sp., y *Escherichia coli* fueron estables durante 60 días (reducción < 1 log UFC/g). El valor asignado para *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* fue de 7.94 ± 0.29 , 6.28 ± 2.09 y 8.45 ± 0.47 Log UFC/g; respectivamente. El PR en alimentos fue satisfactorio para *Bacillus* sp. ($105.92 \pm 4.30\%$) y *Escherichia coli* ($100.99 \pm 7.50\%$). Se recomienda determinar el tiempo de secado óptimo para el IS e implementar este sistema en el LMAZ para la evaluación periódica de los resultados.

Palabras clave: Estabilidad, inóculo seco, muestra control, norma ISO 17025:2005.

Abstract. The system of accreditation of the Standard ISO 17025:2005 of the Food Microbiology Laboratory of Zamorano (LMAZ), recommends the use of Internal Quality Control System to evaluate precision and accuracy of the results. The aim of this project was to develop a dry inoculum (IS) of *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922; determine its stability, homogeneity and percentage of recovery (PR) at three foods: pasteurized whole milk, canned mixed vegetables and oatmeal. A Randomized Complete Block design (BCA) with five repeated measures over time (0, 9, 20, 30 and 60 days) was used for stability, stored at room temperature (24.66 ± 0.47 °C). Three analysts assessed homogeneity at triplicate and were determinate assigned value of each IS. For the PR, A BCA with a factorial design of 3×3 , three analysts and three foods, and the z value of the measures were determinated. *Bacillus* sp., y *Escherichia coli* were stable during 60 days (reduction < 1 log UFC/g). Assigned value for *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia* were of 7.94 ± 0.29 , 6.28 ± 2.09 y 8.45 ± 0.47 Log UFC/g; respectively. PR in foods were satisfactory to *Bacillus* sp. ($105.92 \pm 4.30\%$) y *Escherichia coli* ($100.99 \pm 7.50\%$). It is recommended determinate the optimum time for dry the IS and implement this system at the LMAZ for test of the results.

Keys words: Control sample, dry inoculum, stability, standard ISO 17025:2005.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	19
5. RECOMENDACIONES	20
6. LITERATURA CITADA	21
7. ANEXOS	23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Carga microbiana de <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 monitoreada 60 días después de su elaboración.	10
2. Valor asignado del talco inoculado con <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter aerogenes</i> o <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	12
3. Determinación del valor z y porcentaje de recuperación de <i>Bacillus</i> sp. En vegetales, harina y leche.	15
4. Determinación del valor z y porcentaje de recuperación de <i>Enterobacter aerogenes</i> en vegetales, harina y leche.	16
5. Determinación del valor z y porcentaje de recuperación de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en vegetales, harina y leche.	17
6. Clasificación del valor z para los resultados obtenidos en los alimentos inoculados con cada microorganismo.	18
7. Incertidumbre expandida de las mediciones de los alimentos inoculados con cada uno de los microorganismos.	18
Figuras	Página
1. Flujo de proceso para la elaboración del talco inoculado.	5
2. Logaritmo promedio recuperado por los analistas y valor asignado de cada microorganismo.	14
Anexos	Página
1. Análisis estadísticos para los resultados de estabilidad de los talcos desarrollados.	23
2. Análisis estadísticos para los resultados de homogeneidad de los talcos desarrollados.	23
3. Analistas que participaron en el desarrollo de la muestra control.	23
4. Análisis estadísticos para los resultados de inoculación y recuperación de la carga microbiana en alimentos.	24
5. Listado de los medios.	24
6. Listado de materiales.	24
7. Listado del equipo empleado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ).	25
8. Distribución de las mediciones en los alimentos inoculados con <i>Bacillus</i> sp. organizados por analista.	25

Anexos	Página
9. Distribución de las mediciones en los alimentos inoculados con <i>Enterobacter aerogenes</i> organizados por analista.....	26
10. Distribución de las mediciones en los alimentos inoculados con <i>Escherichia coli</i> organizados por analista.	26
11. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con <i>Bacillus</i> sp., clasificados por tipo de alimento	27
12. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con <i>Bacillus</i> sp., clasificados por analista.	27
13. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con <i>Enterobacter aerogenes</i> , clasificados por tipo de alimento	27
14. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con <i>Enterobacter aerogenes</i> , clasificados por analista.	28
15. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con <i>Escherichia coli</i> , clasificados por tipo de alimento.....	28
16. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con <i>Escherichia coli</i> , clasificados por analista.....	28
17. Formato instructivo para el desarrollo de muestras control en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LAMZ).	29

1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de ensayos microbiológicos generan resultados que son empleados en la toma de decisiones, por ejemplo para aceptar o rechazar el ingreso de un lote de producción de un determinado producto a un país. Por este motivo, se debe garantizar la validez de los resultados en términos de exactitud, repetibilidad y reproducibilidad. Las actividades que permiten controlar, monitorear y mejorar los resultados; reducen la probabilidad de generar información errónea. Dentro de estas actividades se encuentran: monitoreo del ambiente, capacitaciones, calibraciones, verificaciones, evaluaciones de calidad y control interno. Este último es la calendarización de controles periódicos que permiten demostrar a entidades nacionales e internacionales el control de la variabilidad de los resultados (Cuestas 2013).

El sistema de control interno evalúa el desempeño del laboratorio, el cual incluye el monitoreo de los estándares de calidad, identificar las necesidades de capacitación del personal, la calibración de equipos y la comparación de diferentes métodos en la cuantificación o determinación de un microorganismo en una determinada muestra (Logical standards 2016). Todo esto con la finalidad de demostrar a entes reguladores que el laboratorio se encuentra en la competencia de generar resultados. Este sistema permitirá al encargado y operador del laboratorio monitorear de forma continua la operación del laboratorio y los resultados obtenidos en las mediciones, además de determinar mediante análisis estadísticos si estos resultados son lo suficientemente confiables como para ser aceptados en base a la exactitud y precisión de los mismos (Taverniers *et al.* 2004).

Dentro de las técnicas que abarca el control interno se encuentran las siguientes: (i) Uso de materiales de referencia, consiste en el uso de un control positivo, negativo o de muestras control para la verificación de la medición; (ii) ensayos intralaboratorios, empleadas para evaluar el desempeño de los analistas en términos de reproducibilidad y repetibilidad en las mediciones; (iii) los ensayos de aptitud interlaboratorio, la cual es una herramienta para la evaluación externa de la calidad, desarrollada por un proveedor, que distribuye a diferentes laboratorios con la finalidad de comparar resultados en base a un valor asignado como referencia, demostrando de esta forma la veracidad y precisión de los resultados (Cuestas 2013).

Una de las principales diferencias entre las pruebas intralaboratorio e interlaboratorio es que en la última se refiere a la participación de un conjunto de laboratorios, los cuales tienen un proveedor en común que distribuye y provee la muestra, comparando los resultados con un valor asignado específico. En esta prueba los laboratorios participantes deben demostrar que se encuentra en la capacidad y competencia para la medición (Gust 2016). Para las pruebas intralaboratorio es ideal tener cultivos de bacterias activas y viables a lo largo del

tiempo, las cuales entran en un estado de latencia, e incrementan su viabilidad durante el tiempo. Al finalizar el periodo de preservación, las bacterias pueden ser reactivadas nuevamente al exponerse a las condiciones óptimas del microorganismo en estudio (Liu *et al.* 2003).

Para desarrollar cultivos de bacterias estables a lo largo del tiempo, se necesitan métodos de preservación efectivos, dentro de los cuales se encuentran: cultivos congelados y secos-refrigerados, los cuales tienen buena estabilidad. Sin embargo, son más costosos y requieren de técnicas y/o equipos más complejos (Liu *et al.* 2003). Otros métodos alternativos de preservación son: los inóculos líquidos y los inóculos secos. Se recomienda usar el inóculo líquido en alimentos con alto contenido de humedad, pero no en alimentos o ingredientes de baja humedad porque adiciona agua al producto, causa adherencia, agrupamiento de partículas e inestabilidad en la carga microbiana; por lo tanto, afecta la determinación de la carga microbiana (Hoffmans y Fung 1992). Generalmente los materiales inertes utilizados para transportar, mantener e inocular los microorganismos son: arena, tiza y talco. Después de agregar el microorganismo, este material inerte debe ser secado (Blessington *et al.* 2013). El proceso de secado es un método de preservación efectiva de alimentos utilizada desde la antigüedad, pero también es una manera efectiva de mantener latente la carga bacteriana del alimento (Hoffmans y Fung 1992).

En los últimos cinco años en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) se han verificado metodologías para la determinación, enumeración y confirmación de ciertos microorganismos como *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias. Las cuales brindaron resultados satisfactorios en el proceso de verificación, recomendando el uso de la metodología establecida y la participación en pruebas interlaboratorios (Cuellar 2015). Por otro lado, también se recomienda evaluar periódicamente los resultados utilizando la misma metodología pero con la integración de un control de calidad que permita mantener el proceso de acreditación del laboratorio (Párraga y Pilla 2013).

Anualmente el LMAZ participa en pruebas interlaboratorio para asegurar la calidad de las mediciones y resultados obtenidos. Esta medición crea dependencia del laboratorio al laboratorio proveedor, además de su costo y fecha específica para la participación de la misma. Sin embargo, al garantizar la calidad de los resultados con el sistema de control interno, la prueba interlaboratorio se programaría cada cuatro años porque con este sistema de control se extiende la validación y permitirá la mejora continua de los procesos y mediciones. Los objetivos de este estudio son:

- Establecer un procedimiento para la preparación de muestras control para la cuantificación de *Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.
- Evaluar la estabilidad microbiológica de la muestra control interno hasta el día 60.
- Evaluar el porcentaje de recuperación del inóculo seco al agregarse en harina de avena, leche pasteurizada y vegetales mixtos enlatados.
- Determinar la exactitud y precisión del porcentaje de recuperación del inóculo seco con *Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización.

El estudio se desarrolló principalmente en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ), en el Departamento de Agroindustria Alimentaria en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La institución se ubica en el km 30 en la carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yeguaré, Francisco Morazán, Honduras.

Talco.

Es un material inerte con pH neutro y no tiene efecto en la viabilidad de los microorganismos, por lo que es ideal como vehículo de transporte. Otros materiales que pueden ser utilizados para transportar y mantener viables a los microorganismos son: Arena y tiza. En este proyecto no se usó arena, porque el tamaño de partícula es más grande que el talco y dificulta la distribución en los alimentos. La tiza posee características similares al talco, ambos son materiales blandos que incluyen en su composición carbonato de calcio y trazas de otros minerales, pero la tiza se encuentra en una estructura sólida y debe ser pulverizada, a diferencia del talco que es fácil de distribuir y separar (Obaidat y Fung 2005).

Esterilización del talco.

Se usó talco de billar marca Silver Cup Billiard Chalk® y se distribuyó en una capa de 5 a 10 mm en un recipiente de vidrio de 20 × 20 × 5 cm Pyrex®. Luego se colocó en el horno a 140 °C por 4 horas, finalizado el tiempo se dejó reposar por 3 horas. Se verificó la esterilidad del talco con una siembra en Agar Soya Trypticase (AST) y se almacenó en bolsas de plástico Whirl-pack® (Enache *et al.* 2015).

Preparación del inóculo.

De la colección de cepas de referencia del LMAZ, se trabajó con *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922. Se aislaron colonias típicas aisladas de los microorganismos por estriado en placa con AST, luego con un asa bacteriológica estéril se seleccionó una colonia típica aislada del microorganismo y se inoculó en un tubo de ensayo con 10 mL de Caldo Soya Trypticase (CST). Se incubaron los tubos de ensayo a 35 °C por 24 ± 2 horas, finalizado el tiempo se preparan cinco platos Petri con AST y a cada uno se les agregó 1 mL de la solución bacteriana formada en el CST. Se incubaron los platos Petri a 35 °C por 24 ± 2 horas (Blessington *et al.* 2013)

Cosecha e inoculación del talco.

Se cosechó la capa bacteriana formada en los platos con AST por medio de la adición de 6 mL de agua peptonada al 0.1% (AP) a cada plato Petri y un raspado suave en la superficie del agar con un varilla de vidrio estéril en forma de L (Almond Board of California 2014). Luego el inóculo líquido formado de cada plato se colectó con pipetas estériles y por los cinco platos Petri se obtuvieron 25 a 30 mL. Se determinó la carga microbiana del inóculo líquido a través de diluciones en AP al 0.1% y siembras en AST.

Se pesaron 25 g del talco esterilizado en un recipiente de vidrio estéril (diámetro de 150 mm) y se agregaron 18 mL del inóculo líquido. Se preparó un control negativo, 25 g de talco y 18 mL de AP al 0.1%, para monitorear la actividad de agua en el talco. (Enache *et al.* 2015). El talco e inóculo se mezclaron manualmente con una espátula estéril a razón de 60 movimientos circulares durante 5 minutos hasta generar una pasta y se distribuyó en una capa de 10 a 5 mm. Se colocó una gasa estéril sobre el recipiente con la precaución de no contaminar la pasta y se incubó a 35 °C por 24 horas \pm 2 horas.

Se secó por 24 horas más a temperatura ambiente. Seguidamente se tamizó el talco con un colador de metal estéril (0.9 x 0.9 mm) y se almacenó en frascos de plástico con tapa, estériles, sellándose herméticamente con Parafilm y se ubicó en un cuarto a temperatura ambiente (Enache *et al.* 2015). El procedimiento para desarrollar el control interno de calidad, se encuentra resumido en la figura 1. Se determinó la actividad de agua inicial del talco por el método AOAC 978.18 a través del uso del Aqualab en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ).

Determinación de la estabilidad del inóculo.

La estabilidad en una muestra, se refiere al mantenimiento de las características del microorganismo y de su carga microbiana en el transcurso de un período de tiempo determinado (Jarvis *et al.* 2007). Se evaluó la estabilidad de tres microorganismos inoculados por separado en talco a temperatura ambiente.

En cada medición de la carga microbiana se trabajó un factor de dilución 1 en 100 (10^{-2}), para esto se depositó 0.1 g del talco inoculado en un tubo de ensayo estéril y se adicionaron 9.9 mL agua peptonada al 0.1%. Seguidamente se dejó hidratar la muestra por 15 minutos y al finalizar el tiempo se homogenizó la dilución en el vortex por 7 segundos. Luego con una pipeta estéril se tomó 0.1 mL de dilución 10^{-2} y se depositó en un tubo con 9.9 mL de agua peptonada al 0.1% (Dilución 10^{-4}), se repitió este factor de dilución hasta llegar a la dilución 10^{-8} . Las diluciones se sembraron por el método de vaciado en placa con AST, luego se homogenizó, se dejó solidificar y se incubó en posición invertida a 35 °C por 24 horas \pm 2 horas. Finalizado el tiempo de incubación se verificó el crecimiento del microorganismo, se contabilizaron las colonias en el factor de dilución que se encontrará en un rango de 25 a 250 unidades formadoras de colonia (UFC)/g y se transformaron los resultados a Log UFC/g.

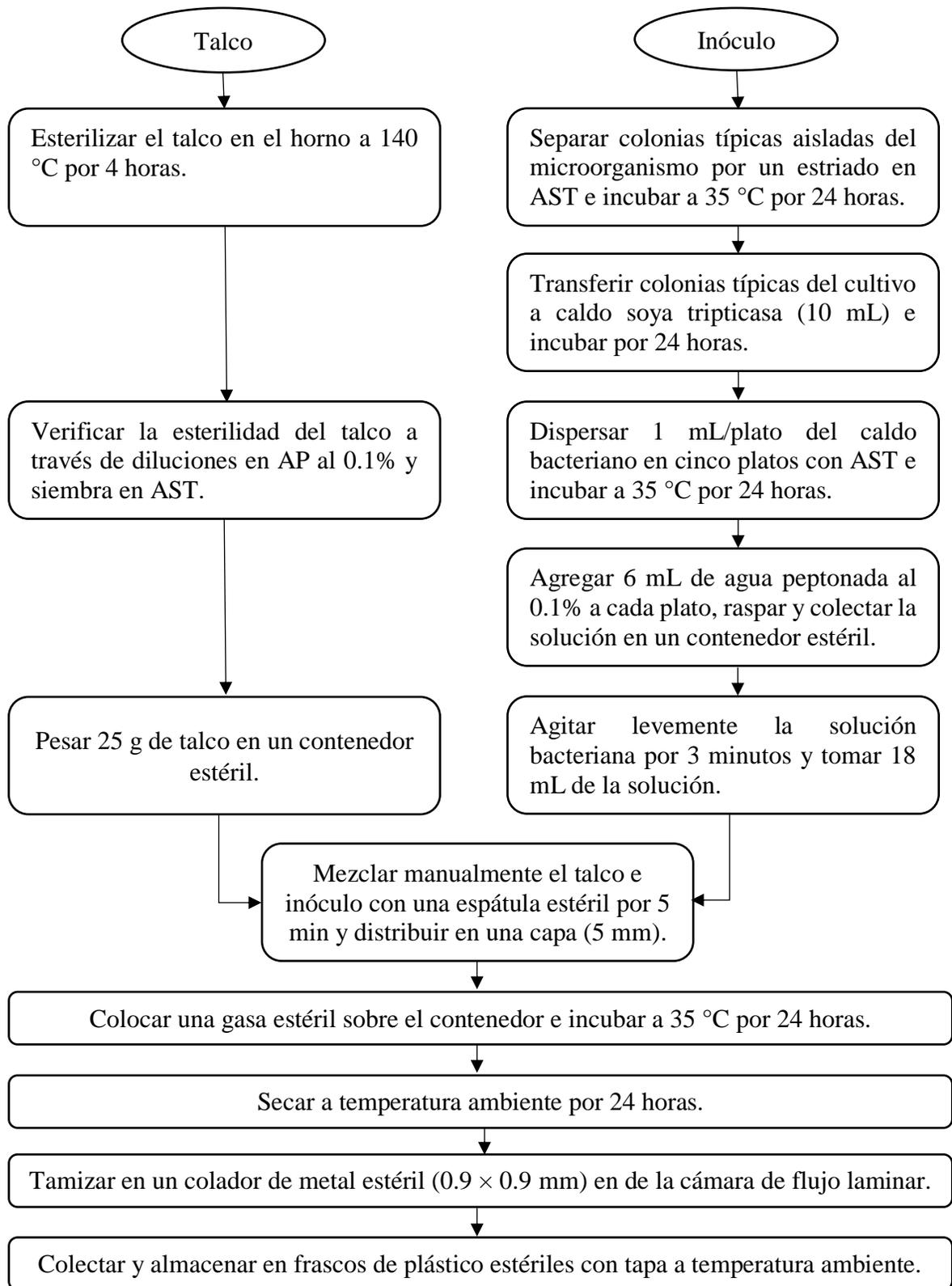


Figura 1. Flujo de proceso para la elaboración del talco inoculado.

Diseño experimental.

Para cada microorganismo (*Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*) se usó un diseño de Bloques Completos al Azar o Bloques Incompletos al Azar con medidas repetidas en el tiempo, en el cual se establecieron tres bloques y cinco medidas repetidas en el tiempo (0, 9, 20, 30 y 60 días); para un total de 45 mediciones de la carga microbiana.

Análisis estadístico.

Se usó el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.4[®]) y se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk ($P < 0.05$) para comprobar que los resultados de cada microorganismo poseen una distribución normal. Seguidamente se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existe diferencia estadística de la carga microbiana en el tiempo. Se aplicó una separación de medias Duncan. El grado de significancia al evaluar esta variable fue de 95% ($P < 0.05$).

Determinación de la homogeneidad y valor asignado.

Desarrollado el talco inoculado, se determinó el promedio de la carga microbiana de cada uno de los microorganismos (*Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922) con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

En cada medición se pesó 0.1 g de talco inoculado con *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* o *Escherichia coli* ATCC 25922 en un tubo de ensayo estéril y luego se le proporcionaron las muestras identificadas al analista. Los analistas adicionaron 9.9 mL de agua peptonada al 0.1% a cada muestra y luego las dejaron reposar por 15 minutos. Finalizado el tiempo se homogenizaron en el vortex por 7 segundos, se diluyeron en un factor de dilución 1 en 100 en agua peptonada al 0.1% hasta la dilución 10^{-6} y se sembraron las diluciones 10^{-4} y 10^{-6} por vaciado en placa con AST. Finalmente se homogenizaron las placas, se dejó solidificar el agar, se incubó cada plato Petri en posición invertida a 35 °C por 24 horas \pm 2 horas y cada analista contó y registró el conteo de la medición en UFC/ g, después se transformaron los datos a Log UFC/g para el análisis estadístico.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar y Bloques Incompletos al Azar según el microorganismo (*Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922), con un arreglo factorial de 3×3 , tres inóculos secos y tres bloques. En el arreglo factorial las muestras fueron procesadas por tres analistas (1, 2 y 3). Cada analista analizó por triplicado cada talco inoculado y con los tres bloques se genera un total de 81 unidades experimentales.

Análisis estadístico.

Se usó el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.4[®]) y se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk ($P < 0.05$) para comprobar que los resultados de cada uno de los tres microorganismos poseen una distribución normal. Después de verificar la prueba

de normalidad se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) para identificar si existe diferencia estadística entre los analistas, los bloques y la interacción de los mismos. Al detectarse diferencia estadística se aplicó una prueba de separación de medias Duncan. En el caso de encontrar diferencia estadística en la interacción, se aplicó el método de mínimos cuadrados (LS MEANS). Todas las pruebas poseen un grado de significancia del 95% ($P < 0.05$).

Inoculación y porcentaje de recuperación en alimentos.

Se seleccionaron tres matrices alimenticias, cada una con características físico-químicas diferentes, las cuales deben contener una carga microbiana baja. El límite máximo requerido en este estudio fue de <10 UFC/g (RTCA 2009).

Matrices alimenticias.

(i) Leche entera con 4% de grasa y procesada por temperaturas ultra altas, producto lácteo con alta actividad de agua; (ii) vegetales mixtos cocidos enlatados, alimento listo para consumo; (iii) harina de avena esterilizada, producto a base de granos básicos con baja actividad de agua 0.6 (Gurtler *et al.* 2014).

Esterilización de la harina de avena.

Se depositó la harina de avena en un recipiente de vidrio y se distribuyó en una capa de 10 mm, luego se ubicó en el horno a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cuatro horas. Se enfrió por dos horas y se almacenó el alimento en bolsas estériles Whirl-pack[®]. Seguidamente se verificó la esterilidad de la harina de avena, la leche entera pasteurizada y los vegetales mixtos enlatados. Se pesaron 10 g del alimento en una bolsa estéril y se le adicionaron 90 mL de buffer fosfato, se dejó reposar la muestra por 15 minutos y luego se homogenizó por 2 minutos en el masticador. Se tomó 1 mL de la dilución y se depositó en un plato Petri, se sembró por vaciado en placa con AST. Se homogenizó y se dejó solidificar el agar, luego se incubó en posición invertida a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas \pm 2 horas y al día siguiente se verificó que la carga bacteriana se encontrará <10 UFC/ (RTCA 2009).

Inoculación de alimentos y recuperación de los microorganismos.

Se pesó 0.1 g del talco inoculado con *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* o *Escherichia coli* ATCC 25922 en bolsas estériles. Seguidamente se pesaron 10 g de harina de avena, leche entera o vegetales mixtos en las bolsas que contienen el talco inoculado. Cada uno de los tres analistas procesó sus muestras, es decir que por bloque se inocularon 27 muestras (nueve muestras por analista). Después se adicionaron 90 mL de buffer fosfato a cada una de las muestras y se dejaron reposar por 15 minutos. Luego se homogenizó la muestra por 2 minutos en el masticador, se diluyeron las muestras por medio de diluciones decimales y se sembraron en AST por vaciado en placa las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se homogenizó y se dejó solidificar el agar, después se incubó cada una de las placas en posición invertida a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas \pm 2 horas. Finalizado el tiempo, cada analista contó sus placas y registró los resultados de la carga microbiana recuperada en UFC/g, seguidamente los datos se transformaron a Log UFC/g.

Variables.

Los analistas recuperaron una carga microbiana de los alimentos inoculados, luego se evaluó el desempeño de las mediciones como parte del proceso de acreditación, principalmente la capacidad de medir del equipo, método y analista. Se evaluaron los siguientes parámetros:

Exactitud. Verifica que tan cercanos son los valores de los análisis microbiológicos en comparación al valor real del inóculo).

Precisión. Los resultados obtenidos son uniformes, es decir que se encuentran dentro de un rango asignado (± 3 desviaciones estándar) (Weissfeld 2010).

Porcentaje de recuperación.

Cuando se inocularon los alimentos con el talco inoculado de cada uno de los microorganismos, teóricamente se agregó una cantidad conocida de microorganismos; por lo tanto, el analista, el método y equipo en conjunto obtendrán un valor estimado cercano al valor asignado o real. Este se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{g}} \text{ recuperados} - \text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{g}} \text{ del alimento}}{\text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{g}} \text{ microorganismos inoculados}} \times 100 \quad [1]$$

(Obaidat y Fung 2005).

Valor z.

Este valor se obtiene cuando se divide la diferencia del valor cuantificado de la carga microbiana de las muestras en Log UFC/g y el valor asignado, entre la desviación estándar del valor asignado. Se expresa en unidades de desviación estándar y se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Valor } z = \frac{(x-X)}{SDI} \text{ donde;} \quad [2]$$

- x = El resultado reportado por el analista en el LAMZ
- X = Valor contenido en el inóculo seco.
- SDI = Desviación estándar del inóculo.

Interpretación del valor z. Este parámetro es específico para evaluaciones cuantitativas. Estos valores se interpretan de la siguiente manera:

- $|z| \leq 2.00$ -----→ Satisfactorio
- $2.00 < |z| < 3.00$ --→ Cuestionable
- $|z| \geq 3.00$ -----→ Insatisfactorio.

(Jarvis *et al.* 2007).

Incertidumbre expandida (Ur).

Este parámetro es un indicador cuantitativo de la variabilidad de los resultados, la cual debe ser tomada en cuenta para poder interpretar los datos obtenidos y generalmente es utilizado para poder validar procedimientos y métodos. Se estableció el criterio de incertidumbre expandida como parámetro de los resultados y se determinó con la siguiente formula:

$$Ur\% = 2 \times (RSD\%) \text{ donde; } [3]$$

- Ur% = Incertidumbre expandida, expresada en porcentaje.
- 2 = Constante establecida en base a un 95% de confiabilidad.
- RSD% = Desviación estándar relativa del inóculo, expresada en porcentaje.

(Weissfeld 2010).

Diseño experimental.

Para medir el porcentaje de recuperación en alimentos y el valor z se usó un diseño de Bloques Completos al Azar o Bloques Incompletos al Azar según el microorganismo (*Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922), con un arreglo factorial de 3×3 , con tres bloques. En el arreglo factorial se evaluaron tres matrices alimenticias (harina esterilizada, leche UHT (Ultra high temperature) y vegetales mixtos enlatados) y las muestras fueron procesadas por tres analistas (A1, A2 y A3); para un total de 81 unidades experimentales o mediciones.

Análisis estadístico.

Se analizaron los resultados con el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®) alimentos, microorganismos y analistas. Se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) para identificar si existe diferencia estadística entre los analistas, los bloques y la interacción de los mismos. En el caso de encontrar diferenciar estadística en la interacción, se aplicó el método de cuadrados mínimos (LS MEANS). Todas la pruebas poseen un grado de significancia del 95% ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estabilidad en el tiempo.

Al desarrollar el talco inoculado con bacterias, se usó el talco sin microorganismos (control negativo) para determinar la actividad de agua (A_w) inicial del talco, la cual se encontró en un promedio de 0.474 ± 0.008 . Se han reportado valores de actividad de agua de 0.460 ± 0.003 en talcos inoculados con *Salmonella tenesse*, los cuales se desarrollaron por adición de 18 mL de agua peptonada al 0.1% a 25 g de talco y fueron sometidos a un proceso de secado a 35 °C por 24 horas (Enache *et al.* 2015).

Un nivel de actividad de agua bajo permite mantener latente a *Bacillus sp.* porque necesita una A_w mínima de 0.92 para su crecimiento. *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922 necesitan un rango de A_w de 0.94 a 0.96 para su crecimiento y desarrollo, de esta forma se garantiza la cantidad de bacterias que se inoculó en el talco (Forsythe y Hayas 2007). Se analizó la carga inicial (fecha de elaboración del producto) de *Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922; las cuales fueron: 8.20, 7.43 y 8.65 Log UFC/ g, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Carga microbiana de *Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922 monitoreada 60 días después de su elaboración.

Tiempo (días)	Microorganismo (Log UFC/g)		
	<i>Bacillus sp.</i> ME± DE	<i>Enterobacter aerogenes</i> ME± DE	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ME± DE
0	8.20 ± 0.15 a	7.43 ± 1.26 a	8.65 ± 0.30 a
9	8.21 ± 0.18 a	5.43 ± 0.93 ab	8.74 ± 0.33 a
20	7.84 ± 0.29 a	5.14 ± 2.28 ab	8.24 ± 0.61 a
30	7.77 ± 0.31 a	4.13 ± 1.76 ab	8.44 ± 0.51 a
60	8.14 ± 0.06 a	2.86 ± 0.55 b	8.31 ± 0.31 a
CV (%)	2.63	33.45	5.13

ME: Media.

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

abc: Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

Un inóculo seco se considera estable si la tasa de disminución de la carga microbiana es <1 Log UFC/ g (Enache *et al.* 2015). En base al criterio establecido anteriormente, *Bacillus* sp. y *Escherichia coli* ATCC 25922 son estables durante un período de tiempo de 60 días a temperatura ambiente. El talco inoculado con *Enterobacter aerogenes* presenta una disminución de la carga microbiana mayor a un logaritmo durante los dos meses de evaluación, por lo tanto, no se considera estable bajo estas condiciones.

La estabilidad de un microorganismo está en función del metabolismo del mismo y de la actividad de agua del talco. La actividad de agua del talco es mínima 0.474 ± 0.008 . Sin embargo al encontrarse almacenado a temperatura ambiente, se acelera el metabolismo y los procesos biológicos lo que ocasiona una disminución en la carga microbiana, esta reducción se encuentra en un rango de 1 a 3 Log UFC/g (Obaidat y Fung 2005).

El coeficiente de variación puede encontrarse en valores extremos de $\pm 30\%$, esto va a estar en función del microorganismo, condiciones del laboratorio y método empleado para la muestra. Para *Bacillus cereus* el coeficiente de variación se encuentra en un rango de 3.1 a 10.5%, *Enterobacter aerogenes* en un rango de 6.4 a 19.0% y *Escherichia coli* de 4.4 a 11.2% (Jarvis *et al.* 2007). Estos rangos coinciden con los valores reportados en el estudio, por la posibilidad de valores extremos, además es virtualmente imposible determinar la concentración exacta de microorganismos de alguna muestra, sea esta artificial o natural; por este motivo se desarrollan valores asignados en materiales de referencia que son utilizados como control en los ensayos interlaboratorio (Lynne 2003).

La cantidad de células viables en el talco reportadas al finalizar el primer mes (Cuadro 1) son similares a los resultados de viabilidad reportados en Kansas State University. En esta investigación se determinó la concentración de microorganismos viables en 10 cultivos de bacterias, entre los cuales se encuentra: *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*. Los valores reportados son 8, 5.5 y 6.8 log UFC/ g respectivamente (Hoffmans y Fung 1993). En la investigación de Kansas State University se usó el medio infusión de corazón y cerebro como medio general para el crecimiento de los microorganismos, en lugar de agar soya tripticasa, además utilizaron tiza en lugar de talco y no proporcionaron un secado de 24 horas a 35°C , si no que secaron a esta temperatura hasta lograr eliminar el agua libre de la tiza; estas variables explican la diferencia de los resultados obtenidos.

Durante el proceso de secado se reduce la carga microbiana de los inóculos secos. En *Bacillus cereus*, normalmente se genera una reducción de 0.01 log UFC/g; *Escherichia coli* puede reducir hasta 2.06 log UFC/g y finalmente *Enterobacter aerogenes* hasta 2.44 Log UFC/g. Estos valores nos indican que *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* son más susceptibles a la temperaturas y tiempos programados durante el proceso de secado. Este factor permite justificar el coeficiente de variación que se genera en estos microorganismos durante el proceso de secado (Liu *et al.* 2003).

La metodología empleada para el desarrollo de los inóculos secos de estos microorganismos demuestra que fue efectiva en *Bacillus* sp. y *Escherichia coli*. Se ha demostrado que *Enterobacter aerogenes* es estable durante el tiempo; sin embargo, en estos estudio el proceso de secado solo se eliminó la cantidad de agua libre o agua que fue adicionada,

regresando al peso inicial de la tiza. A diferencia de la metodología empleada en este estudio, en el cual se utilizó un tiempo estándar de 24 horas a 35 °C; que el tiempo de secado sea mayor para remover la cantidad de agua libre tiene un efecto de reducción en la viabilidad de las células vegetativas porque ocurre un daño celular, además de la desnaturalización de enzimas y proteínas (Forsythe y Hayes 2007). Por este motivo *Bacillus cereus* no es tan afectado por ser un microorganismo con la capacidad de producir esporas como vía de preservación (Enache *et al.* 2015).

La resistencia a altas temperaturas se debe a las proteínas presentes en el microorganismo y es *Methylobacillus flagelatus* (KT) en presentar la proteína MFlag2012 que le proporciona esta característica. Se han identificado proteínas homologas presentes en la familia *Enterobacteriaceae*, en las siguientes especies: *Cronobacter sakazakii*, *C. Braakii*, *C. freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter vulneris*. Sin embargo, organismos como: *Enterobacter aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, *Citrobacter koseri* y *Escherichia coli* no presentan esta proteína. Esto demuestra la sensibilidad a la desecación presentada en *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922 (Williams *et al.* 2005).

Homogeneidad del producto.

Cada uno de los tres analistas determinó la carga microbiana del producto desarrollado (Talco inoculado) por triplicado para obtener el promedio y la desviación estándar de *Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valor asignado del talco inoculado con *Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes* o *Escherichia coli* ATCC 25922.

Microorganismo	Valor asignado en Log UFC/ g (Media ± DE)	Coefficiente de variación (%)
<i>Bacillus sp.</i>	7.94 ± 0.29	3.70
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6.28 ± 2.09	33.28
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8.45 ± 0.47	5.57

DE: Desviación estándar

En el caso de *Bacillus sp.* y *Escherichia coli* ATCC 25922 no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre analistas, ni en la interacción entre analista y bloque (pvalue > 0.005). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre bloques (pvalue < 0.05); esto nos indica que el diseño experimental utilizado fue correcto porque se logra bloquear el efecto ambiental durante la elaboración del inóculo y la gradiente en el nivel de la carga microbiana.

En el talco inoculado con *Enterobacter aerogenes* se encontró diferencia estadísticamente significativa entre analistas, bloques y la interacción de los mismos (pvalue < 0.05). Esta diferencia estadística se debe a la inestabilidad de este microorganismo bajo las condiciones

establecidas en el estudio (secado a 35 °C por 24 horas y almacenamiento a temperatura ambiente). Si se evita el sobre secado del talco en la incubadora y si se almacenará a 4 °C, se lograría una estabilidad de seis meses, por lo tanto, no solo se lograría mejorar la estabilidad sino también la homogeneidad del material de referencia elaborado (Liu *et al.* 2005).

El coeficiente de variación de *Bacillus* sp. es bajo, porque pertenece al grupo de microorganismos esporulados, por lo tanto, al hidratarlo con agua peptonada al 0.1% por 15 minutos se facilita su recuperación del estado de latencia en el talco. Además se ha determinado que *Bacillus cereus* es estable hasta 10 años después de elaborar el inóculo seco del mismo (Liu *et al.* 2005).

Escherichia coli ATCC 25922 es un microorganismo caracterizado en su comportamiento y metabolismo, por esta razón posee un bajo coeficiente de variación. En el caso de *Escherichia coli* O157 es una bacteria estable al exponerse a actividades de agua baja, por lo tanto, tolera la desecación por largos periodos de tiempo y con la metodología empleada en este estudio se podría elaborar un material de referencia para análisis cualitativos (Obaidit y Fung 2005).

Matrices alimentarias.

Al inocular los alimentos (vegetales, harina y leche) con el inóculo seco, se utilizó una proporción de 0.1 g de talco por cada 10 g de alimento, esto crea una dilución de factor 1 en 100, por lo tanto, se reducen 10^{-2} UFC/g de la carga microbiana del inóculo seco (Cuadro 3).

Para los resultados obtenidos del inóculo seco de *Bacillus* sp., no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los alimentos, analistas, bloques, ni en las interacciones. La adaptación de *Bacillus* sp. a los alimentos evaluados se debe a la frecuencia de encontrarlo en vegetales, almidón, especias, harinas, cereales y leche en polvo. Sin embargo, debe estar en una concentración mayor a 10^5 UFC/g para causar un brote. Las esporas de este microorganismo pueden sobrevivir en alimentos de baja humedad por largo periodos de tiempo. Por lo tanto, es importante considerar las condiciones de temperatura y humedad de almacenamiento de los alimentos y muestras porque si las condiciones son ideales para la spora, puede germinar y alterar la concentración del inóculo seco desarrollado (Gurtler *et al.* 2014).

En el caso de *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* ATCC 25922, se encontró diferencia estadísticamente significativa ni entre bloques, por lo tanto, el diseño experimental empleado fue el correcto para mitigar el efecto del nivel entre inóculos. No se encontró diferencia estadística entre alimentos, analistas, ni entre interacciones debido a que los alimentos se inocularon con el talco seco y a los 15 minutos de ser contaminados, se procesaron las muestras. Por lo tanto, el tiempo de hidratación no fue suficiente para alterar la carga microbiana porque anteriormente se encontraba en un ambiente con una baja actividad y necesita adaptarse a las nuevas condiciones proporcionadas por el alimento. Generalmente la fase de adaptación varía entre 1 a 2 horas dependiendo del microorganismo (Forsythe y Hayes 2007).

El promedio recuperado por los analistas en las muestras de *Bacillus* sp. fue de 6.29 ± 0.25 Log UFC/g y $105.92 \pm 4.30\%$ de recuperación en los alimentos evaluados (Cuadro 3). Las mediciones son cercanas al 100% porque el valor asignado del talco es de 5.94 Log UFC/g (Figura 2). Existe una sobre estimación de la carga bacteriana, esto puede atribuirse a la experiencia de los analistas y características intrínsecas del alimento, pero el uso de un inóculo seco permite obtener excelentes porcentajes de recuperación, ahorrar tiempo, y es más preciso en comparación de otros tipos de inóculo (Obaidit y Fung 2005).

El promedio recuperado por los analistas en las muestras inoculadas con *Enterobacter aerogenes* fue de 3.23 ± 1.82 Log UFC/g, con una recuperación de $75.39 \pm 42.58\%$ y el valor asignado del talco fue de 4.78 Log UFC/g (Cuadro 4). Por lo tanto, no se desarrolló un material de referencia efectivo que permita evaluar la exactitud y precisión de los analistas y se deben modificar las condiciones del estudio para obtener un inóculo seco de *Enterobacter aerogenes* estable y homogéneo.

El promedio recuperado por los analistas para las muestras de *Escherichia coli* fue de 6.51 ± 0.46 Log UFC/ g, con un porcentaje de recuperación del $100.99 \pm 7.15\%$ y un valor asignado de 6.45 Log UFC/ g (Cuadro5). Esto nos indica que no se sobreestimó ni se perdió la carga microbiana durante el análisis y el uso de un inóculo seco para *Escherichia coli* permite obtener excelentes porcentajes de recuperación, reducir costos, ahorrar tiempo y es más preciso en comparación de un inóculo líquido, en el cual se ve alterada la concentración microbiana (Obaidit y Fung 2005).

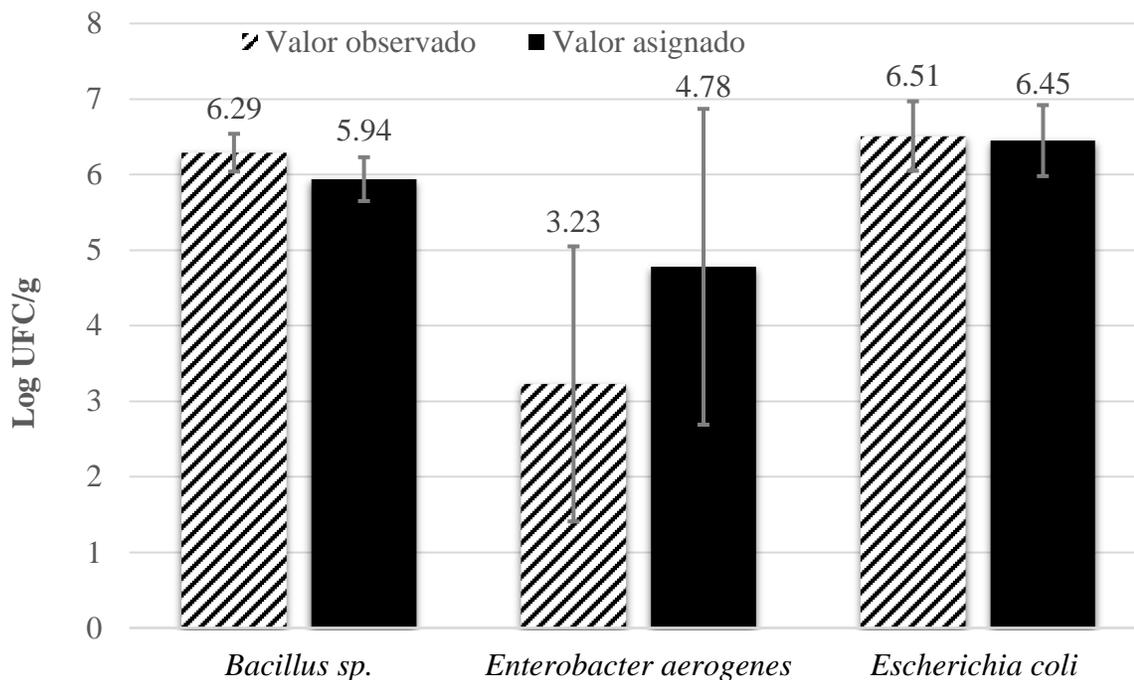


Figura 2. Logaritmo promedio recuperado por los analistas y valor asignado de cada microorganismo.

Cuadro 3. Determinación del valor z y porcentaje de recuperación de *Bacillus* sp. En vegetales, harina y leche.

Alimento	Bloque	Analista	Valor observado (Log UFC/ g)	Valor asignado (Log UFC/ g)	Valor z	Recuperación (%)
Vegetales	1	1	5.89	5.94	-0.17	99.16
Vegetales	1	2	6.85	5.94	3.14	115.32
Vegetales	1	3	6.04	5.94	0.34	101.68
Vegetales	2	1	6.46	5.94	1.79	108.75
Vegetales	2	2	6.40	5.94	1.59	107.74
Vegetales	2	3	6.45	5.94	1.76	108.59
Vegetales	3	1	6.38	5.94	1.52	107.41
Vegetales	3	2	6.23	5.94	1.00	104.88
Vegetales	3	3	6.23	5.94	1.00	104.88
Harina	1	1	6.04	5.94	0.34	101.68
Harina	1	2	5.96	5.94	0.07	100.34
Harina	1	3	6.07	5.94	0.45	102.19
Harina	2	1	6.51	5.94	1.97	109.60
Harina	2	2	6.40	5.94	1.59	107.74
Harina	2	3	6.46	5.94	1.79	108.75
Harina	3	1	6.30	5.94	1.24	106.06
Harina	3	2	6.88	5.94	3.24	115.82
Harina	3	3	6.18	5.94	0.83	104.04
Leche	1	1	6.00	5.94	0.21	101.01
Leche	1	2	5.97	5.94	0.10	100.51
Leche	1	3	6.04	5.94	0.34	101.68
Leche	2	1	6.38	5.94	1.52	107.41
Leche	2	2	6.43	5.94	1.69	108.25
Leche	2	3	6.41	5.94	1.62	107.91
Leche	3	1	6.18	5.94	0.83	104.04
Leche	3	2	6.58	5.94	2.21	110.77
Leche	3	3	6.15	5.94	0.72	103.54
Desviación estándar			0.25	Desviación estándar		4.30
Promedio			6.29	Promedio		105.92

Cuadro 4. Determinación del valor z y porcentaje de recuperación de *Enterobacter aerogenes* en vegetales, harina y leche.

Alimento	Bloque	Analista	Valor observado (Log UFC/ g)	Valor asignado (Log UFC/ g)	Valor z	Recuperación (%)
Vegetales	1	1	1.48	4.28	-1.54	34.58
Vegetales	1	2	3.43	4.28	-0.47	80.14
Vegetales	1	3	1.64	4.28	-1.45	38.32
Vegetales	2	1	2.25	4.28	-1.11	52.57
Vegetales	2	2	3.04	4.28	-0.68	71.03
Vegetales	2	3	2.30	4.28	-1.09	53.74
Vegetales	3	1	5.58	4.28	0.71	130.37
Vegetales	3	2	3.11	4.28	-0.64	72.66
Vegetales	3	3	6.38	4.28	1.15	149.07
Harina	1	1	N/A	4.28	N/A	N/A
Harina	1	2	1.00	4.28	-1.80	23.36
Harina	1	3	1.00	4.28	-1.80	23.36
Harina	2	1	2.34	4.28	-1.06	54.67
Harina	2	2	N/A	4.28	N/A	N/A
Harina	2	3	1.77	4.28	-1.38	41.36
Harina	3	1	4.53	4.28	0.14	105.84
Harina	3	2	3.17	4.28	-0.61	74.07
Harina	3	3	6.04	4.28	0.97	141.12
Leche	1	1	1.70	4.28	-1.42	39.72
Leche	1	2	N/A	4.28	N/A	N/A
Leche	1	3	1.00	4.28	-1.80	23.36
Leche	2	1	2.26	4.28	-1.11	52.80
Leche	2	2	2.64	4.28	-0.90	61.68
Leche	2	3	3.04	4.28	-0.68	71.03
Leche	3	1	5.75	4.28	0.81	134.35
Leche	3	2	5.41	4.28	0.62	126.40
Leche	3	3	6.58	4.28	1.26	153.74
Desviación estándar			1.82	Desviación estándar		42.58
Promedio			3.23	Promedio		75.39

N/A: No aplica, no se encontró carga microbiana en la medición.

Cuadro 5. Determinación del valor z y porcentaje de recuperación de *Escherichia coli* ATCC 25922 en vegetales, harina y leche.

Alimento	Bloque	Analista	Valor observado (Log UFC/ g)	Valor asignado (Log UFC/ g)	Valor z	Recuperación (%)
Vegetales	1	1	6.04	6.45	-0.87	93.64
Vegetales	1	2	6.00	6.45	-0.96	93.02
Vegetales	1	3	5.86	6.45	-1.26	90.85
Vegetales	2	1	6.86	6.45	0.87	106.36
Vegetales	2	2	6.80	6.45	0.74	105.43
Vegetales	2	3	6.82	6.45	0.79	105.74
Vegetales	3	1	6.99	6.45	1.15	108.37
Vegetales	3	2	6.79	6.45	0.72	105.27
Vegetales	3	3	6.64	6.45	0.40	102.95
Harina	1	1	5.82	6.45	-1.34	90.23
Harina	1	2	5.72	6.45	-1.55	88.68
Harina	1	3	5.86	6.45	-1.26	90.85
Harina	2	1	6.70	6.45	0.53	103.88
Harina	2	2	6.80	6.45	0.74	105.43
Harina	2	3	6.62	6.45	0.36	102.64
Harina	3	1	6.98	6.45	1.13	108.22
Harina	3	2	6.84	6.45	0.83	106.05
Harina	3	3	6.75	6.45	0.64	104.65
Leche	1	1	5.93	6.45	-1.11	91.94
Leche	1	2	6.20	6.45	-0.53	96.12
Leche	1	3	5.70	6.45	-1.60	88.37
Leche	2	1	6.93	6.45	1.02	107.44
Leche	2	2	6.82	6.45	0.79	105.74
Leche	2	3	6.59	6.45	0.30	102.17
Leche	3	1	6.97	6.45	1.11	108.06
Leche	3	2	6.81	6.45	0.77	105.58
Leche	3	3	7.04	6.45	1.26	109.15
Desviación estándar			0.46	Desviación estándar		7.15
Promedio			6.51	Promedio		100.99

Se determinó que las mediciones realizadas en *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* fueron 100% satisfactorias en términos de exactitud, porque todos los resultados tuvieron un valor de z absoluto menor a 2; sin embargo, las mediciones de *Bacillus* sp. fueron un 88.89% satisfactorios, esto equivale a 24 de los 27 resultados obtenidos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Clasificación del valor z para los resultados obtenidos en los alimentos inoculados con cada microorganismo.

Microorganismo	Muestras excluidas	Frecuencia $ Z < 2$	Frecuencia $2 > Z < 3$	Frecuencia $ Z > 3$
<i>Bacillus</i> sp.	0	24	1	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	24	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	27	0	0

En otras investigaciones, las mediciones de muestras contaminadas con una carga conocida de *Bacillus* sp. han determinado que el 93.70% de los resultados son satisfactorios, estos valores son similares a los obtenidos en el estudio, pero se debe tomar en cuenta que la diferencia entre los porcentajes se debe al efecto de factores en conjunto como por ejemplo: condiciones ambientales del laboratorio, matriz alimenticia, técnico analista, método, equipo y otros (Logical standards 2016).

Los valores de incertidumbre expandida encontrados en *Bacillus* sp. y *Escherichia coli* son aceptables; sin embargo, *Enterobacter aerogenes* presenta una gran variabilidad, este efecto sistemático se debe al proceso de secado y a la desecación a la que se encuentra expuesto el inóculo seco (Cuadro 7).

Cuadro 7. Incertidumbre expandida de las mediciones de los alimentos inoculados con cada uno de los microorganismos.

Microorganismo	Incertidumbre expandida (%)
<i>Bacillus</i> sp.	8.60
<i>Enterobacter aerogenes</i>	85.16
<i>Escherichia coli</i>	14.30

Se ha determinado en otros laboratorios que la incertidumbre para *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* son: 10.5, 19.0 y 11.2%; respectivamente (Jarvis et al. 2006). En el LMAZ se ha determinado anteriormente la incertidumbre expandida para bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales, los cuales son: 11 y 12%, respectivamente. Estos valores son similares para *Escherichia coli*. Sin embargo, al incluir el grupo de coliformes esto genera un cambio en la incertidumbre de las mediciones (Párraga y Pilla 2013).

4. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un inóculo seco efectivo de *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.
- Los inóculos secos de *Bacillus* sp. y *Escherichia coli* fueron estables durante 60 días.
- Se obtuvo un porcentaje de recuperación satisfactorio al emplear el inóculo seco de cada microorganismo en las matrices alimenticias.
- Los microorganismos estudiados fueron aceptados en términos de exactitud. Sin embargo, los resultados de *Enterobacter aerogenes* no fueron precisos.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la estabilidad de otros microorganismos indicadores.
- Determinar el porcentaje de recuperación con otros métodos.
- Evaluar la estabilidad del inóculo seco por un tiempo mayor a 60 días.
- Determinar la estabilidad del inóculo seco en alimentos.
- Optimizar el tiempo de secado para remover el agua libre, regresando al peso original del talco sin inocular.
- Desarrollar la metodología con un solo microorganismo a la vez para reducir el riesgo de contaminar el inóculo seco con otros microorganismos.
- Analizar lo costos de los insumos utilizados para desarrollar el inóculo seco.

6. LITERATURA CITADA

[AOAC] Official Methods of Analysis of AOAC International. 1995. 16th ed. Arlington, VA: AOAC International.

Almond Board of California. 2014. Guidelines for using *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 as a surrogate microorganism in almond process validation. Almond Board of California. 1(2):1–12.

Blessington T, Theofel CG, Harris LJ. 2013. A dry-inoculation method for nut kernels. *Food Microbiology*. 33(2):292–297. eng. doi:10.1016/j.fm.2012.09.009.

Cuellar DA. 2015. Verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. spa; [accesado 22 oct]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/4563>.

Cuestas IA. 2013. Aseguramiento de la calidad y validación de metodologías para el análisis microbiológicos Norma ISO 17025. Buenos Aires, Argentina: Inti Lácteos.

Enache E, Kataoka A, Black DG, Napier CD, Podolak R, Hayman MM. 2015. Development of a dry inoculation method for thermal challenge studies in low-moisture foods by using talc as a carrier for *Salmonella* and a surrogate (*Enterococcus faecium*). *Journal of Food Protection*. 78(6):1106–1112. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-396.

Forsythe SJ, Hayes PR. 2007. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. 2ª ed. Zaragoza: Acribia. ISBN: 978-84-200-0986-5.

Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL. 2014. The microbiological safety of low water activity foods and spices. New York, NY: Springer New York. ISBN: 978-1-4939-2061-7.

Gust JC. 2016. Developing a proficiency testing plan for your laboratory. Columbia city, IN: Quametec Proficiency Testing Services.

Hoffmans CM, Fung DY. 1992. Effective method for dry inoculation of bacterial cultures. *J Rapid Methods Auto Microbiol*. 1(4):287–294. doi:10.1111/j.1745-4581.1992.tb00275.x.

Jarvis B, Hedges AJ, Corry JEL. 2007. Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of

bacterial colony counts. *Int J Food Microbiol.* 116(1):44–51. eng. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.037.

Liu H, Fung DY, Hoffmans C. 2003. Chalk culture method for preserving bacteria cultures and its applications. *J Rapid Methods Auto Microbiol.* 11(3):163–224. doi:10.1111/j.1745-4581.2003.tb00041.x.

Lynne I. Forster. 2003. Measurement uncertainty in microbiology. *Journal of AOAC International.* 86(5):1089–1094
Liu H, Fung DY, Hoffmans C. 2003. Chalk culture method for preserving bacteria cultures and its applications. *J Rapid Methods Auto Microbiol.* 11(3):163–224. doi:10.1111/j.1745-4581.2003.tb00041.x.

Logical Standards. 2016. Proficiency testing Inglaterra [Internet] [accesado 22 oct del 2016]. Disponible en: https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/lgcstandards-assets/MediaGallery/PT/General_Protocol_Proficiency_Testing_Schemes.pdf

Obaidat MM, Fung DY. 2005. Chalk and fluid inoculation methods in studying the percent recovery of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* from raw ground beef. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology.* 13:307–317.

Párraga KJ, Pilla PM. 2013. Verificación de los métodos para la determinación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Honduras: Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2013. spa; [accessed 2016 Oct 22]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/1697>.

[RTCA] Reglamento Técnico Centroamericano. 2009. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Guatemala: Ministerio de salud pública y asistencia social; [accessed 06 de julio del 2017]. <http://www.mspas.gob.gt/images/files/drca/normativasvigentes/RTCACriteriosMicrobiologicos.PDF>.

Taverniers I, Loose M, van Bockstaele E. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. 23(8):535–552. doi:10.1016/j.trac.2004.04.001.

Weissfeld AS. 2010. Estimation of uncertainty of measurement in microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter.* 32(22):171–175. doi:10.1016/j.clinmicnews.2010.10.004.

Williams TL, Monday SR, Edelson-Mammel S, Buchanan R, Musser SM (2005). A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of *Enterobacter sakazakii* *Proteomics* 5:4161–4169

Zymbro MJ, Power DA. 2015. Manual of microbiological culture media. 2ed. Difco™ & BBL™ Manual. Becton, Dickinson and Company. Consultado el 25 de ago. 2017. Disponible en: http://galachem.ru/uploads/2015/12/difcobbblmanual_2nded.pdf

7. ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadísticos para los resultados de estabilidad de los talcos desarrollados.

Microorganismo	P value	Coefficiente de variación (%)
<i>Bacillus</i> sp.	0.1114	2.6363
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.0590	33.4484
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.6156	5.1267

Anexo 2. Análisis estadísticos para los resultados de homogeneidad de los talcos desarrollados.

Microorganismo	Fuente de variación	P value	Coefficiente de variación (%)
<i>Bacillus</i> sp.	Analista	0.1517	2.49
	Bloque	0.0002	
	Interacción: bloque-analista	0.1504	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Analista	0.0032	17.95
	Bloque	<.0001	
	Interacción: bloque-analista	0.0141	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Analista	0.0563	4.49
	Bloque	0.0125	
	Interacción: bloque-analista	0.4431	

Anexo 3. Analistas que participaron en el desarrollo de la muestra control.

- 1: Oscar Alfredo Mich de León
- 2: Mayra Jackelin Alvarado
- 3: Bet Sarai Wu Alvarado

Anexo 4. Análisis estadísticos para los resultados de inoculación y recuperación de la carga microbiana en alimentos.

Microorganismo	Fuente de variación	P value	Coefficiente de variación (%)
<i>Bacillus</i> sp.	Alimento	0.7673	4.29
	Analista	0.3169	
	Bloque	0.0693	
	Alimento-analista	0.9907	
	Alimento-bloque	0.7516	
	Analista-bloque	0.6902	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Alimento	0.2783	23.35
	Analista	0.8736	
	Bloque	0.0005	
	Alimento-analista	0.4252	
	Alimento-bloque	0.4981	
	Analista-bloque	0.0814	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Alimento	0.3883	2.35
	Analista	0.1719	
	Bloque	<.0001	
	Alimento-analista	0.9344	
	Alimento-bloque	0.7291	
	Analista-bloque	0.7941	

Anexo 5. Listado de los medios.

Medio	Marca	Lote
Agar Soya Trypticasa	Neogen corporation	107097A
Caldo Soya Trypticasa	Neogen corporation	107257B
Agua peptonada	BD	1017217
Buffer fosfato	J.I. Baker	K45CR3

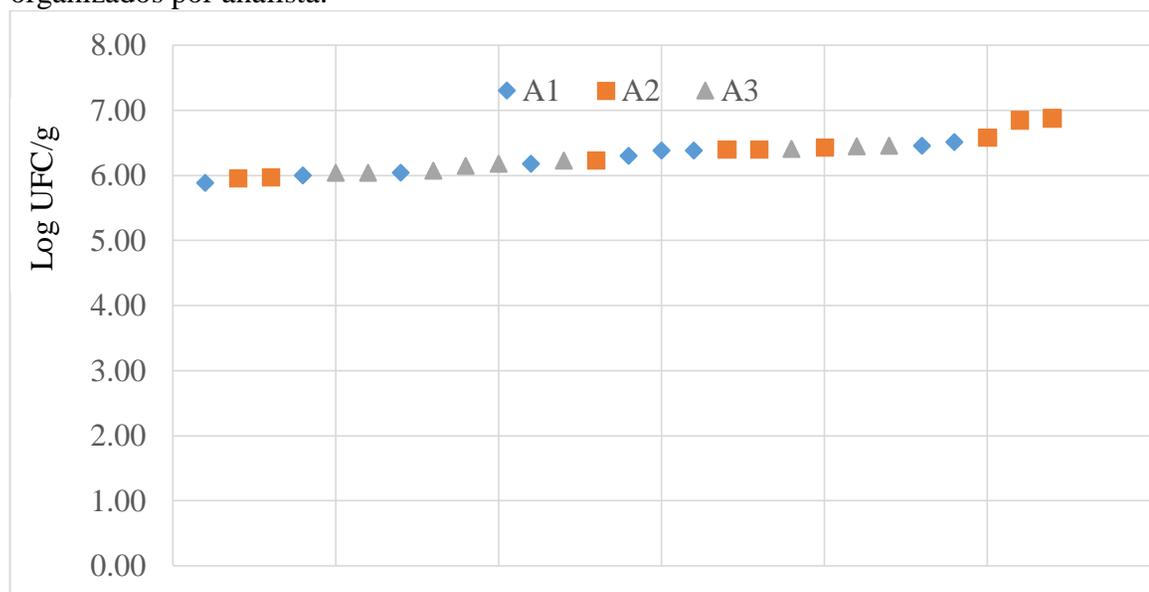
Anexo 6. Listado de materiales.

Materiales	Marca
Bolsa estéril (207 mL o 7 oz.)	Whirl-Pack
Bolsa de autoclave (19"×23")	Fisherbrand
Bolsa estéril (12"×16")	Interplast
Colador de metal de 0.9 × 0.9 mm	N/A

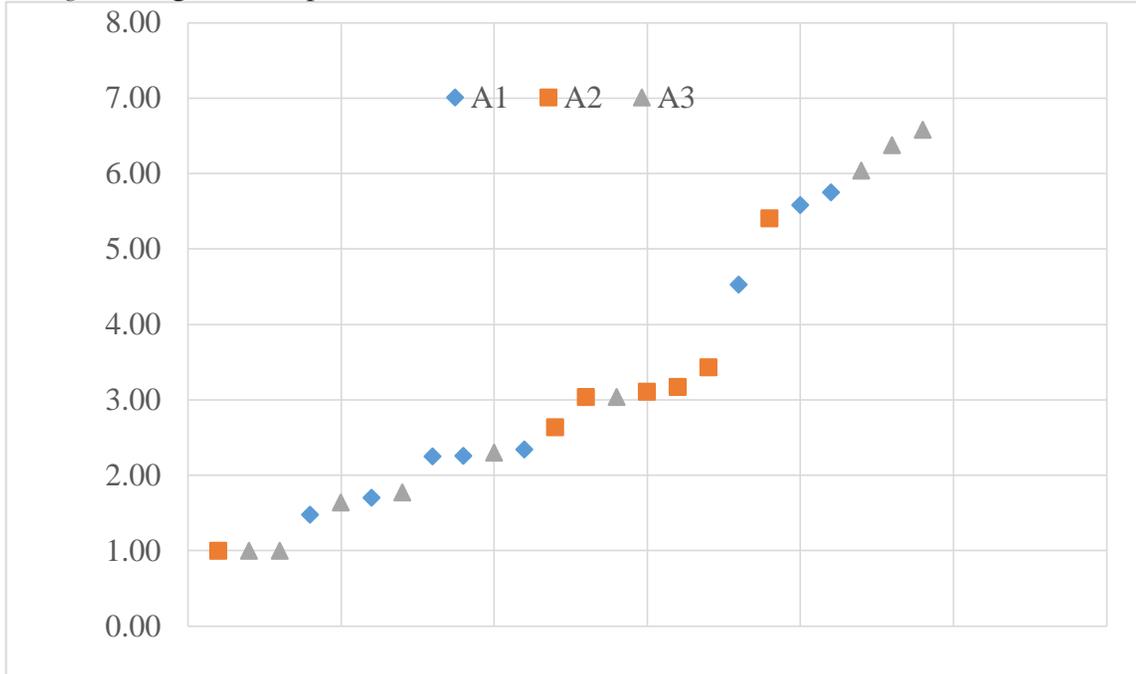
Anexo 7. Listado del equipo empleado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ).

Equipo	Marca	Código E-LMAZ
Incubadora	Thermo Scientific	046
Horno	Fisher Isotemp	043
Agitador Orbital	VWR	026
Masticador	IUL Instruments	051
Cámara de flujo laminar	LABCONCO	017
Balanza	Precisa	060
Contador de colonias	Reuchert	078
Baño Maria	Memmert	039
Vortex	Scientific	059
Horno microondas	General Electric	011
Balanza	Fisher Scientific	005
Refrigerador	Fisher Scientific	057
Autoclave	Sterimatic Market Forge	065
Autoclave	Sterimatic Market Forge	066
Dispensador de agua RIOS-DI 30V	Milipore S.A.S	089
Balanza analítica (medios)	Precisa	007
Agitador/calentador	IKA	003
Agitador/calentador	Fisher Scientific	002
Bomba peristáltica	JENCONS	080

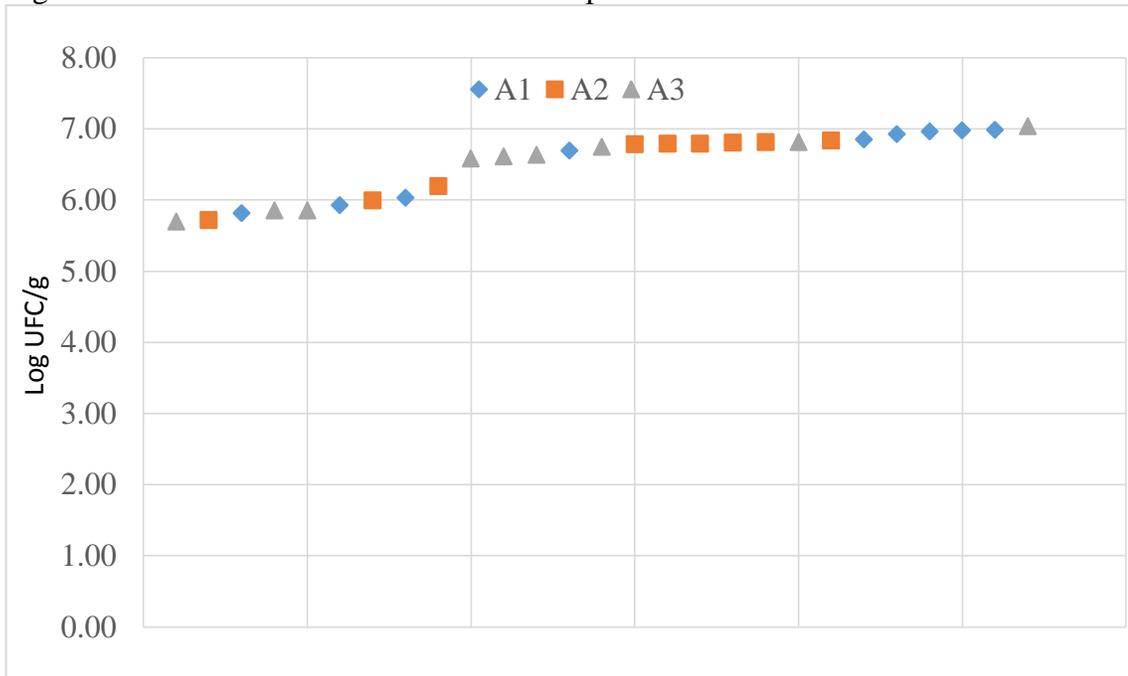
Anexo 8. Distribución de las mediciones en los alimentos inoculados con *Bacillus* sp. organizados por analista.



Anexo 9. Distribución de las mediciones en los alimentos inoculados con *Enterobacter aerogenes* organizados por analista.



Anexo 10. Distribución de las mediciones en los alimentos inoculados con *Escherichia coli* organizados por analista.



Anexo 11. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con *Bacillus* sp., clasificados por tipo de alimento.

Alimento	Resultados	Número de resultados excluidos	Total (%)	Log UFC/g			% satisfactorio
				Media	DE	Rango	
Harina	9	0	33.33	6.31	0.29	5.96 a 6.88	88.89
Leche	9	0	33.33	6.24	0.22	5.97 a 6.58	88.89
Vegetales	9	0	33.33	6.38	0.24	6.04 a 6.85	88.89

DE: Desviación estándar.

Anexo 12. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con *Bacillus* sp., clasificados por analista.

Analista	Resultados	Número de resultados excluidos	Total (%)	Log UFC/g			% satisfactorio
				Media	DE	Rango	
1	9	0	33.33	6.24	0.22	5.89 a 6.51	100.00
2	9	0	33.33	6.41	0.33	5.96 a 6.88	66.67
3	9	0	33.33	6.23	0.17	6.04 a 6.46	100.00

DE: Desviación estándar.

Anexo 13. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con *Enterobacter aerogenes*, clasificados por tipo de alimento.

Alimento	Resultados	Número de resultados excluidos	Total (%)	Log UFC/g			% satisfactorio
				Media	DE	Rango	
Harina	7	2	29.17	2.84	1.89	1.00 a 6.04	100.00
Leche	8	1	33.33	3.55	2.08	1.00 a 6.58	100.00
Vegetales	9	0	37.50	3.25	1.69	1.48 a 6.38	100.00

DE: Desviación estándar.

Anexo 14. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con *Enterobacter aerogenes*, clasificados por analista.

Analista	Resultados	Número de resultados excluidos	Total (%)	Log UFC/g			% satisfactorio
				Media	DE	Rango	
1	8	1	33.33	3.24	1.76	1.48 a 5.58	100.00
2	7	2	29.17	3.11	1.30	1.00 a 5.41	100.00
3	9	0	37.50	3.31	2.36	1.00 a 6.58	100.00

DE: Desviación estándar.

Anexo 15. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con *Escherichia coli*, clasificados por tipo de alimento.

Alimento	Resultados	Número de resultados excluidos	Total (%)	Log UFC/g			% satisfactorio
				Media	DE	Rango	
Harina	9	0	33.33	6.45	0.50	5.72 a 6.98	100.00
Leche	9	0	33.33	6.55	0.49	5.70 a 7.04	100.00
Vegetales	9	0	33.33	6.53	0.44	5.86 a 6.99	100.00

DE: Desviación estándar.

Anexo 16. Análisis de los resultados obtenidos de las muestras inoculadas con *Escherichia coli*, clasificados por analista.

Analista	Resultados	Número de resultados excluidos	Total (%)	Log UFC/g			% satisfactorio
				Media	DE	Rango	
1	9	0	33.33	6.58	0.50	5.82 a 6.99	100.00
2	9	0	33.33	6.53	0.50	5.72 a 6.84	100.00
3	9	0	33.33	6.43	0.50	5.70 a 7.04	100.00

DE: Desviación estándar.

Anexo 17. Formato instructivo para el desarrollo de muestras control en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LAMZ).

1. **Objetivos y alcance**

Describir la metodología para desarrollar una muestra de control interno, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LAMZ).

Alcance: Aplica a todas las cepas de referencia y trabajo que se utilizan en el LMAZ.

2. **Responsabilidades**

Es responsabilidad del Jefe de Laboratorio y técnico analista la aplicación y supervisión de las actividades descritas en este instructivo.

3. **Definiciones**

Cultivo de referencia: cultivos provenientes de una colección de cultivos reconocida nacional y/o internacionalmente.

Cepas de reserva: Las cepas de reserva son una serie de alícuotas de cultivos idénticos obtenidas en el laboratorio por subcultivo de la cepa de referencia.

Cepas de trabajo: son los subcultivos de los microorganismos obtenidos de las cepas de reserva en el laboratorio.

Muestra control: Talco con una carga microbiana conocida, que permite al encargado y operadores del laboratorio monitorear de forma continua las mediciones del laboratorio y los resultados de los análisis microbiológicos. Se usa el análisis estadístico para confirmar si los resultados son lo suficientemente confiables como para ser aceptados en base a la exactitud y precisión de los mismos (Taverniers et al. 2004). Por lo tanto, se necesita demostrar la competencia de la medición comparando los resultados con un valor asignado específico.

Equipo y Materiales

- Platos Petri de vidrio (150 mm de diámetro)
- Pipetas de 10, 5 y 2 mL
- Tubos de ensayo con rosca
- Varilla de vidrio en forma de “L”
- Barras magnéticas
- Bolsas de muestreo de polietileno Whirl-pack® (capacidad 7 oz.)
- Contenedor de plástico con tapa, estéril
- Colador de metal (0.9 × 0.9 mm)
- Cucharas estériles
- Espátulas estériles
- Bolsas plástico (12 × 16 ”)

Medios

- Agar Soya Trypticosa (AST)
- Caldo Soya Trypticosa (CST)
- Agua peptonada al 0.1% (AP)
- Buffer fosfato (BF)

Cuadro A. Listado del equipo utilizado y sus condiciones de trabajo.

Equipo	Marca	Código E-LMAZ
Incubadora (35 °C)	Thermo Scientific	046
Horno	Fisher Isotemp	043
Agitador Orbital	VWR	026
Masticador	IUL Instruments	051
Cámara de flujo laminar	LABCONCO	017
Balanza	Precisa	060
Contador de colonias	Reuchert	078
Baño Maria	Memmert	039
Vortex	Scientific	059
Horno microondas	General Electric	011
Balanza (0.1 a 100 g de amplitud)	Fisher Scientific	005
Refrigerador	Fisher Scientific	057
Autoclave	Sterimatic Market Forge	065
Autoclave	Sterimatic Market Forge	066
Dispensador de agua RIOS-DI 30V	Milipore S.A.S	089
Balanza analítica (medios)	Precisa	007
Agitador/calentador	IKA	003
Agitador/calentador	Fisher Scientific	002
Bomba peristáltica	JENCONS	080

Preparación de medios**Cuadro B.** Composición del medio Agar Soya Trypticosa (AST).

Ingrediente	Formulación (g/L)
Caseína peptona (pancreática)	15
Agar	15
Soya peptona (Papáica)	5
Cloruro de sodio (NaCl)	5
Total	40

pH: 7.3 ±0.2 @25 °C (Zymbro y Power 2015)

Cuadro C. Composición del Caldo Soya Trypticasa (CST).

Ingrediente	Formulación (g/L)
Caseína peptona (pancreática)	17
Soya peptona (papáica)	3
Cloruro de sodio (NaCl)	5
Fosfato dipotásico	2.5
Dextrosa	2.5
Total	30

pH: 7.3 ± 0.2 @25 °C (Zymbro y Power 2015).

Buffer de Fosfatos (Solución de madre). Agregar en un recipiente (capacidad de 2 litro) 34 gramos de fosfato de potasio monobásico y luego adicionar 500 mL de agua destilada. Seguidamente se ajusta el pH a 7.2 con Hidróxido de sodio (NaOH) al 1N. Aforar hasta 1 litro con agua destilada y esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Almacenar en refrigeración.

Buffer de fosfatos (Solución de trabajo). Se depositan 1.25 mL de la solución madre en un recipiente y aforar a 1 litro con agua destilada. Luego se dispensa en tubos de ensayo con tapón de rosca en volúmenes de 9 y 9.9 mL o en frascos con 90 mL. Seguidamente se esteriliza a 121 °C por 15 minutos. Almacenar en refrigeración hasta su uso.

Agua peptonada (0.1%). Se debe agregar 1 gramo de peptona en un recipiente y luego aforar hasta 1 litro con agua destilada. Luego se ajusta el pH a 7.0 ± 0.2 y se dispensa en 9.9 mL. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos y mantener en refrigeración hasta su uso.

4. Actividades

4.1. **Esterilización del talco:** El talco es colocado en un recipiente de vidrio PYREX® 20 × 20 × 5 cm, dispersar el talco en una capa no mayor a 1 cm, luego se colocó en el horno a 140 °C y mantener por un tiempo de 4 horas. Apagar el equipo y dejar enfriar por un tiempo mínimo de 2 horas

4.2. **Evaluación de la actividad de agua del talco:** Usar guantes térmicos al retirar el recipiente del horno, coleccionar el talco estéril con una cuchara estéril y almacenar en bolsas de plástico estériles Whril-pack® (capacidad de 7 onzas). Separar 5 gramos para verificar la actividad de agua (Aw) del talco en base a la metodología AOAC 978.18, se debe encontrar en un valor aproximado de 0.46 (Enache et al 2015).

4.3. **Verificación de esterilidad del talco:** Se realiza una siembra para verificar la esterilidad en AST por la técnica de vaciado en placa.

- i. Pesar asépticamente 0.1 g de talco y adicionar 9.9 mL de agua peptona al 0.1% con una pipeta estéril de 10 mL.
- ii. Dejar reposar por 15 minutos y homogenizar por 7 segundos.
- iii. Fundir AST en el horno microondas y atemperar el medio a 45 °C.
- iv. Preparar una dilución decimal. Pipetear 1 mL en un plato Petri y agregar medio de cultivo atemperado a 45 °C.

- v. Homogenizar el plato Petri con movimientos circulares y dejar solidificar el agar.
- vi. Incubar el plato Petri en posición invertida a 35 ± 1 °C por 24 horas \pm 2 horas.
- vii. Contar las colonias y expresar los resultados en UFC/ g.

Nota: El conteo debe ser de 0 UFC/g, porque nos indicará que el talco se encuentra libre de microorganismos y puede ser inoculado con la cepa de referencia.

4.4. Preparación del inóculo.

- i. **Aislamiento de colonias puras:** Preparar un plato Petri con AST. Fundir Agar Soya Trypticasa y atemperar el medio a 45 °C. Agregar 15 mL del AST al plato Petri y dejar solidificar por 1 minutos. Seguidamente seleccionar el microorganismo de la colección de cultivos que posee el laboratorio y se estría en el plato Petri. Encender el mechero, esterilizar con el fuego 4 asas bacteriológicas y se enfrían por 1 minuto. Con un asa bacteriológica estéril, tomar una muestra del cultivo de referencia y estriar en el plato Petri. Esterilizar nuevamente el asa bacteriológica y usar una nueva asa bacteriológica. Estriar 4 veces el plato Petri, con la finalidad de separar colonias típicas del microorganismo. Incubar a 35 ± 1 °C por 24 horas \pm 2 horas.
- ii. **Multiplicación del microorganismo:** Se selecciona una colonia típica aislada del microorganismo con un asa bacteriológica estéril, se transfiere a 10 mL de Caldo Soya Trypticasa (CST) y se incuba por 24 horas \pm 2 horas a 35 °C. Se preparan 5 platos Petri con AST solidificado. Se funde el agar y se atempera a 45 °C, luego se agregan 15 mL del AST a cada plato Petri y se deja solidificar el agar, después se almacenan a 2 °C. Al finalizar el tiempo de incubación del CST, se transfiere 1 mL a cada plato Petri con AST solidificado y se incuban por 24 horas \pm 2 horas a 35 °C.
Nota: Se usan 5 platos Petri por microorganismo a preparar
- iii. **Método de cosecha.** Finalizado el tiempo de incubación, se agregan 6 mL de agua peptonada al 0.1% a cada uno de los 5 platos Petri, luego con una varilla de vidrio estéril en forma de L se remueve la capa bacteriana formada en el plato Petri. Se colecta la solución bacteriana con una pipeta estéril de 10 mL y se deposita la cosecha del microorganismo en un frasco estéril de 100 mL. Se obtendrán aproximadamente 25 a 30 mL de inóculo líquido del microorganismo. (Almond Board of California 2014).
- iv. **Determinación de la carga microbiana del inóculo líquido:** Medir 0.1 mL de la cosecha con una pipeta estéril de 2 ml y adicionarlo a un tubo de ensayo con 9.9 mL de agua peptonada al 0.1%. Se homogeniza por 7 segundos y se preparan diluciones decimales consecutivas (10^{-2} a 10^{-8}). Se toma 1 mL de cada dilución con una pipeta estéril de 5 mL y se deposita en un plato Petri rotulado con su información. Se agregan 15 mL de AST previamente fundidos y atemperados a

45°C, se homogeniza la muestra y se deja solidificar. Se incuban en posición invertida por 24 horas \pm 2 horas a 35 \pm 1 °C y al finalizar el tiempo se cuentan las colonias y se registran los resultados en UFC/ g.

4.5. Inoculación del talco: Se pesan 25 g de talco esterilizado en un contenedor de vidrio y se registra el peso inicial del talco. Luego se homogeniza el inóculo líquido cosechado por 5 minutos a una velocidad de 3 en el agitador. Seguidamente con una pipeta estéril de 10 mL, se colectan 18 mL del inóculo líquido y se agregan al recipiente con el talco estéril. El talco inoculado se mezcla manualmente con una espátula estéril de metal, aproximadamente 60 movimientos circulares por minuto durante 5 minutos, hasta formar una pasta uniforme. Luego se debe colocar una gasa estéril, se verifica que la gasa no tenga contacto con la pasta, si no se puede colocar un hisopo estéril entre la gasa y la pasta. Se seca en la incubadora a 35 °C por 24 horas \pm 2 horas. Se monitorea el peso cada hora para determinar el tiempo necesario para remover el agua libre, es decir cuando regresa al peso inicial. Después se seca el talco inoculado por 24 horas más a temperatura ambiente.

4.6. Muestra control negativo: Se desarrolla una muestra control de talco, la cual no contiene de microorganismos. Se agregan 18 mL de agua peptonada a 25 gramos de talco estéril para evaluar la actividad de agua al final del secado y durante los análisis microbiológicos.

4.7. Tamizado y almacenado: Se tamizó el talco en la cámara de flujo laminar. Se coloca un soporte de masticador de plástico y una bolsa estéril de 12 x 16 pulgadas marca INTERPLAST®. Sobre la bolsa se coloca un tamiz estéril de 0.9 x 0.9 mm, luego con una espátula estéril se rompe la capa endurecida del talco secado y estos grumos son agregados al tamiz, se tamiza con movimientos circulares con la espátula estéril para evitar la generación de aerosoles. Al colectar el talco seco inoculado, se almacena en un frasco toma muestras estériles, se identifica el frasco con su respectiva información. Al finalizar se aplica el protocolo de desinfección de la campana de flujo laminar.

Nota: Cambiar tamiz, bolsa y espátula al trabajar con otro microorganismo para prevenir contaminación cruzada entre cultivos.

4.8. Condiciones de almacenamiento: Se coloca una cinta de Parafilm® entre la tapa del frasco, esto con la finalidad de evitar el ingreso de oxígeno al talco, luego se almacena el frasco con talco en una gaveta del laboratorio, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente, aproximadamente 20 °C.

4.9. Vida de anaquel: Se analiza la carga microbiana del talco los días 0, 60, 120, 180. En cada uno de estos días se determinó la concentración del inóculo a través de diluciones decimales. Se pesa 0.1 g del talco inoculado en un tubo de ensayo estéril vacío y 9.9 mL agua peptonada al 0.1% con una pipeta de 10 mL estéril (dilución 10^{-2}). Se funde el agar y se atempera a 45 °C, después la dilución 10^{-2} se deja reposar por 15 minutos y se homogeniza por 7 segundos. Seguidamente se realizan diluciones decimales consecutivas hasta la dilución 10^{-6} . En la primera medición (Día 0 o fecha de elaboración) es necesario sembrar todos los factores de dilución para determinar la carga inicial del talco inoculado y en base a este resultado se determinan las diluciones a preparar en las siguientes mediciones

para poder monitorear el comportamiento de los microorganismos. Al analizar la carga microbiana, se medirá la actividad de agua del talco a través del método AOAC 978.18. Finalmente se registrarán los resultados en UFC/g, se desarrollará una fuente de datos que nos permitirá evaluar la estabilidad del talco en el tiempo y determinar el tiempo en el que permanece viable el inóculo seco.

5. Registros

MPC-LMAZ-I01-F01: Listado de cepas de referencia

MPC-LMAZ-I01-F02: Listado de cepas de reserva y de trabajo

6. Referencias

1. Almond Board of California. 2014. Guidelines for Using *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 as a Surrogate Microorganism in Almond Process Validation. Almond Board of California. 1(2):1–12.
2. Taverniers I, Loose M, van Bockstaele E. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. 23(8):535–552. doi:10.1016/j.trac.2004.04.001