

# COMPARACIÓN DE MÉTODOS 3M-PETRIFILM™ Y CONVENCIONAL PARA CONTEO RÁPIDO DE AEROBIOS EN PRODUCTOS DE CACAO

## COMPARISON OF 3M-PETRIFILM™ AND CONVENTIONAL METHODS FOR QUICK COUNTING OF AEROBICS IN COCOA PRODUCTS

Dariel Intriago Bermúdez<sup>1,2</sup>, Marco Antonio Zambrano Alcivar<sup>1,3</sup>, María Isabel Bolaños Lucas<sup>2</sup>, Ely Fernando Sacón Vera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Maestría en Agroindustria, Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix-López. Sitio “El Limón” Calceta, Manabí, Ecuador.

<sup>2</sup> Departamento Control de Calidad, La Fabril S. A., km 5.5 vía Manta-Montecristi, Montecristi, Manabí, Ecuador.

<sup>3</sup> Departamento Control y Aseguramiento de Calidad, Marbelize S.A., km 5.5 vía Manta-Rocafuerte, Jaramijó, Manabí, Ecuador.

Email: [dintriago@lafabril.com.ec](mailto:dintriago@lafabril.com.ec)

### Información del artículo

Tipo de artículo:  
Artículo original

Recibido:  
27/09/2018

Aceptado:  
11/12/2018

Licencia:  
CC BY-NC-SA 4.0

Revista  
ESPAMCIENCIA  
10(1):114-118

### Resumen

Para evaluar la calidad de productos alimenticios se emplea como requisito de cumplimiento el recuento de aerobios mesófilos. La efectividad de aplicar una metodología rápida para detectar la presencia de estos microorganismos es fundamental para la toma de acciones correctivas en plantas procesadoras. El objetivo del estudio fue comparar el método alternativo 2015.13 AOAC con el método tradicional a base de agar triptona de soya para el conteo rápido de aerobios en coberturas de chocolate y polvo de cacao. La matriz coberturas de chocolate fue inoculada internamente con *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La matriz polvo de cacao presentó contaminación natural. Se probaron 5 niveles de inóculo: 60, 380, 700, 36 000, 40 000 UFC/g. La temperatura de cultivo fue  $35^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 2$  horas para el método AOAC 2015.13 y  $48\pm 2$  horas para el método convencional. Los resultados evidenciaron que no hay diferencias significativas entre las matrices a base de cobertura de chocolate y polvo de cacao, en las placas 3M-Petrifilm™ y agar triptona de soya, para el recuento rápido de aerobios con los inóculos 60 ( $p=0,506$ ), 380 ( $p=0,843$ ), 700 ( $p=0,378$ ), 36 000 ( $p=0,180$ ) y 40 000 ( $p=0,180$ ), con un coeficiente de correlación  $r=0.99$  ( $p\leq 0.05$ ), precisión  $Rp\%\leq 2.0\cdot RDS\%_{\text{num}}$  y recuperación  $\geq 80\%$ .

**Palabras clave:** Microbiología de alimentos, contaminación biológica, inóculo, recuperación.

### Abstract

As a requirement to evaluate the quality of food products, the counting of aerobic mesophilic microorganism is used. Effectiveness of applying a fast methodology in order to detect the existence of these microorganisms is crucial to take corrective actions in processing facilities. This study aimed to compare the alternative method 2015.13 AOAC vs the traditional method based on tryptone soy agar for aerobes fast counting on chocolate coatings and cocoa powder. The matrix chocolate coating was internally inoculated with *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The matrix cocoa powder showed natural contamination. 5 levels of inoculum were tested: 60, 380, 700, 36 000, 40 000 UFC/g. The culture temperature was about  $35^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  during  $24\pm 2$  hours for the method AOAC 2015.13 and  $48\pm 2$  hours for the conventional method. Results demonstrated that there are no statistical difference between matrixes based on chocolate coatings and cocoa powder, on 3M-Petrifilm™ and tryptone soy agar plates, for aerobes fast counting with inocula 60 ( $p=0,506$ ), 380 ( $p=0,843$ ), 700 ( $p=0,378$ ), 36 000 ( $p=0,180$ ) and 40 000 ( $p=0,180$ ), with a correlation coefficient of  $r=0.99$  ( $p\leq 0.05$ ), precision  $Rp\%\leq 2.0\cdot RDS\%_{\text{num}}$  and recovery  $\geq 80\%$ .

**Keywords:** Food microbiology, biological contamination, inoculum, recovery.

## INTRODUCCIÓN

El conteo de aerobios mesófilos se utiliza frecuentemente en la industria alimentaria para medir la calidad sanitaria de los productos alimenticios durante todo el proceso de producción, comenzando por las materias primas utilizadas como ingredientes hasta los productos terminados. Aunque no se usa como un indicador de seguridad en los productos alimenticios, el conteo de aerobios mesófilos resulta útil para proporcionar información sobre las deficiencias de los sistemas de saneamiento, en los sistemas de control y en las condiciones sanitarias de las instalaciones de almacenamiento y procesamiento (Bird *et al.*, 2016). En la industria alimentaria, la inspección rápida y precisa es importante ya que debe considerar simultáneamente tanto la producción en masa como las preocupaciones sobre la calidad de los alimentos (Rosmini *et al.*, 2004; Park y Kim, 2013). Para esto, las técnicas microbiológicas rápidas son una alternativa válida. La mayoría de estos métodos tienen atributos de las técnicas convencionales (especialmente la confiabilidad) y además, el tiempo entre el muestreo y los resultados es más corto (Feng, 1996; Fung, 1994; Bird *et al.*, 2016). Entre las condiciones que cumplen los métodos rápidos están su exactitud, rapidez, coste mínimo, aceptabilidad, sencillez de manejo, fiabilidad del método, soporte técnico adecuado y un mínimo espacio útil requerido (De Santos, 2010; Jasson *et al.*, 2010). El aumento de la conciencia pública sobre los problemas de inocuidad de los alimentos, junto con una mayor regulación gubernamental de la industria alimentaria, han aumentado drásticamente la cantidad y el tipo de pruebas microbiológicas que se realizan de forma rutinaria en los laboratorios de control de calidad (Beuchat *et al.*, 1998).

Los métodos de referencia para el conteo de aerobios mesófilos señalan que hay respuestas entre 48 y 72 horas, según Benzinger *et al.* (2014) y Bird *et al.* (2016). Las placas 3M Petrifilm™, para el recuento rápido de aerobios (RAC: siglas en inglés), es un sistema listo para usar que contiene elementos nutritivos, un agente gelificante soluble en agua, y un indicador que facilita la enumeración de las colonias (Benzinger *et al.*, 2014; Bird *et al.*, 2016). Para evaluar la calidad del cacao en polvo y chocolates se exige, como requisito de cumplimiento, el recuento de aerobios mesófilos (ICMSF 8, 2011; INEN 621 INEN, 2010; NTC 722-ICONTEC, 2008). Con este antecedente, se planeó un estudio que tuvo como objetivo: Comparar el método alternativo 2015.13 AOAC con el método tradicional a base de agar triptona de soya, para el conteo rápido de aerobios, en matrices a base de coberturas de chocolate y polvo de cacao.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología aceites y grasas del Departamento Control de Calidad de

La Fabril S.A., ubicado en el km. 5.5 vía Manta-Montecristi, cantón Montecristi, provincia de Manabí, Ecuador.

### Unidad experimental

Como unidades experimentales se emplearon 5 muestras de productos a base de cacao: tres muestras de polvo de cacao, una muestra de crema de chocolate y una muestra de cobertura de chocolate. En las unidades experimentales: polvo de cacao y cremas de chocolates la contaminación microbiológica fue natural; y, para el caso de coberturas de chocolate se contaminó artificialmente con cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (AENOR, 2016).

### Método Placas 3M-Petrifilm™

Las muestras de productos a base de cacao (10 g) fueron diluidas en 90 mL de solución fosfato buffer Butterfield's estéril (pH 7.2). Las muestras fueron mezcladas utilizando Stomacher Seward por 30 s. Se realizaron diluciones seriadas, tomando 1 mL de la muestra y se depositó en la placa 3M-Petrifilm™RAC, siendo incubada por un tiempo de  $24 \pm 2$  h a una temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ; para luego realizar el conteo usando un contador de colonias tipo Quebec. Se enumeraron todas las colonias por tamaño, color e intensidad. Los resultados fueron reportados como conteo de aerobios mesófilos UFC por gramo de alimento (Bird *et al.*, 2016).

### Método convencional

Las muestras de productos de cacao fueron homogenizadas, diluidas y depositadas (1 mL) en cajas Petri con agar triptona de soya (TSA, pH 7,3, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), fundido a  $47-50^\circ\text{C}$ , donde el contenido de la caja Petri se mezcló realizando movimientos giratorios. Las colonias observadas en TSA fueron incubadas en un tiempo de  $48 \pm 2$  h a  $35^\circ\text{C}$ . Los resultados fueron reportados como conteo de aerobios mesófilos UFC por cada gramo de alimento.

### Características de los métodos de ensayo

El método AOAC 2015.13 es considerado método normalizado, pues las características de funcionamiento, como reproducibilidad y recuperación, deben confirmarse antes de utilizarlo, para asegurar el desempeño requerido ISO/IEC 17025 (2017). Para los cálculos se tuvo en cuenta que las poblaciones no son gaussianas, por tanto, los datos se transformaron a  $\log_{10}$  de los valores obtenidos en el conteo.

Se aplicó el cálculo de ensayos cuantitativos por la técnica de duplicados con pares de valores, ya que no se dispone de material de referencia estable.

Se calculó el valor de precisión relativa (Rp) como:

$$RP(\%) = \frac{(1 - 10^{-sd})(100)}{Rp\% (1-10^{-sa}) * 100} \quad (1)$$

Donde: Sd = desviación estándar de la diferencia logarítmica entre el valor de referencia (obtenido en el medio no selectivo) y el valor del laboratorio (medio selectivo).

El criterio con el que se comparó fue seguir una distribución de Poisson por lo que la desviación estándar relativa (RSD) se estimó mediante la ecuación 2:

$$RSD(\%) = \frac{1}{\sqrt{C}} (100) \quad (2)$$

$$RSD\% \text{ Poisson} = (1/\sqrt{C}) * 100 \quad (2)$$

Donde: C = valor del recuento.

Para tener en cuenta posibles errores se usó la relación:

$$Rp(\%) \leq 2,0 * RSD(\%) \text{ Poisson} \quad (3)$$

La determinación de la recuperación relativa media (Rec), que sería aceptable frente a criterios establecidos, en torno a 80%, se calculó como

$$Rec(\%) = 10 * 100 \quad (4)$$

Donde: d = Diferencia entre el valor de referencia – valor obtenido en el ensayo.

### Análisis estadístico

Los valores de conteo obtenidos fueron transformados a log<sub>10</sub> tanto para el comportamiento del método 3M-Petrifilm™ como del método convencional. Se usó el método de regresión lineal (p≤0.05) (Rosmini et al., 2004; Gutiérrez y De la Vara, 2008; Park y Kim, 2013; Teramura et al., 2015; Jarvis, 2016), cuyo modelo matemático es:

$$Y = a + bX \quad (5)$$

Donde:

Y = valor de la variable dependiente

a = intercepto

b = Coeficiente de regresión

X = valor de la variable independiente

Los análisis de regresión se realizaron usando el software IBM SPSS versión 22.

Las características de funcionamiento de los métodos de ensayo tuvieron los siguientes criterios de aceptación:

Reproducibilidad= Rp (%) ≤2,0\*RDS%<sub>Poisson</sub>

Recuperación ≥ 80%.

Para probar la hipótesis se calcula el estadístico de prueba:

$$t_0 = \frac{\bar{X} - \mu_0}{S / \sqrt{n}} \quad (6)$$

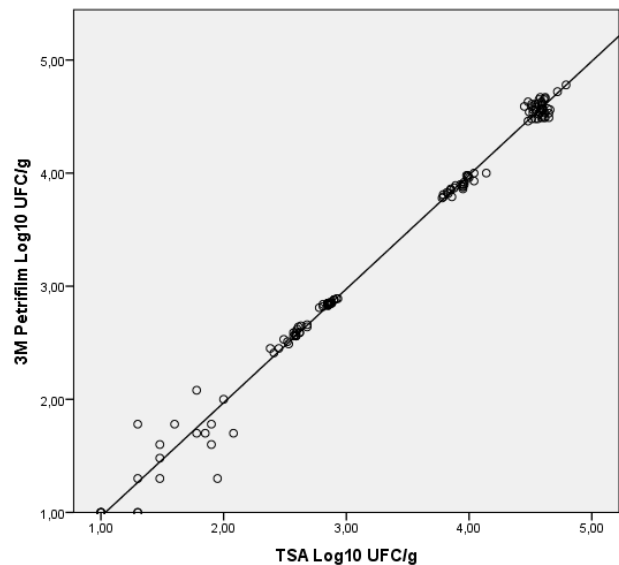
Donde S = desviación estándar de los datos.

Bajo el supuesto de que H0 es verdadera, este estadístico se distribuye T de Student con n – 1 grados de libertad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestran los resultados de la regresión lineal en la que se relaciona el método convencional con el método alternativo 3M-Petrifilm™ RAC.

La ecuación de regresión fue: Y = 0,9983x-0,0114. Coeficiente de determinación R<sup>2</sup>=0,99, correlación R=0,995.



**Figura 1.** Regresión lineal obtenida al comparar TSA y 3M-Petrifilm™ RAC.

En alimentos como camarón y leche pasteurizada, según Bird et al. (2016) y en camarón, tomates, moras, salsa y aderezos, pasta fresca, helados, leche en polvo y leche pasteurizada, Benzinger et al. (2014), obtuvieron resultados similares. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el método 3M-Petrifilm™ RAC y el convencional TSA con un nivel de confianza del 95%. Bird et al. (2016) y Benzinger et al. (2014) obtuvieron coeficientes de determinación altos, similares a los del presente estudio: R<sup>2</sup> = 0,951 para camarón crudo, R<sup>2</sup> = 0,997 para leche pasteurizada, R<sup>2</sup> = 0,9981 para helados, R<sup>2</sup> = 0,9962 para salsas.

No se encontró diferencia significativa en la recuperación microbiana con las matrices de productos de cacao observada entre TSA y 3M-Petrifilm™ RAC (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Comparación del método alternativo 3M-Petrifilm™ RAC para enumeración de aerobios mesófilos en productos de cacao

Nivel	Reproducibilidad	Recuperación	Precisión	t test
	SR	≥ 80%	Rp% ≤ 2.0*RDS% <sub>Poisson</sub>	
Bajo	0,540	84,20%	54,22% ≤ 78,75%	1,93
Bajo	0,245	88,59%	24,46% ≤ 34,84%	0,49
Medio	0,030	99,47%	2,97% ≤ 24,02%	0,55
Alto	0,165	96,10%	16,49% ≤ 31,48%	0,98
Alto	0,169	98,15%	16,94% ≤ 32,91%	0,45

Bird *et al.* (2016), obtuvieron resultados de reproducibilidad S, en nivel bajo 0,335; medio 0,273 y alto 0,174, que tienden a coincidir con el presente estudio. Sin embargo, el primer nivel bajo del presente estudio es mayor al reportado por Bird *et al.* (2016), debido a que no se tiene garantía cuantitativa de los resultados, cuando se obtienen números menores a 20 UFC, en las zonas de bajos recuentos. Por ello, el modelo de distribución gaussiano no es aplicable, y debe utilizarse otro tipo de distribuciones como Poisson (Jarvis, 2016). Forster (2009) ha enfatizado que los recuentos bajos < 20 UFC contribuyen a una mayor incertidumbre. Jongenburger *et al.* (2010), recomiendan recuentos al menos de 25 UFC para mantener la precisión del método.

Durante la ejecución de los análisis no se observaron aspectos negativos para la identificación de las colonias. Estas se identificaron más fácilmente en las placas 3M-Petrifilm™ RAC que en el método convencional debido al "color e intensidad de las colonias" observadas durante la evaluación. Las placas 3M-Petrifilm™ RAC evitaban que se produjeran colonias de esparcido (licuefacción), en el método convencional. Esto permitió una enumeración más fácil en las placas 3M-Petrifilm™ RAC que las placas de agar del método convencional (Bird *et al.*, 2016).

Los resultados evidenciaron que no hay diferencias significativas entre las matrices a base de cobertura de chocolate y polvo de cacao, en las placas 3M-Petrifilm™ y agar triptona de soya, para el recuento rápido de aerobios con los inóculos 60 ( $p=0,506$ ), 380 ( $p=0,843$ ), 700 ( $p=0,378$ ), 36 000 ( $p=0,180$ ) y 40 000 ( $p=0,180$ ), con un coeficiente de correlación  $r=0,99$  ( $p\leq 0,05$ ), precisión  $Rp\% \leq 2,0 * RDS\%_{Poisson}$  y recuperación  $\geq 80\%$ .

## CONCLUSIONES

Se evidenció que el método de conteo microbiológico alternativo 3M-Petrifilm™ RAC es reproducible, confiable y preciso.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el método alternativo y el método tradicional con un nivel de confianza del 95%.

No se encontró diferencia significativa en la recuperación microbiana en las matrices de productos de cacao observada entre TSA y 3M-Petrifilm™ RAC.

## LITERATURA CITADA

- AENOR (Asociación Española de Normalización). 2016. Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia. UNE EN ISO 16140-2 (ISO 16140-2:2016). Asociación Española de Normalización y Certificación, Madrid.
- Benzinger, M.J., Mastalerz, A., Bird, P., Crowley, E., Agin, J. & Goins, D. 2014. Comparative Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate for the Enumeration of Total Viable Count in a Variety of Foods. Technical Report. Q Laboratories, Inc. and AOAC Res. Inst., Rockville, Maryland, USA
- Beuchat, L. R., Copeland, F., Curiale, M. S., Danisavich, T., Gangar, V., King, B. W., ... & Townsend, D. E. 1998. Comparison of the SimPlate™ total plate count method with Petrifilm™, Redigel™, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. *Journal of food protection*, 61(1):14-18.
- Bird, P., Flannery, J., Crowley, E., Agin, J., Goins, D., & Jechorek, R. 2016. Evaluation of the 3M™ -Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate for the Enumeration of Aerobic Bacteria: Collaborative Study, First Action 2015.13. *Journal of AOAC International*, 99(3): 664-675.
- De Santos, R. M. 2010. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Feng, P. 1996. Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. *Journal of AOAC International*, 79(3): 809-812.
- Forster, L. I. 2009. Conclusions on measurement uncertainty in microbiology. *Journal of AOAC International*, 92(1):312-319.
- Fung, D. Y. 1994. Rapid methods and automation in food microbiology: a review. *Food Reviews International*, 10(3):357-375.
- Gutiérrez, H. y De la Vara Salazar, R. 2008. Análisis y Diseño de Experimentos. 2da Edición. MC GRAW-HILL. México, pp 340-360.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 2011. Microorganisms in Foods 8: Use of data for assessing Process Control and Product Acceptance. Springer Science+Business Media LCC, Switzerland.

- ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación). 2008. Norma Técnica Colombiana NTC 792, Chocolates y sus sucedáneos para consumo directo. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, Bogotá.
- INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización). 2010. Norma Técnica Ecuatoriana INEN 621. Chocolates. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito.
- ISO/IEC 17025. 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO, Geneva.
- Jarvis, B. 2016. Statistical aspects of the microbiological examination of foods. S.l.: Elsevier Academic Press. United Kingdom, pp. 282.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food microbiology*, 27(6): 710-730.
- Jongenburger, I., Reij, M. W., Boer, E. P. J., Gorris, L. G. M., & Zwietering, M. H. 2010. Factors influencing the accuracy of the plating method used to enumerate low numbers of viable micro-organisms in food. *International journal of food microbiology*, 143(1-2):32-40.
- Park, J. & Kim, M. 2013. Comparison of dry medium culture plates for mesophilic aerobic bacteria in milk, ice cream, ham, and codfish fillet products. *Preventive nutrition and food science*, 18(4):269.
- Rosmini, M. R., Signorini, M. L., Schneider, R., & Bonazza, J. C. 2004. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk. *Food Control*, 15(1):39-44.
- Teramura, H., Iwasaki, M., Ushiyama, M., & Ogihara, H. 2015. Evaluation of a Novel Dry Sheet Culture Method for Rapid Enumeration of Total Aerobic Count in Foods. *Journal of food protection*, 78(10):1885-1890.