



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE CONDICIONES HIGIÉNICO SANITARIAS EN EL PROCESO
DE ELABORACIÓN Y ENVASADO DE ALIMENTOS EN POLVO CON TÉCNICA
DE SIEMBRA RÁPIDA DE MICROORGANISMOS INDICADORES**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:
ROCÍO IVETTE PÉREZ PADILLA**

**ASESOR:
Dr. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA**

**ASESOR ADJUNTO:
Dra. en Admón. ALICIA GARCÍA REYES**

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química por ser una gran casa de conocimiento y ayudar a tomar vuelo a cada adversidad que se presente en el ámbito laboral, sintiéndome muy afortunada de pertenecer a esta máxima casa de estudios.

Agradezco a mis asesores el Dr. Octavio Dublán García y a la Mtra. Alicia García Reyes por ser excelentes maestros, por su apoyo durante las revisiones proporcionando sus observaciones para este trabajo.

A la planta envasadora de alimentos en polvo que apoyaron este trabajo al utilizar sus instalaciones y realizar la parte experimental en el laboratorio de Microbiología.

Al tiempo, porque tarde o temprano se llega a la meta.

DEDICATORIAS

A Dios, por su infinito amor que ha permitidos mi existencia y ha iluminado cada uno de mis pasos, permitiéndome gozar de los éxitos y fracasos obtenidos a lo largo de mi vida.

A mis padres José y Agustina, por su amor incondicional, por sus esfuerzos brindados para conmigo, por su paciencia y comprensión al estar a mi lado en las buenas y en las malas, por su ejemplo de superación y perseverancia de no quedarnos con lo que tenemos y sabemos, y por la mejor herencia que me pudieron dar, el estudio. ¡Los amo!

A mis hermanos, por estar a mi lado con su amor y apoyo incondicional.

A Carlos A. Rodríguez, amor de mi vida, por ser parte de esta travesía y mostrarme el verdadero valor del todo, por ser mi motivación y motor de nuevos objetivos y proyectos, por caminar a mi lado desde el momento que iniciamos un “nosotros” sin querer queriendo. “Hasta la estrella que no ves, así Te Amo”.

Q.A. Rocío Ivette Pérez Padilla

ÍNDICE

ÍNDICE	i
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Seguridad alimentaria.....	4
1.2. Tipos de contaminación alimentaria.....	6
1.3. Fuentes de contaminación biológica alimentaria.....	7
1.3.1. Carga microbiana propia del alimento.....	7
1.3.2. Agua.....	8
1.3.3. Plagas.....	9
1.3.4. Manipuladores.....	9
1.3.5. Ambiente de las instalaciones.....	10
1.3.6. Superficies inertes.....	10
1.3.7. Contaminación cruzada.....	10
1.4. Limpieza, sanitización e higiene en la producción de alimentos.....	11
1.5. Indicadores microbiológicos.....	13
1.5.1. Indicadores de calidad microbiana del proceso.....	14
1.5.1.1. Mesófilos aerobios.....	14
1.5.1.2. Hongos y levaduras.....	15
1.5.1.3. Coliformes totales.....	16
1.5.2. Indicadores de contaminación fecal.....	17
1.5.2.1. <i>E. coli</i>	18
1.5.2.2. Enterococos.....	19

1.5.2.3.	<i>Clostridium perfringens</i>	19
1.5.3.	Otros patógenos.....	20
1.5.3.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.5.3.2.	<i>Listeria spp.</i>	21
1.6.	Métodos rápidos para la enumeración de microorganismos indicadores.....	23
1.6.1.	Sistemas de siembra en espiral.....	24
1.6.2.	Sistema Iso-Grid.....	25
1.6.3.	Método rápido Redigel.....	26
1.6.4.	Método rápido Simplate.....	26
1.6.5.	Método rápido Petrifilm.....	27
1.6.5.1.	Placas Petrifilm de mesófilos aerobios (AC).....	29
1.6.5.2.	Placas Petrifilm de coliformes (CC).....	29
1.6.5.3.	Placas Petrifilm de <i>E. coli</i> /Coliformes (EC).....	30
1.6.5.4.	Placas Petrifilm de levaduras y hongos (YM).....	31
	HIPÓTESIS	32
	OBJETIVOS	32
	CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1.	Materiales y reactivos.....	34
2.2.	Método.....	35
	ETAPA 1. Definición de puntos a evaluar de equipos, manipuladores y zonas de medio ambiente en la elaboración y envasado de alimentos en polvos.....	36
	Paso 1. Solicitud de cambio de técnica de siembra microbiológica.....	36
	Paso 2. Realización de auditoria con el líder de inocuidad de la planta.....	37

Paso 3. Adquisición de recursos para siembra microbiológica con método Petrifilm.....	38
Paso 4. Definición de puntos a evaluar de equipos, manipuladores y zonas de medio ambiente.....	39
ETAPA 2. Aplicación de técnica de muestreo y técnica de siembra microbiológica con placas Petrifilm	40
Paso 1. Toma de muestra.....	40
1.1. Equipos.....	40
1.2. Manipuladores.....	41
Paso 2. Inoculación.....	42
2.1. Equipos y manipuladores.....	42
2.2. Toma de muestra e inoculación medio ambiente.....	44
Paso 3. Incubación.....	46
Paso 4. Interpretación de placas.....	47
4.1. Mesófilos aerobios AC	47
4.2. <i>E. coli</i> / Coliformes totales EC.....	49
4.3. Hongos y levaduras YM.....	53
Paso 5. Expresión de resultados.....	55
ETAPA 3. Realización de los análisis con técnica de siembra microbiológica con placas Petrifilm	57
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
3.1. Equipos.....	58
3.2. Manipuladores.....	63
3.3. Ambientes.....	70
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73
4.1. Conclusiones.....	73

4.2. Recomendaciones.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
BIBLIOGRAFÍA DE PÁGINAS WEB.....	77
NORMAS CONSULTADAS.....	79

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en una planta maquiladora de productos en polvo, con el objetivo de evaluar la calidad sanitaria de *equipos* después de su limpieza, de *manipuladores* en contacto directo con los productos alimenticios y *medio ambiente* durante el proceso de mezclado y envasado con análisis microbiológico de siembra rápida de microorganismos indicadores y sustituir la técnica tradicional para eficientar tiempos de técnica de siembra y entrega de resultados.

Los *equipos* y *manipuladores* fueron muestreados con hisopo siendo inoculados para microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales, *E. coli* y cuenta total de hongos y levaduras; para el análisis microbiológico de *medio ambiente* se llevó a cabo la hidratación de placas Petrifilm de mesófilos aerobios y hongos y levaduras, las cuales fueron expuestas en las áreas de interés, siendo así su método de inoculación para proceder a la incubación.

Los resultados fueron comparados con los límites microbiológicos establecidos por la planta maquiladora y con base en el histórico generado por el uso del método de siembra microbiológica tradicional para verificar la eficiencia del tiempo invertido con el uso de las placas Petrifilm.

Los resultados microbiológicos de **equipos** se encuentran dentro de los límites microbiológicos permisibles, los **manipuladores** hubo 6 resultados fuera de los límites permisibles en cuenta de mesófilos aerobios, 5 resultados de coliformes totales y 1 resultado en el parámetro de hongos y levaduras. Finalmente, los

resultados por exposición de placa al medio **ambiente** en áreas de pesado de materias primas, mezclado y envasado, se encuentran en cumplimiento.

Con el uso de las placas Petrifilm la inversión de tiempo para 30 muestras fue de 2 horas, por lo que hubo un ahorro de tiempo considerable, ya que la inversión de tiempo con método tradicional es de 6 horas.

Por los resultados obtenidos, las condiciones higiénico-sanitarias de la planta maquiladora se encuentran dentro de especificación para la elaboración de alimentos en polvo. Y el método rápido Petrifilm es una alternativa muy buena para sustituir el método tradicional, ya que elimina la preparación de los medios de cultivo, se visualiza mejor el crecimiento y la morfología de las colonias y el insumo de menor tiempo y economía, ofrecen ventajas que justifican su utilización para el análisis microbiológico de materia prima, producto terminado, equipos, manipuladores y medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, con la expansión de la industria alimentaria es necesario establecer normas, especificaciones y controles para asegurar la calidad e inocuidad de los productos que se encuentran en el mercado. Los análisis y verificación con métodos microbiológicos involucrados en el proceso de los alimentos representan un gran factor de control y monitoreo para visualizar focos críticos de contaminación microbiana en el producto para evitar riesgos de salud de los consumidores.

La higiene es la base de la implementación de las *Buenas Prácticas de Manufactura* por lo que equipos, manipuladores y área de trabajo son factores importantes para analizar, por esta razón, es que se debe contar con controles de limpieza y desinfección definidos para las superficies que tienen contacto directo con los productos alimenticios con el fin de eliminar riesgos microbiológicos.

La visión principal de la Industria Alimentaria es ofrecer productos alimenticios que satisfagan las necesidades de los consumidores, proporcionando productos con calidad e inocuidad, para posicionarse en el mercado, ganar confianza y aceptación.

Por la importancia que resulta tener establecido un *programa de limpieza y desinfección de equipos, manipuladores y ambientes* donde se lleva a cabo la operación de elaborar y envasar productos alimenticios, se evaluaron las condiciones higiénico sanitaria por siembra microbiológica con método rápido con placas Petrifilm de equipos, manipuladores y ambientes de áreas de mezclado y envasado de una planta maquiladora de alimentos en polvo, ya que son placas listas

para su uso, ahorran tiempo y sin la preparación de medios de cultivo proporcionando incremento de productividad en siembra de muestras, fiabilidad de los resultados y eficiencia para el analista.

La técnica de siembra se reduce a la inoculación de la muestra, incubación y recuento de las colonias en un tiempo de 48 horas para las placas de mesófilos aerobios, coliformes totales y *E. coli* y hasta un máximo de 60 horas para recuento de hongos y levaduras.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

Durante siglos, el ser humano ha sacado provecho y ha sufrido infecciones por acción de microorganismos en los alimentos (Doyle *et al.*, 2001).

Desde la antigüedad, los alimentos han sido relacionados con la transmisión de enfermedades. Hay una gran cantidad de pruebas que indican que los contaminantes biológicos son la causa principal de daño y que los alimentos que consumimos raramente son estériles, pues contienen microorganismos presentes y se multiplican, sobreviven e interaccionan en el alimento durante cierto tiempo.

En la mayoría de los casos, estos microorganismos no ejercen efecto aparente por lo que el alimento es consumido y sin consecuencias adversas. Los microorganismos manifiestan su presencia en los alimentos causando alteraciones, provocando enfermedades o transformando las propiedades de un alimento de forma benéfica, por ejemplo, la fermentación (Adams *et al.*, 1997).

El crecimiento microbiano en los alimentos es un proceso complejo gobernado por factores genéticos, bioquímicos y ambientales. La temperatura y la composición del alimento son los principales factores extrínsecos que influyen en el crecimiento microbiano (Doyle *et al.*, 2001).

Los microorganismos utilizan a los alimentos como fuente de nutrientes para su crecimiento y multiplicación ocasionando su alteración y deterioro (Frazier *et al.*, 1993).

Los alimentos pueden transferir una amplia gama de enfermedades al ser humano. En las enfermedades ocasionadas por los alimentos, estos actúan como vehículo

transmisor del microorganismo patógeno al consumidor, donde el microorganismo se multiplica ocasionando la enfermedad, es decir, el patógeno se multiplica en los alimentos y produce toxinas que pueden afectar la salud del consumidor (Prescott *et al.*, 2009).

Cuando se trata de microorganismos patógenos, su asociación con los alimentos es peligrosa desde el punto de vista de salud pública. Algunos alimentos toleran la reproducción de microorganismos patógenos o actúan como vectores del mismo, en este caso se intenta controlar su proliferación y multiplicación mediante tratamientos (Frazier *et al.*, 1993).

Dentro de un sistema de seguridad alimentaria, los controles establecidos en la Industria Alimentaria deben ser basados en las *Buenas Prácticas de Manufactura, Programas Pre-requisitos, limpieza y sanitización de áreas, equipos y manipuladores para detectar fuentes de contaminación (HACCP)*.

1.1. Seguridad alimentaria

Las cadenas de tratamiento de alimentos de la industria suelen ser entidades distintas que producen alimentos bajo un control constante. En este tipo de funcionamiento se puede hacer un cuidadoso análisis de riesgos microbiológicos y se puede aplicar un sistema de control interno eficaz para asegurar la calidad de los alimentos.

Durante las operaciones de preparación, elaboración y envasado de los productos alimenticios en una planta, la higiene y salud del personal, normas de manipulación

sanitaria, así como la limpieza y desinfección del área de trabajo, corren a cargo del inspector de sanidad de la planta.

Los principales objetivos que se persiguen al implementar criterios de evaluación microbiológica para plantas alimenticias son:

- Garantizar que los productos alimenticios sean aceptables desde el punto de vista de salud pública, es decir, que no sean responsables de la difusión de enfermedades infecciosas ni de intoxicaciones alimentarias.
- Garantizar que los productos alimenticios sean de calidad satisfactoria, es decir, que estén compuestos de materias primas de buena calidad que no se han deteriorado ni se han contaminado durante las operaciones de tratamiento, almacenamiento, manipulación y comercialización.
- Garantizar que los alimentos sean aceptables desde el punto de vista estético, en el sentido de evitar que se ensucien con material fecal, con restos de parásitos, etc.
- Garantizar que los alimentos tengan la calidad de conservación (Frazier *et al.*, 1993).

La inocuidad de los alimentos depende de la ausencia de microorganismos que producen intoxicaciones alimentarias y también de que no se produzca una contaminación microbiana masiva resultante por lo general de un almacenamiento incorrecto. Los alimentos limpios aparecen libres de suciedad visible y de alteración por microorganismos: los microorganismos que alteran los alimentos provocan intoxicaciones alimentarias y pueden estar presentes en grandes cantidades y no

haber alteración visible en el alimento. El objetivo de la higiene de los alimentos es la producción y distribución de *alimentos inocuos* (Hobbs, 1997).

1.2. Tipos de contaminación alimentaria

En seguridad alimentaria, un peligro es todo agente biológico, químico o físico presente en un alimento, capaz de provocar un efecto nocivo para la salud (FAO, 2015).

Los *peligros físicos* son cualquier material extraño presente en un alimento que proceda de las operaciones de elaboración o por contaminación externa, las posibles causas de este peligro son las malas prácticas por parte de los manipuladores (metales, anillos, aretes, etc.), por defectos en el proceso (restos de material de envasado, plásticos, vidrio, metales, etc.) o contaminación de la materia prima (huesos, espinas, perdigones, cáscaras de frutos secos, etc.). Aunque no suele ser muy frecuente su presencia, sus consecuencias pueden ser muy graves (Hyginov, 2002).

Los *peligros químicos* son sustancias químicas que pueden estar presentes de forma natural en los alimentos resultantes del metabolismo animal o vegetal como setas tóxicas, peces tóxicos, histamina, etc. También pueden estar presentes por una contaminación accidental con herbicidas, pesticidas, metales pesados, restos de productos de limpieza. Y pueden añadirse químicos intencionadamente, como conservantes y aditivos alimentarios, productos para el engorde animal, determinados antibióticos, etc. (Bravo, 2002).

Y los *peligros biológicos* los constituyen las bacterias, los parásitos, los hongos, los virus que causan toxiinfecciones alimentarias. Para que se produzca un efecto adverso implica el consumo de un número de microorganismos presentes en el alimento, que permite la multiplicación en el hospedador, generando la enfermedad.

Las intoxicaciones, se producen por ingestión de toxinas preformadas por los patógenos, como la toxina estafilocócica, producida por *Staphylococcus aureus* o la toxina botulínica, producida por *Clostridium botulinum*. El peligro biológico representa el mayor riesgo a la inocuidad de los alimentos (FAO, 2015).

1.3. Fuentes de contaminación biológica alimentaria

Los microorganismos en un alimento pueden estar presentes por algunas de estas fuentes de contaminación:

1.3.1. Carga microbiana propia del alimento

Los microorganismos son seres vivos muy pequeños, no visibles a simple vista y están presentes en todas las superficies exteriores de utensilios, aire, agua, alimentos y en cavidades internas del cuerpo que tienen conexión con el exterior como el tracto respiratorio y tracto digestivo.

En ocasiones, los microorganismos alteran los constituyentes de los alimentos de forma que los estabilizan permitiendo su mayor duración y proporcionan compuestos que confieren sabores característicos. También hay microorganismos alterantes de los alimentos, responsables de su deterioro de forma que se hacen inaceptables para los consumidores (Andino *et al.*, 2010).

1.3.2. Agua

El agua frecuentemente actúa como vehículo de transmisión de microorganismos. La materia fecal puede estar presente en una fuente de abastecimiento, siendo la forma más común de contaminación.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el agua es apta microbiológicamente para uso y consumo si se encuentra exenta de microorganismos patógenos de origen entérico y parasitario intestinal, ya que transmiten enfermedades tales como salmonelosis (*Salmonella*), shigelosis (*Shigella*), cólera (*Vibrio cholerae*), amebiasis (*Entamoeba histolytica*), alteraciones gastrointestinales (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter*); giardiasis (*Giardia lamblia*), criptosporidiosis (*Cryptosporidium*), esquistosomiasis (*Schistosoma*), desórdenes hepáticos (virus de hepatitis), etc. (Apella *et al.*, 2005).

Las condiciones microbiológicas del agua son fundamentales desde el punto de vista sanitario para uso en la Industria Alimentaria, ya que la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, establece que el agua debe cumplir con cuentas microbiológicas de coliformes totales no mayores a 2 UFC/100ml o 2 NMP/100 ml y con cuentas no detectables de coliformes fecales en 100 ml de muestra analizada.

Los análisis microbiológicos utilizados para determinar la calidad microbiológica del agua, se utilizan los siguientes grupos: coliformes fecales indicadores de contaminación fecal, bacterias aerobias mesófilas indicadoras de la eficacia del tratamiento de potabilización del agua y *Pseudomonas*, microorganismos indicadores de calidad del agua (Apella *et al.*, 2005).

1.3.3. Plagas

Las plagas constituyen una seria amenaza para la inocuidad de los alimentos. Pueden producirse infestaciones de plagas cuando se favorecen la proliferación y alimentos accesibles. Por tal motivo, la Industria Alimentaria debe adoptar buenas prácticas de higiene para evitar la formación de un medio que pueda conducir a la aparición de plagas (Fuentes, 2014).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el *Código Internacional Recomendado de Prácticas - Principios Generales de Higiene de los Alimentos*, se pueden reducir al mínimo las probabilidades de infestación mediante un buen saneamiento, la inspección de los materiales introducidos y una buena vigilancia, limitando así la necesidad de utilizar plaguicidas.

Los alimentos deben guardarse en recipientes a prueba de plagas y/o en almacenes por encima del nivel del suelo y lejos de las paredes. Deberán mantenerse limpias las zonas interiores y exteriores de las instalaciones de alimentos (Fuentes, 2014).

1.3.4. Manipuladores

Los manipuladores son considerados como la principal fuente de contaminación de los alimentos si sus hábitos higiénicos son deficientes, por su contacto directo y permanente con ellos en casi todos los eslabones de la cadena alimentaria. El riesgo de contaminación es mayor si la persona padece infecciones de la piel, respiratorias o del tracto gastrointestinal, toda vez que pueden ser portadores de microorganismos patógenos; si a ello se suman los malos hábitos de higiene

personal y del manejo de productos, se confirma que la contaminación de los alimentos es un problema en lo fundamental de personas (Prescal, 2012).

1.3.5. Ambiente de las instalaciones

Los alimentos antes, durante y después de ser procesados llegan a quedar expuestos al ambiente y pueden contaminarse con microorganismos. El medio ambiente es considerado como una importante fuente de contaminación o recontaminación de los alimentos, pero en las últimas décadas el entorno fue reconocido como una de las principales fuentes de contaminación pues actúa como reservorio final de microorganismos al igual que el suelo (Michanie, 2014).

1.3.6. Superficies inertes

Son considerados como todas las partes externas y/o internas de los utensilios que están en contacto con los alimentos y pueden ser un vehículo pasivo de microorganismos, o puede constituirse en la base material sobre la cual, debido a un aseo deficiente, entren en actividad y lleguen a introducirse en el alimento (FAO, 1991).

1.3.7. Contaminación cruzada

Es el proceso por el que los microorganismos son trasladados por medio de personas, equipos, materiales, de una zona sucia o contaminada a una zona limpia. Es causa muy frecuente de contaminación cuando se transportan de manera incorrecta alimentos crudos con otros ya procesados, al almacenar los productos procesados o semiprocados con alimentos crudos o cuando una manipulación

inadecuada de productos crudos y procesados y se manipulan unos y otros con las manos, o con utensilios sin higienizar (Prescal, 2012).

1.4. Limpieza, sanitización e higiene en la producción de alimentos

La normatividad sobre higiene de los productos alimenticios establece la obligación de la Industria Alimentaria de crear, aplicar y mantener un sistema de autocontrol basado en el *Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP)*. Uno de los aspectos esenciales del sistema *HACCP* es la higiene, ya que la calidad del producto depende de la limpieza que presenten los equipos y utensilios, así como las instalaciones. Se deben establecer prioridades en función de las superficies que tienen contacto directo con alimentos ejemplo: manos de manipuladores, superficies de contacto de equipos, hasta el medio ambiente donde se elaboran los alimentos, etc.

Un *programa de higienización* debe establecer un control de superficies que contactan con alimentos incluyendo manos de manipuladores, superficies de contacto esporádico o superficies que nunca contactan.

La *limpieza y sanitización* tienen que:

- Garantizar que las áreas de proceso se encuentren en condiciones higiénicas al inicio, durante y después de trabajar.
- Garantizar que el equipo y los utensilios de trabajo estén limpios al inicio de la jornada y que se limpien durante su utilización, cuando se contaminen y al finalizar la producción.
- Garantizar que los productos alimenticios no se contaminen durante la limpieza.

- Garantizar que los detergentes y desinfectantes (o sus restos) no entren en contacto directo o indirecto con el alimento y que no se produzca una nueva contaminación de superficies.

El objetivo principal de la limpieza y sanitización es combatir la proliferación y actividad de los microorganismos que pueden contaminar los alimentos y ser causa de su deterioro.

La industria alimentaria debe tener implementados programas de limpieza y desinfección que deberán asegurar que todas las partes de las instalaciones estén debidamente limpias, incluido el equipo de limpieza (Fuentes, 2014).

La *limpieza* es un proceso en el que la suciedad visible y microscópica se suspende o se disuelve en agua con la finalidad de eliminarla de una superficie. Aumenta la eficacia de la limpieza al aplicar técnicas de lavado como: fregado, duchado o agitado; también por el empleo de coadyuvantes químicos o de tensión superficial que emulsionan o suspenden las diferentes clases de suciedad (ICMSF., 2000).

Las superficies que presentan contacto directo con los alimentos y las zonas relacionadas con ellos se deben limpiar frecuentemente para eliminar residuos alimenticios, películas de grasa, depósitos minerales, acumulación de polvo que pueden ser factores de proliferación microbiana. La limpieza constituye un método eficaz de descontaminación, ya que más del 90% de los microorganismos se eliminan, pero no garantiza la destrucción total de estos (ICMSF, 2001).

La *sanitización* es el proceso encaminado a la eliminación de microorganismos por alteración de su estructura o de su metabolismo con el fin de impedir su reproducción y transmisión a los alimentos.

Los agentes sanitizantes son aquellos agentes químicos capaces de reducir a niveles insignificantes la tasa de microorganismos patógenos y otros. También se denominan a productos depuradores o de saneamiento de agua, utillaje y equipo de las fábricas de alimentos, en el mercado minorista y en los establecimientos donde se elaboren alimentos.

La actividad germicida de los sanitizantes depende de las condiciones de uso, como concentración, tiempo, temperatura, pH, dureza del agua, clase y cantidad de materia orgánica presente, características de la superficie, tipos y concentración de microorganismos a eliminar. Los sanitizantes no solo influyen en la eficiencia de la sanitización, sino también en la rapidez con que estas soluciones rebajan su fuerza, lo que determina con frecuencia que sea necesario repetir la operación de sanitización y volumen de sanitizante (García *et al.*, 2002).

1.5. Indicadores microbiológicos

Uno de los principales objetivos de la utilización de los microorganismos en la industria alimentaria es como indicadores de prácticas no sanitarias para revelar defectos de tratamiento que llevan consigo un peligro potencial, peligro que no está necesariamente presente en la muestra particular examinada, pero que es probable pueda encontrarse en muestras (CEEI, 2005).

Estos microorganismos advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de microorganismos patógenos en alimentos. Su detección en el laboratorio es más sencilla, rápida y económica (Doyle *et al.*, 2001).

1.5.1. Indicadores de calidad microbiana del proceso

1.5.1.1. Mesófilos aerobios

Los microorganismos mesófilos aerobios son el grupo más grande de indicadores de calidad de los alimentos. Se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de desarrollarse en un rango de temperatura entre 15-45°C, con un óptimo de 35°C, siendo el rango mínimo de 15-20°C y la temperatura máxima de 45°C. La mayoría de los agentes patogénicos humanos de origen alimenticio son mesófilos (Prescott *et al.*, 2009).

En productos terminados son empleados como indicadores de vida útil. El número de microorganismos mesófilos aerobios encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad más comúnmente utilizado. Tener recuentos elevado, significa:

- Contaminación de la materia prima.
- Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.
- La probabilidad de que estén presentes microorganismos patógenos.
- Alteración del producto, disminuyendo su vida útil (ICMSF., 2000).

En alimentos no perecederos una elevada carga microbiana de mesófilos aerobios es indicativo de uso de materia prima contaminada o de procesamiento insatisfactorio. Por el contrario, en alimentos perecederos indica almacenamiento a tiempos y temperaturas inadecuados.

Los mesófilos aerobios indican el grado de contaminación de una muestra y las condiciones que han favorecido o reducido la carga microbiana, es decir, indica la calidad sanitaria del alimento y se utiliza para monitorear la implementación de *Buenas Prácticas de Manufactura* (Andino *et al.*, 2010).

1.5.1.2. Hongos y levaduras

Los hongos y las levaduras son microorganismos eucariotas, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las levaduras son hongos con forma oval (5-20 μm) inmóviles y que se dividen por diversos mecanismos, especialmente por gemación (Tortora, 1993).

La mayoría de los hongos son pluricelulares o filamentosos y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio (Alexopoulos *et al.*, 1985).

Los hongos y levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, por lo que son frecuentes en la microflora de muchos alimentos; se dispersan fácilmente por el aire y el polvo.

Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo, pueden ser causantes de la descomposición. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde las condiciones no favorecen el crecimiento bacteriano: pH ácido, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a la irradiación.

Como grupo indicador son útiles para evidenciar grado general de contaminación en alimentos y ambientes. También son indicadores del riesgo de desarrollo de hongos en alimentos como frutos secos, especias, cereales y otros granos, y sus derivados (Doyle *et al.*, 2001).

1.5.1.3. Coliformes totales

Este grupo de microorganismos comprende géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, capaces de fermentar la lactosa y se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza, agua y suelo. También son habitantes normales del tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente. Los coliformes son bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, que a 35-37°C fermentan la lactosa con producción de ácido y gas (Madigan *et al.*, 2004).

El grupo coliforme está formado por los siguientes géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*.

Durante mucho tiempo se consideraron evidencia de contaminación fecal, pero muchos de ellos pueden vivir e incluso crecer en el suelo, el agua y otros ambientes.

Los coliformes consideran un excelente indicador de la eficiencia de los procesos, ya que su presencia representa mala calidad higiénica, falta de higiene en los manipuladores o recontaminación después de proceso, indicadores de calidad sanitaria en agua, vegetales, semillas y diversos productos. Estas si bien no son generalmente patógenas, son indicadores de presencia de microorganismos potencialmente patógenos y por lo tanto son un índice de deficiencias sanitarias (Perdomo *et al.*, 2001).

Los métodos convencionales para la determinación de coliformes se basan en la técnica de número más probable (NMP), método dado a conocer por McCrady en 1915, y consiste en un método estadístico en tres etapas y permite el hallazgo de cantidades muy bajas de coliformes empleando caldo lauril sulfato, seguido de la confirmación de tubos positivos de gas en caldo lactosa bilis (2%) verde brillante y la incubación a temperatura de 35-37°C (ICMSF, 2000).

También se pueden detectar por cuenta en placa utilizando agar bilis-rojo violeta (ABRV) en el cual las colonias fermentadoras de lactosa causan el vire del indicador; pueden detectarse por filtración en membrana (Millipore) e incubación en medios adecuados, por métodos rápidos como Petrifilm y reacciones cromogénicas o fluorogénicas (Alonso, *et al.*, 2008).

1.5.2. Indicadores de contaminación fecal

Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales, capaz de fermentar la lactosa a 44.5°C. Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por *E. coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal.

Los coliformes fecales y *E. coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su alta concentración en diferentes tipos de muestras. Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas. Esta denominación está ganando más

adeptos actualmente, pues sería una forma más apropiada de definir este subgrupo que se diferencia de los coliformes totales por la característica de crecer a una temperatura superior (Madigan *et al.*, 2004).

La presencia de alguno de los géneros coliformes en el alimento indica deficiencia las condiciones higiénicas del proceso y se transmiten por malos hábitos de manipulación en los alimentos, contaminación con heces de animales y humanos, uso de agua contaminada (Andino *et al.*, 2010).

1.5.2.1. *Escherichia coli*

Se caracteriza por ser coliforme termotolerante que fermenta lactosa a 44.5°C y produce indol a partir de triptofano y produce β -glucuronidasa, características que se usan para su identificación en laboratorio, generalmente en la etapa final del NMP o de alguno de los otros métodos, incluyendo Petrifilm.

Los criterios microbiológicos que incluyen *E. coli* son de utilidad para determinar contaminación fecal, ya que la contaminación de un alimento con esta bacteria implica el riesgo de que pueda encontrarse en el mismo, patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud. Sin embargo, la ausencia de *E. coli* no asegura la ausencia de patógenos entéricos (Andino *et al.*, 2010).

En los alimentos la presencia y concentración de *E. coli*, no necesariamente implica una contaminación fecal intensa reciente. Su número está influenciado por muchos factores crecimiento actual en el alimento, deficiencia en la limpieza del equipo, una contaminación posterior al proceso, contaminación cruzada o contaminación a partir de los manipuladores del alimento. Por lo que puede concluirse que la

contaminación fecal directa o indirecta, tuvo lugar en alguna fase de la obtención del alimento y que la seguridad sanitaria es deficiente y cuestionable (Hayes, 1993).

Las cepas de *E. coli* que provocan una enfermedad diarreica se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serotipos O:H diferentes. Estas clases incluyen: cepas de *E. coli* enteropatógenas (EPEC), enterotoxigenicas (ETEC), enteroinvasoras (EIEC), adherencias difusas (DAEC), enteroagregantes (EA_gEC) y enterohemorrágicas (Doyle, 2001).

1.5.2.2. Enterococos

Son microorganismos que se encuentran en el tracto intestinal y en vegetales, incluye dos especies: *E. faecalis* y *E. faecium*. Son un indicador de contaminación fecal; aunque se encuentran en cantidades menores por un orden de magnitud, en comparación con *E. coli*, tienen algunas ventajas como su mayor supervivencia. Se consideran indicadores en alimentos procesados, como lácteos y cárnicos, en los cuales *E. coli* puede no sobrevivir. Su presencia en alimentos indica prácticas sanitarias inadecuadas o la exposición del alimento a condiciones que permiten la reproducción de microorganismos indeseables.

1.5.2.3. *Clostridium perfringens*

Clostridium incluye bacterias anaerobias, bacilos Gram positivos, esporulados, por lo que pueden persistir en el alimento cuando la mayoría de los microorganismos entéricos han sido destruidos. Es habitante usual del tracto intestinal de muchos animales y es productor de tox infecciones alimenticias, sus esporas se destruyen a

temperaturas de 100° C y tienen como limitante para su crecimiento el oxígeno que puede ser tóxico. Crece a temperaturas de 6.5 a 53°C, con pH de 5.0 a 9.0.

Las esporas de *Cl. perfringens* son muy resistentes a los desinfectantes, no se multiplican en el sedimento por lo que se les considera un buen indicador cuando se sospecha de contaminación con protozoarios o virus, que generalmente no tienen relación con el hallazgo de coliformes o enterococos.

No son específicos de las heces humanas, altos recuentos de *Cl. perfringens* en el alimento previo a su consumo, puede llevar a la producción de la toxina in vivo en el consumidor.

1.5.3. Otros patógenos

1.5.3.1. *Staphylococcus aureus*

Cocos Gram positivos, que crecen en racimos, aerobio y anaerobio facultativo y catalasa positivos que necesitan una fuente de nitrógeno orgánico para poder crecer. La mayor parte de las cepas de *S. aureus* producen un pigmento dorado, se destruye lentamente a 60° C. Se encuentran en las fosas nasales, la piel y las lesiones de humanos y otros mamíferos y se utilizan como componentes de criterios microbiológicos para alimentos cocidos, para productos que son sometidos a manipulación excesiva durante su preparación y para aquellos que son sometidos a manipulación después del proceso térmico.

Altos recuentos en alimentos sometidos a procesos térmicos se deben a contaminación posterior a este tratamiento (manipulación, contacto con equipo o aire contaminado y/o conservación inadecuada del mismo, falta de refrigeración).

La presencia de *S. aureus* puede indicar un riesgo potencial para la salud. Un número elevado de estafilococos puede indicar la presencia de toxinas termoestables, no obstante, un recuento bajo no significa ausencia de las mismas, ya que una población numerosa pudo haberse reducido a un número más pequeño debido a una etapa del proceso, por ejemplo, calentamiento o fermentación (Andino *et al.*, 2010).

La principal fuente de contaminación de los alimentos por *Staphylococcus* se debe a la manipulación de estos por parte de personas portadoras, ya que los humanos son el principal reservorio de este microorganismo y el *S. aureus* es el patógeno más destacado de este género y puede sobrevivir por largos periodos de tiempo.

La presencia de *S. aureus* en un alimento se interpreta por lo general, como un indicador de contaminación a partir de la piel, boca o fosas nasales de los manipuladores, del material y equipos sucios y hasta de las materias primas de origen animal que pueden ser la fuente de contaminación.

Para el recuento de *S. aureus* se utilizan diversos medios específicos, que contienen agentes selectivos como el telurio de potasio, cloruro de litio, azida sódico, la glicina y la polimixina B (ICMSF, 2000).

1.5.3.2. *Listeria spp.*

Listeria spp. es un microorganismo que está distribuido ampliamente en la naturaleza y tiene características que le permiten sobrevivir y crecer en un amplio rango de condiciones ambientales (Doyle, 2001).

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos cortos, Gram positivos, regulares, no esporulados que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas agrupadas en forma de V o Y. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C, pero no a 37°C, debido a que la producción de flagelina se reduce a esta temperatura, en muchos medios de cultivo corrientes como los caldos de infusión de cerebro corazón (BHI) y caldo triptona de soya.

La listeriosis es una enfermedad de origen alimentario atípica de interés principal para la salud pública a causa de la gravedad y el carácter no entérico de la enfermedad (meningitis, septicemia, aborto), la proporción elevada de casos de muerte, un tiempo de incubación largo, y una predilección por individuos que tienen enfermedades subyacentes que conducen al deterioro de la inmunidad medida por las células T (Doyle, 2001).

Por sus características psicotróficas, es posible encontrarla en muestras ambientales de fábricas de alimentos especialmente en depósitos de agua a temperaturas relativamente bajas, incluyendo sistemas de enfriamiento, canales de drenaje y el agua acumulada en cámaras de refrigeración (Pascual *et al.*, 1999).

Las principales fuentes de contaminación de *Listeria spp.* dentro de las plantas procesadoras de alimentos son:

- Por medio de los manipuladores, a través de su ropa, batas, uniformes; por contacto directo del producto con la piel, polvo de los zapatos y suelo.
- Por animales que excretan la bacteria, contaminación cutánea por medio de vegetales crudos.

- Limpieza y desinfección inadecuadas del equipo.
- Por el medio ambiente, a través de bacterias que flotan en la humedad generada en las áreas de trabajo que pueden ser transportadas por el aire o agua.
- Por falla en la cadena de frío de los productos.
- Contaminación cruzada del alimento durante el procesamiento y empaque (Johansson, 1998).

Cuando la *Listeria monocytogenes* fue reconocido como patógeno importante para el hombre, vehiculizado a través de los alimentos, en todo el mundo se ha desarrollado una gran cantidad de métodos más efectivos para aislar el microorganismo (Frazier, 1993).

1.6. Métodos rápidos para la enumeración de microorganismos indicadores

Realizar análisis microbiológico tradicional es una tarea que consume gran cantidad de tiempo y trabajo, por ello se han desarrollado métodos rápidos, fáciles de utilizar, fáciles para cuantificar y detectar microorganismos, ya que en ocasiones es necesario dar resultados rápidos, que permitan tomar decisiones en periodos de tiempo corto, y no es posible, debido a que se debe esperar que los microorganismos crezcan en los medios de cultivo y lograr visualizar su presencia, su crecimiento es lento y a menudo los microorganismos de interés se encuentran en cantidades muy pequeñas con respecto a la flora microbiana restante, lo que implica un pre-enriquecimiento previo en medios selectivos, invirtiendo un tiempo mayor; finalmente, dependiendo del producto, superficie u otro fin a analizar, es necesario

realizar un tratamiento previo o purificación de los microorganismos, para evitar interferencias de la matriz en la que estos se encuentran.

Los métodos rápidos ofrecen la posibilidad de evitar algunos pasos de la técnica tradicional, es decir, ahorro de tiempo y trabajo. Pero no siempre se dispone de estos métodos y en ocasiones demandan altos costos. Estos métodos son un conjunto de técnicas microbiológicas, bioquímicas, fisiológicas, inmunológicas y serológicas para aislamiento más efectivo, detección, caracterización y enumeración más rápida de microorganismos en productos alimentarios y superficies.

Un método rápido es aquel que proporciona resultados en un tiempo menor al método tradicional y que además es sencillo y confiable como son: *sistemas de siembra en espiral, Iso-Grid, Redigel, Simplate, Petrifilm, etc.*, que permiten simplificar el proceso de siembra (Fung, 2002).

1.6.1. Sistemas de siembra en espiral

El *sistema de siembra en espiral* permite de forma rápida obtener el recuento de células viables mediante el uso de una aguja de siembra que distribuye en forma de espiral una muestra líquida en la superficie de una placa con agar, los medios de cultivo utilizados pueden ser o no selectivos. Esta espiral de “Arquímedes” produce un gradiente de concentración que va decreciendo desde el centro hasta la periferia de la placa a medida que rota sobre sí misma. El volumen de muestra que se deposita en cada zona de la placa es conocido y el tiempo requerido en realizar esta operación es de segundos, lo que contrasta con el elevado tiempo empleado en un sistema de siembra manual. Una vez que se ha depositado la muestra, la placa se

incuba a la temperatura adecuada para permitir el crecimiento de los microorganismos. El recuento puede realizarse manualmente o mediante un sistema automatizado. Entre las ventajas de esta técnica, destacan los costos relativamente bajos del material requerido, sencillez en su realización, ahorro de tiempo, así como minimización de errores debido a la automatización del método de recuento. El principal inconveniente descrito está relacionado con la posible obstrucción de la aguja de siembra con partículas pertenecientes a la matriz (De Santos, 2008).

1.6.2. Sistema Iso-Grid

El *sistema Iso-Grid*, es un método rápido aceptado por la AOAC International para la enumeración de bacterias, mohos y levaduras en muchos tipos de alimentos. Este sistema emplea un filtro de membrana (aproximadamente 0,45 µm de tamaño de poro) que lleva impreso una rejilla de características hidrofóbicas que delimita 1.600 cuadrados. Las líneas hidrofóbicas de la rejilla actúan como barreras que impiden la extensión de las colonias. El método requiere la utilización de unidades de filtración que se colocan en un soporte y se conectan a un sistema de vacío. Primero se realiza una filtración de la muestra a través de la unidad de filtrado (5 µm de tamaño de poro), mediante la aplicación de vacío, con el fin de eliminar partículas del alimento. La muestra prefiltrada pasa al filtro con rejilla hidrofóbica, y tras aplicar nuevamente vacío, éste se coloca sobre el medio de cultivo seleccionado. Finalizada la incubación, y el analista puede considerar el cuadrado que presenta crecimiento como una única colonia y así proceder a contar el número total de positivos en los 1.600 compartimentos (De Santos, 2008).

1.6.3. Método rápido Redigel

El *método rápido Redigel*, consiste en una serie de tubos que contienen un medio nutritivo líquido estéril y un gel de pectina. El medio no contiene agar, no necesita la aplicación de calor para fundirlo y conseguir su transformación a medio sólido. Para prepararlo, se requiere mezclar 1 ml de la muestra a analizar con el medio nutritivo presente en el tubo. El contenido resultante se dispensa en unas placas de petri recubiertas con calcio. La pectina del medio nutritivo procedente del tubo reacciona con el calcio de la placa y se produce la gelificación en frío. La placa se incuba convenientemente y el recuento de colonias se realiza de forma análoga al método de recuento estándar en placa (Fung, 2002).

1.6.4. Método rápido Simplate

El *método rápido Simplate* se basa en el empleo de una placa de plástico circular con 84 pocillos. Para el análisis de muestras con recuentos elevados, se emplean placas de 198 pocillos. La siembra se realiza en el centro de un reservorio en el que se dispensa 1 ml de la muestra de alimento convenientemente diluida y 10 ml del medio líquido rehidratado proporcionado por el fabricante. La mezcla (alimento/medio) se distribuye homogéneamente en los pocillos mediante movimientos circulares de la placa. Después de 24 horas de incubación a 35°C, la placa se sitúa bajo una fuente de luz ultravioleta. Los pocillos que presentan fluorescencia se consideran positivos. El número de pocillos positivos se convierte en valores del NMP gracias a la utilización de cuadros de conversión (Fung, 1981).

1.6.5. *Método rápido Petrifilm*

El **método rápido Petrifilm** está aceptado por la AOAC International para la enumeración de bacterias y consiste en utilizar una familia de placas listas para usarse con medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas de tamaño y grosor similar al de una tarjeta de crédito. El medio deshidratado contiene los compuestos selectivos para adaptar su uso a propósitos concretos, un componente que permite la gelificación en frío y colorantes para la tinción de las colonias desarrolladas, facilitando su identificación y recuento.

El medio deshidratado puede incluir sustratos para detectar microorganismos que presenten una actividad enzimática concreta. El medio se rehidrata al añadir la dilución de la muestra a analizar. Esta técnica requiere de la adaptación de la composición del medio y condiciones de trabajo del tipo de matriz que se parta, así como al tipo de microorganismos que se pretendan aislar. La principal ventaja del método Petrifilm consiste en que no requiere preparación previa de los medios de cultivo, lo que reduce costes y tiempo de preparación (De Santos, 2008).

Como se observa en el cuadro 1, se describen las principales diferencias entre el método de siembra tradicional y el método rápido Petrifilm.

Cuadro 1. Diferencias principales del método tradicional vs método rápido Petrifilm

Características	Método tradicional	Método rápido Petrifilm
Tiempo de siembra	Mayor	Menor
Tiempo de incubación de muestras	Mayor	Menor
Empleo de etapas de pre enriquecimiento	No siempre	No
Productividad en análisis realizados	Baja-media (Depende del analista)	Alta (Depende del analista)
Confiabilidad de resultados	Alta	Alta
Espacio de almacenamiento	Mayor	Menor
Residuos	Mayor	Menor
Costo	Alto	Ligeramente mayor
Validación de uso	NORMA Oficial Mexicana	AOAC International ISO AFNOR

Una placa Petrifilm tiene una película hidratable cubierta con nutrientes y agentes gelificantes.

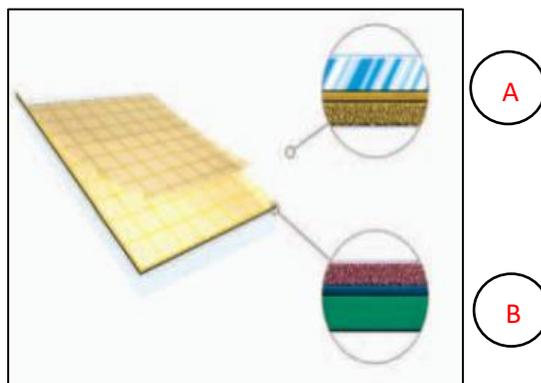


Figura 1. Estructura de placa Petrifilm

A. **Film superior.** Película de plástico cubierto con un adhesivo, indicador y gel soluble en agua fría.

B. **Film inferior.** Papel cuadriculado cubierto con un plástico, adhesivo, nutrientes de medio y gel soluble en agua fría.

1.6.5.1. *Placas Petrifilm para recuento de mesófilos aerobios (AC)*

Las placas Petrifilm para recuento de microorganismos mesófilos aerobios (Aerobic Count, AC) son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del agar *Standard Methods*, un agente gelificante soluble en agua fría, y un tinte indicador de color rojo (Cloruro de trifeniltetrazolio, *TTC*) que facilita el recuento de las colonias.

Las placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc.

Las placas Petrifilm AC en combinación con caldo MRS como diluyente e incubación anaerobia, permite el crecimiento de bacterias ácido lácticas heterofermentativas (productoras de gas) y homofermentativas. Las colonias son de color rojo a rojizo-café y pueden tener o no una burbuja de gas asociada. El caldo MRS propicia un fondo sombreado que resalta la producción de gas de los microorganismos heterofermentativos.

1.6.5.2. *Placas Petrifilm para recuento de coliformes (CC)*

Las placas Petrifilm para el recuento de coliformes (Coliform Count, CC) contienen nutrientes de bilis rojo violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, y un indicador tetrazolio, que facilita el recuento de las colonias.

La película superior atrapa el gas producido por los coliformes fermentadores de lactosa.

Las colonias de coliformes crecen en la placa Petrifilm CC y producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.

1.6.5.3. Placas Petrifilm para el recuento de *E. coli*/Coliformes (EC)

Las placas Petrifilm para el recuento de *E. coli*/Coliformes (placa Petrifilm EC) está compuesta por una lámina de papel con cuadrícula impresa recubierta de polipropileno que contiene nutrientes del medio bilis rojo violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de actividad de la glucuronidasa que facilita la enumeración de las colonias (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido).

El área donde se desarrollarán los microorganismos está definida por una película intermedia de espuma y se complementa en la parte superior con otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) como indicador.

La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce β -glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la placa Petrifilm EC, mientras que los coliformes son colonias rojas asociadas con gas.

Estas placas se incuban por 24 ± 2 horas a 35°C para cuantificar coliformes y *E. coli* en matrices de carne, aves y mariscos y 48 ± 2 horas a 35°C para cuantificar *E. coli* en matrices lácteas.

Las placas Petrifilm EC pueden ser usadas para la enumeración de coliformes y *E. coli* en diversos alimentos, así como para el monitoreo ambiental y superficial en áreas de procesamiento y manipuladores (3M, 2006).

1.6.5.4. Placas Petrifilm para el recuento de hongos y levaduras (YM)

La placa Petrifilm rápida para recuento de hongos y levaduras es un sistema con medio de cultivo listo para usar que contiene nutrientes complementados con antibióticos, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador para proporcionar contraste y facilitar la enumeración de las colonias. Los hongos, son colonias planas más grandes, de diversos colores, con bordes no definidos y focos centrales. Las levaduras son colonias típicamente pequeñas, con relieve, de color verde azulado con bordes delimitados.

Estas placas determinan la población de hongos y levaduras en un periodo de tiempo de entre 48-60 horas con una temperatura de incubación de 27°C , pueden ser usadas para la enumeración de estos microorganismos en diversos alimentos, materias primas, así como para el monitoreo ambiental y superficial en áreas de procesamiento (3M, 2013).

HIPOTESIS

La evaluación de condiciones higiénico-sanitarias mediante análisis microbiológicos con técnica de siembra rápida de microorganismos indicadores ayuda a identificar riesgos microbiológicos potenciales de contaminación en menor tiempo para proponer mejoras en los controles implementados de la planta maquiladora.

OBEJTIVOS

Objetivo General:

Evaluar las condiciones higiénico-sanitarias en la elaboración y envasado de alimentos en polvo mediante análisis microbiológicos con técnica de siembra rápida de microorganismos indicadores para identificar riesgos microbiológicos potenciales de contaminación y asegurar inocuidad en los productos y procesos.

Objetivos Específicos:

- Realizar una auditoría de levantamiento para definir fuentes de contaminación procedente de equipos, manipuladores y medio ambiente de áreas de proceso.
- Aplicar técnica de muestreo para recolección de muestras y técnica de siembra del método rápido Petrifilm para los análisis de equipos, manipuladores y medio ambiente para reducir tiempos en la entrega de resultados.

- Comparar los resultados microbiológicos obtenidos con el método rápido Petrifilm contra los límites microbiológicos establecidos por la planta envasadora de alimentos obtenidos de la aplicación de método de siembra tradicional.
- Proponer recomendaciones en los controles implantados de la planta envasadora de alimentos en polvo para mejorar su sistema de calidad e inocuidad.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los análisis microbiológicos con técnica de siembra rápida se empleó lo siguiente:

2.1 Materiales y reactivos

- Campana de flujo laminar (Placas de México S.A. de C.V., México, D.F.)
- Difusores de 20 y 30 cm² de área
- Incubadora a temperatura de 25-27°C (Ríos Rocha S.A., México D.F.)
- Incubadora a temperatura de 35-37°C (Ríos Rocha S.A., México D.F.)
- Pipeta electrónica (3M, USA)
- Placas Petrifilm para bacterias mesófitas aerobias AC (3M)
- Placas Petrifilm para *E. coli* y Coliformes Totales EC (3M)
- Placas Petrifilm para levaduras y hongos YM (3M)
- Puntas estériles de capacidad de 5mL
- Hisopos con 1 mL de caldo Letheen
- Alcohol etílico de 96° al 70% (Marca CH)
- Disolución reguladora de fosfatos estéril preparada de acuerdo con NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico".

2.2 Método

Para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en el proceso de elaboración y envasado de alimentos en polvo en una planta maquiladora se propuso el siguiente proceso que consta de tres etapas:

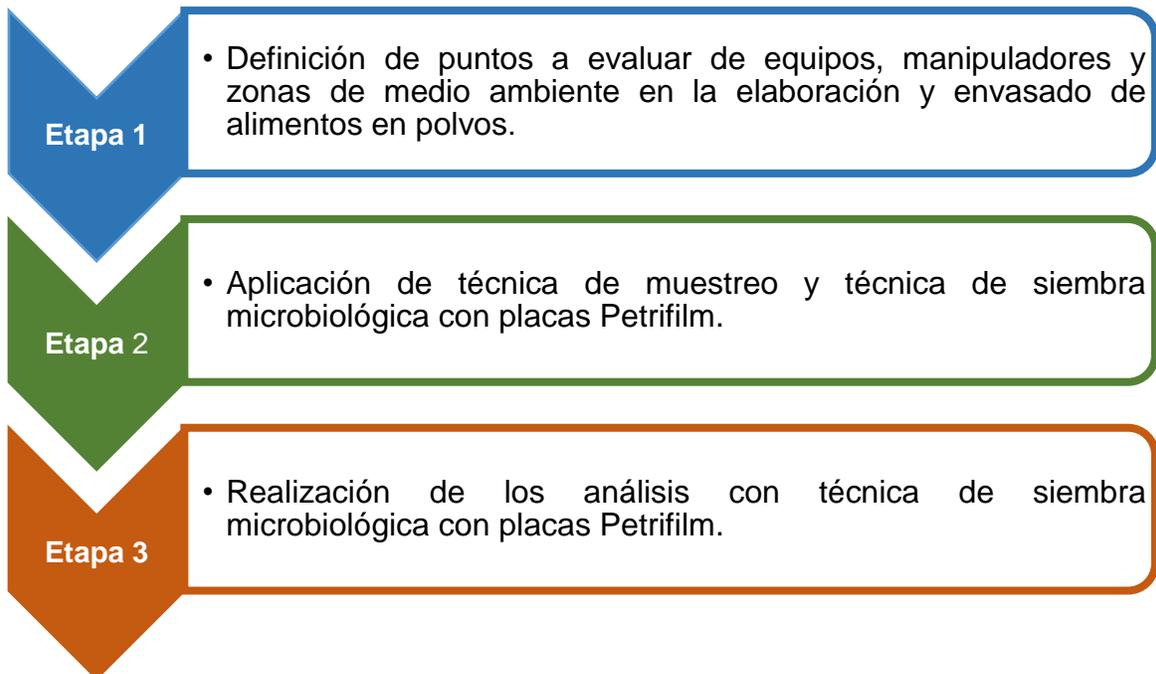


Figura 2. Diagrama general de las etapas para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en una planta maquiladora

ETAPA 1. Definición de puntos a evaluar de equipos, manipuladores y zonas de medio ambiente en la elaboración y envasado de alimentos en polvos

Esta primera etapa consta de cuatro pasos (Figura 3), para la definición de los puntos a muestrear para el análisis microbiológico con método Petrifilm

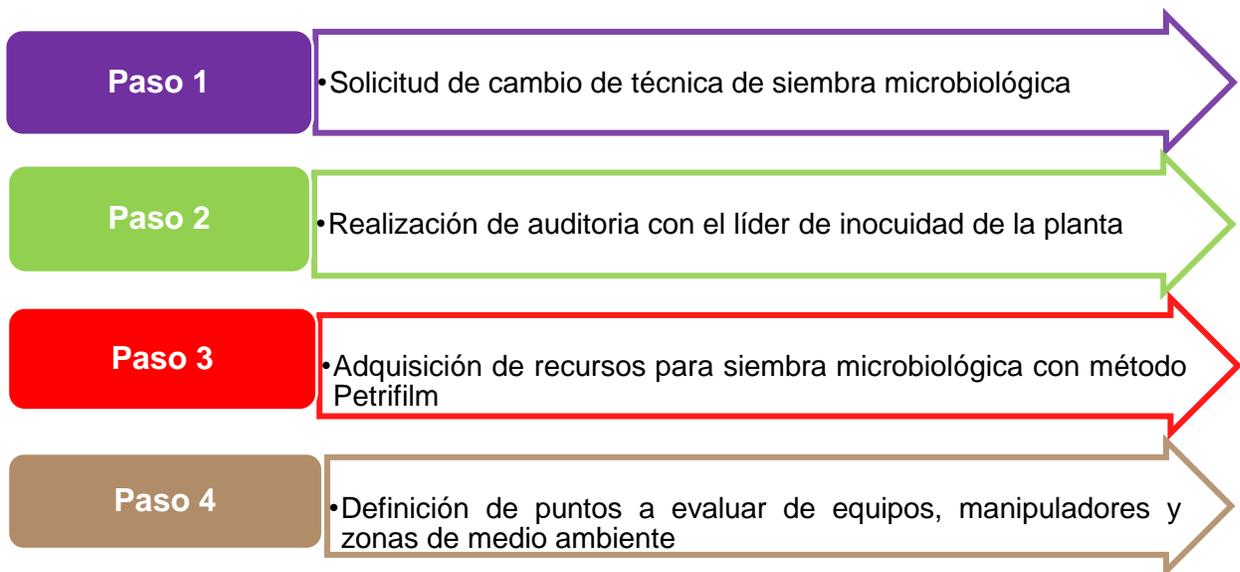


Figura 3. Diagrama general de la primera etapa

Paso 1. Solicitud de cambio de técnica de siembra microbiológica

La técnica de siembra microbiológica tradicional se realizaba en la planta maquiladora de alimentos en polvo para los análisis a materia prima, producto terminado, equipos, manipuladores y medio ambiente.

Los análisis para materia prima y producto terminado son análisis frecuentes, es decir, se realizan por lote de producto. Sin embargo, para los equipos, manipuladores y medio ambiente los análisis microbiológicos no se realizaban

periódicamente y no contaban con una frecuencia establecida, debido al tiempo que la técnica de siembra tradicional requiere por parte del analista de microbiología.

Se solicita a nivel gerencial, la adquisición de placas con medio deshidratado para agilizar en tiempo y en la obtención de resultados, mostrando las ventajas que tiene el método Petrifilm en comparación con el método tradicional, teniendo una respuesta favorable para su implementación como técnica de siembra microbiológica en la planta maquiladora.

Paso 2. Realización de auditoria con el líder de inocuidad de la planta

Se realiza auditoria interna, bajo el protocolo de evaluación del líder de inocuidad para definir los factores de contaminación con mayor riesgo para el proceso de elaboración y envasado de alimentos en polvo.

Las puntuaciones con mayor vulnerabilidad fueron:

- *Equipos de mezclado y envasado*, para la evaluación de la limpieza de las zonas que se encuentran en contacto directo con el producto y la rotación de uso que tienen los equipos con diferentes productos y la carga microbiana de origen.
- *Manipuladores*, para la revisión y evaluación de que cumplen con la ejecución de las buenas prácticas de manufactura, orden y limpieza del área alimentadora de los mezcladores y maquinas envasadoras, siendo el factor más crítico los manipuladores que tienen contacto directo con el producto.

- *Medio ambiente*, para la evaluación de contaminación generada por los productos en polvo en zonas donde se realizan operaciones de pesado de materias primas, mezclado y envasado.

Por lo que se definieron, los puntos a muestrear de equipos con mayor uso y rotación de productos, los manipuladores que tienen contacto directo con el producto y para el medio ambiente de las zonas donde se llevan a cabo actividades de pesado, mezclado y envasado del producto, debido a la dispersión de partículas en el ambiente en el manejo de la materia prima, producto mezclado o envasado del producto en polvo.

Paso 3. Adquisición de recursos para siembra microbiológica con método Petrifilm

Las placas Petrifilm se adquieren con Distribuciones Biotecnológicas S.A. de C.V., distribuidor autorizado de la marca 3M, que brinda al sector alimentario asesoría con el método Petrifilm y se pone a disposición de las necesidades de las empresas con personal calificado para la implementación de las metodologías de uso de las placas.

Paso 4. Definición de puntos a evaluar de equipos, manipuladores y zonas de medio ambiente

Los puntos para muestrear se definieron con base en una auditoría realizada en las instalaciones de la planta maquiladora y se muestran en el cuadro 2:

Cuadro 2. Puntos para muestrear para análisis microbiológico

EQUIPOS	MANIPULADORES	AMBIENTE
Mezclador 1 (MEZ 1)	Pesador 1 (MAN 1)	Cubículo de mezclador 1 (AMB 1)
Mezclador 2 (MEZ 2)	Pesador 2 (MAN 2)	Cubículo de mezclador 2 (AMB 2)
Mezclador 3 (MEZ 3)	Mezclador 1 (MAN 3)	Cubículo de mezclador 3 (AMB 3)
Mezclador 4 (MEZ 4)	Mezclador 2 (MAN 4)	Cubículo de mezclador 4 (AMB 4)
Mezclador 5 (MEZ 5)	Mezclador 3 (MAN 5)	Cubículo de mezclador 5 (AMB 5)
Línea envasadora 1 (LEN 1)	Alimentador de línea 1 (MAN 6)	Cubículo de envasadora 1 (AMB 6)
Línea envasadora 2 (LEN 2)	Alimentador de línea 2 (MAN 7)	Cubículo de envasadora 2 (AMB 7)
Línea envasadora 3 (LEN 3)	Alimentador de línea 3 (MAN 8)	Cubículo de envasadora 3 (AMB 8)
Línea envasadora 4 (LEN 4)	Alimentador de línea 4 (MAN 9)	Cubículo de envasadora 4 (AMB 9)
Línea envasadora 5 (LEN 5)	Alimentador de línea 5 (MAN 10)	Cubículo de envasadora 5 (AMB 10)

ETAPA 2. Aplicación de técnica de muestreo y técnica de siembra microbiológica con placas Petrifilm

La etapa 2 consta cinco de pasos mostrados en la Figura 4, para el establecimiento de técnica de muestreo y siembra microbiológica de equipos, manipuladores y medio ambiente con placas Petrifilm:

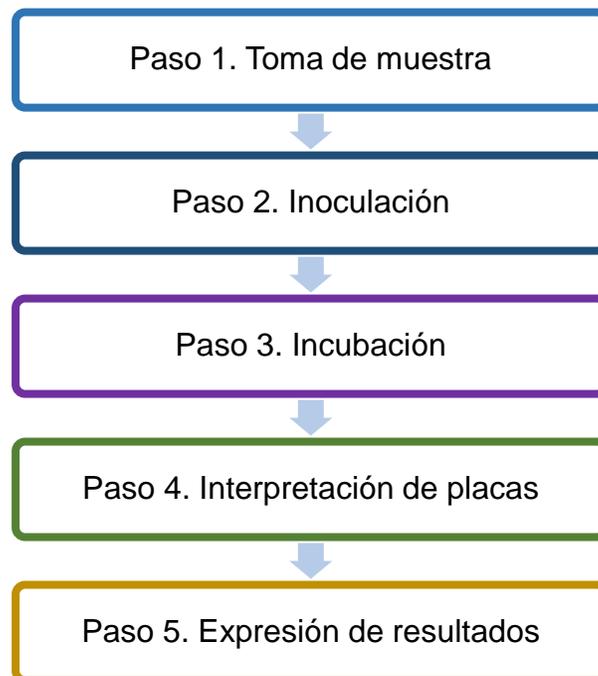


Figura 4. Diagrama general de la segunda etapa

Paso 1. Toma de muestra

1.1. Equipos

- a) Se rotuló el hisopo con el nombre de identificación del equipo y zona a muestrear para el análisis microbiológico.
- b) Se sostuvo el hisopo con el bulbo con el dedo pulgar.

- c) Se presionó los lados del bulbo y doblar a un ángulo de 45° hasta escuchar que la válvula se rompe, permitiendo que el diluyente de caldo letheen fluya hacia el interior del tubo y humedezca el hisopo.
- d) Se presionó el bulbo para transferir la totalidad del diluyente de caldo letheen al interior del tubo del hisopo.
- e) Se giro y jalo del bulbo para sacar el hisopo del tubo.
- f) Se sostuvo el hisopo en un ángulo de 30° con respecto a la superficie a muestrear, tener cuidado suficiente de no contaminar el hisopo al tocar zonas internas del mismo.
- g) Se frotó el hisopo en un área de 10X10 cm del equipo que haya tenido contacto directo con el producto, para tener un total de área muestreada de 100 cm².
- h) Se insertó el hisopo nuevamente en el tubo para completar el muestreo.
- i) Se transportó el hisopo a laboratorio.
- j) La inoculación de la muestra se debe llevar a cabo en un lapso no mayor a 24 horas para obtener resultados confiables, mientras tanto, mantener la muestra a una temperatura de refrigeración de 4°C.

1.2. Manipuladores

- a) Se llevo a cabo la repetición de los pasos del a al f del punto 1.1. toma de muestra de equipos.
- b) Se solicitó al manipulador que extienda sus manos.
- c) Se sostuvo el hisopo en un ángulo de 30° con respecto a las manos del manipulador a muestrear y realizar frotis en la parte palmar y dorsal, entre

los dedos, uñas, cutícula y áreas del antebrazo que pudieran estar descubiertas por parte del manipulador.

- d) Se llevaron a cabo los pasos del *h* al *j* del punto 1.1. toma de muestra de equipos.

Paso 2. Inoculación

2.1. Equipos y manipuladores

- a) Se encendió el mechero Fisher sobre la plancha de la campana de flujo laminar para iniciar con la inoculación.
- b) Se tomó de sus respectivos empaques, una placa Petrifilm para inocular microorganismos mesófilos aerobios AC, una placa Petrifilm para inocular levaduras y hongos YM y una placa Petrifilm para inocular coliformes totales-*E. coli* EC.
- c) Se colocó la muestra en una gradilla metálica limpia.
- d) Se tomaron 2 mL de solución reguladora de fosfatos con la pipeta electrónica y una punta estéril.
- e) Se tomaron de la gradilla metálica, el hisopo con la mano izquierda y acercarlo a la zona estéril generada con el mechero Fisher.
- f) Se levantó el bulbo del hisopo y agregar los 2 mL de solución reguladora de fosfatos sin tocar la boquilla del tubo con la punta estéril para evitar contaminación.
- g) Se bajo de nuevo el bulbo del hisopo y verificar que este bien sellado.

- h) Se agitó vigorosamente el hisopo por 10 segundos para liberar las bacterias de la punta del hisopo y homogenizar los 2 mL de solución reguladora de fosfatos estéril adicionales con el caldo letheen.
- i) Se colocó de nuevo el hisopo en la gradilla metálica y retirar de la zona del trabajo el frasco del que se tomaron los 2 mL de solución reguladora de fosfatos.
- j) Se acercó a la zona estéril del mechero las placas.
- k) Se levantó el bulbo del hisopo y exprimir el contenido de la punta del hisopo contra la pared del tubo.
- l) Se retiró el hisopo del tubo que contiene la muestra.
- m) Se esterilizó la punta del hisopo con el mechero y tirar al bote de desechos biológicos.
- n) Se utilizó el dedo pulgar para doblar el tubo del hisopo en un ángulo de 90° en la marca más alta que tenga diluyente por encima de ella.
- o) Se levantó la película superior de la placa Petrifilm con el dedo pulgar e índice de la mano izquierda teniendo cuidado de no tocar la parte interna de la placa para evitar contaminación.
- p) Se vertió 1 mL de la muestra del tubo del hisopo.
- q) Se bajo con cuidado la película superior de la placa Petrifilm para evitar la captura de aire y formación de burbujas en la placa inoculada.
- r) Se tomo el dispersor y colocarlo sobre la placa Petrifilm inoculada.
- s) Se presionó suavemente el dispersor para distribuir la muestra sobre el área circular. Se recomienda no girar, ni deslizar el dispersor sobre la

placa para no generar burbujas y mantener la dispersión uniforme de la muestra en la placa.

- t) Se retiró el dispersor de la placa y esperar aproximadamente 1 minuto que solidifique el gel.
- u) Se repitió desde el punto “n” al “t” para las dos placas restantes.
- v) Se procedió a la incubación de las placas.

2.2. Toma de muestra e inoculación medio ambiente

- a) Se encendió el mechero Fisher sobre la plancha de la campana de flujo laminar para hidratar una placa Petrifilm para bacterias mesófitas aerobias AC y otra placa Petrifilm para levaduras y hongos YM con solución reguladora de fosfatos estéril.
- b) Se abrió un frasco de solución reguladora de fosfatos estéril en una zona cerca del mechero.
- c) Se tomó 1 mL de solución reguladora de fosfatos con la pipeta electrónica y una punta estéril.
- d) Se levantó la película superior de la placa Petrifilm con el dedo pulgar e índice de la mano izquierda teniendo cuidado de no tocar la parte interna de la placa para evitar contaminación.
- e) Se vertió 1 mL de la solución reguladora de fosfatos estéril sobre la placa.
- f) Se bajo con cuidado la película superior de la placa Petrifilm para evitar la captura de aire y formación de burbujas en la placa hidratada.
- g) Se tomó el dispersor y presionar suavemente el dispersor para distribuir la muestra sobre el área circular. No girar, ni deslizar el dispersor sobre la placa

para no generar burbujas y mantener la dispersión uniforme de la solución hidratante en la placa.

- h) Se retiró el dispersor de la placa y se esperó aproximadamente 1 minuto que solidifique el gel.
- i) Se repitió desde el punto "c" al "i" para las placas que requieren ser hidratadas para el análisis de medio ambiente.
- j) Se refrigeraron las placas durante 2 horas⁸ antes de ser utilizadas.
- k) Se colocó las placas hidratadas en una bolsa whirl pak estéril.
- l) Nos trasladamos al área a la que se le realiza el análisis microbiológico.
- m) Se ubicó una zona estratégica del área para colocar la placa hidratada.
- n) Se sacó de la bolsa whirl pak una placa hidratada de mesófilos aerobios y una placa de levaduras y hongos YM.
- o) Se rotularon las placas con el nombre del área a la que se le realiza el análisis microbiológico.
- p) Se levantó la película superior de la placa hidratada y con cinta adhesiva para fijar las placas a la pared o superficie cercana a exposición del producto alimenticio.
- q) Se expusieron las placas por no más de 15 minutos al medio ambiente.
- r) Se retiraron las placas expuestas de la superficie y se bajó cuidadosamente la película superior.
- s) Se hizo una ligera presión sobre la placa y se guardó las placas en las bolsas whirl pak.
- t) Se regresó a laboratorio para incubar las placas.

Paso 3. Incubación

La incubación de las placas inoculadas se realiza en las siguientes temperaturas de acuerdo con el tipo de microorganismo y periodo establecido, mostrado en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Temperaturas y tiempo de incubación microbiana

Microorganismo	Temperatura	Periodo de Incubación
Mesófilos Aerobios	35°C ± 1°C	48 ± 3 horas
<i>E. coli</i>	35°C ± 1°C	48 ± 2 horas
Coliformes Totales	35°C ± 1°C	24 ± 2 horas
Hongos y Levaduras	25-28 °C	48-60 horas

Paso 4. Interpretación de placas

La morfología de las colonias a contar de cada placa se describe a continuación, con las consideraciones de lectura del crecimiento microbiano:

4.1. Mesófilos aerobios AC

El crecimiento en las placas Petrifilm para microorganismos mesófilos aerobios AC se da en colonias puntiformes de color rojo (Figura 5)

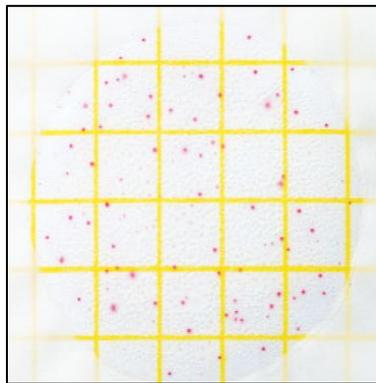


Figura 5. Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios en placa Petrifilm

Consideraciones de lectura en placas Petrifilm de microorganismos mesófilos aerobios AC:

1. El rango recomendado de recuento en la placa Petrifilm es de 25 a 250 colonias.
2. Cuando el número de colonias es mayor a 250 (Figura 6), por su excesivo crecimiento, los recuentos deben ser estimados. Se debe determinar el promedio de colonias en un cuadrado (1 cm²) y multiplicarlo por 30 para obtener el recuento total por placa. El área de inoculación de la placa Petrifilm es de 30 cm².

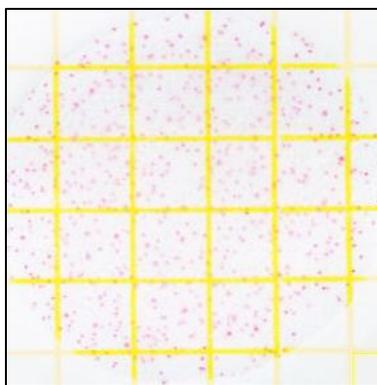


Figura 6. Bacterias mesófilas aerobias con leyenda de valor estimado por el crecimiento excesivo de colonias

3. Se determina la leyenda “muy numeroso para contar” cuando el crecimiento en las placas se da en la siguiente manera y requiere de una repetición de análisis de la muestra pues el crecimiento excesivo asume una carga microbiana elevada:
 - a) Placa con colonias muy pequeñas y numerosas para contar (Figura 7).
 - b) El área total de crecimiento de la placa puede virar o colorearse rosa, indicando crecimiento excesivo (Figura 8).
 - c) La distribución de crecimiento de las colonias puede aparecer de forma desigual, no homogénea (Figura 9).

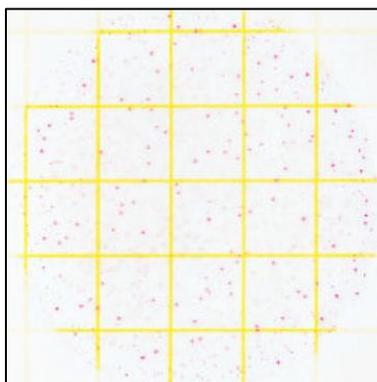


Figura 7. Placa con colonias muy pequeñas y numerosas para contar

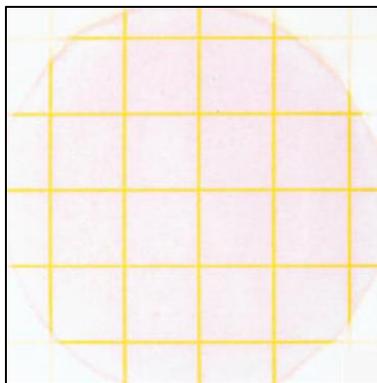


Figura 8. Placa con vire indicando exceso de crecimiento microbiano

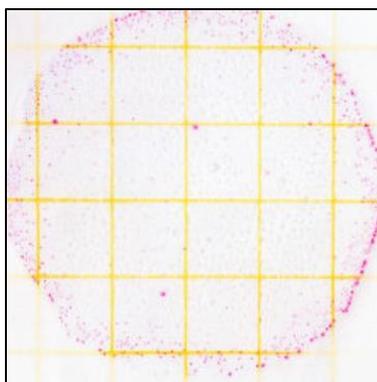


Figura 9. Distribución de crecimiento microbiano no homogéneo

4.2. *E. coli* Coliformes totales EC

La morfología característica del crecimiento microbiano en placas Petrifilm EC es:

Para *E. coli*, colonias de color azul y rojo-azul asociadas con gas atrapado en la placa, dentro del diámetro aproximado de una colonia.

Para coliformes presentes la morfología característica son colonias rojas asociadas a gas.

El valor de Coliformes Totales es el recuento de las colonias rojas y azules asociadas con gas (Figura 10).

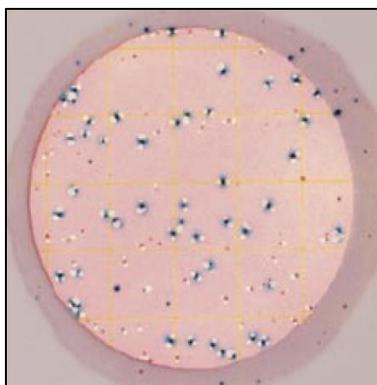


Figura 10. Crecimiento de 49 colonias de *E. coli* y 38 colonias características de coliformes presentes, por lo tanto, coliformes totales equivale a 87 colonias

Consideraciones de lectura en placas Petrifilm Coliformes totales- *E. coli* EC:

1. El rango de recuento de la población en las placas Petrifilm EC es de 15 a 150. No contar las colonias que aparecen sobre y fuera de la barrera de espuma, ya que han sido removidas de la influencia del medio selectivo (Círculos de Figura 11).

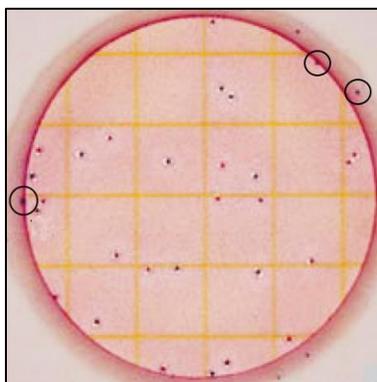


Figura 11. Crecimiento óptimo de colonias para su recuento

2. El recuento estimado de coliformes totales se da en las placas que contienen más de 150 colonias (Figura 12), al contar el número de colonias en uno o más de los cuadrados representativos y al determinar el promedio por cuadrado. Multiplicar el número promedio por 20 y determine el conteo

estimado por placa. El área circular de crecimiento es de aproximadamente 20 cm².

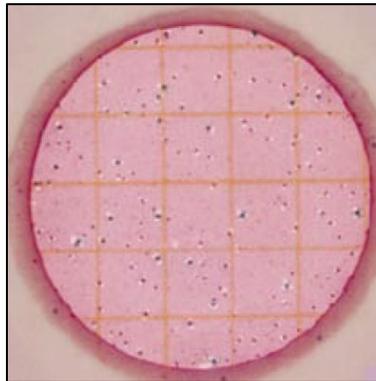


Figura 12. Recuento estimado por crecimiento mayor a 150 colonias de coliformes

3. Se determina la leyenda “muy numeroso para contar” cuando el crecimiento en las placas se da en la siguiente manera:

a) Muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y el oscurecimiento del gel de un color rojo a un azul púrpura (Figura 13)

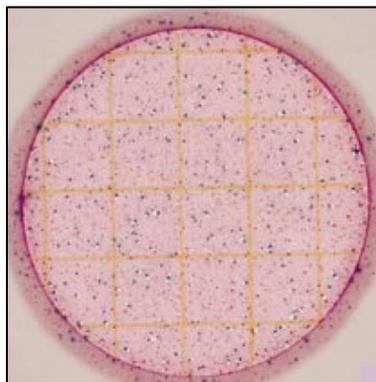


Figura 13. Crecimiento excesivo de colonias, vire del medio

b) Una alta concentración de *E. coli* puede causar que el área de crecimiento se haga azul púrpura (Figura 14).

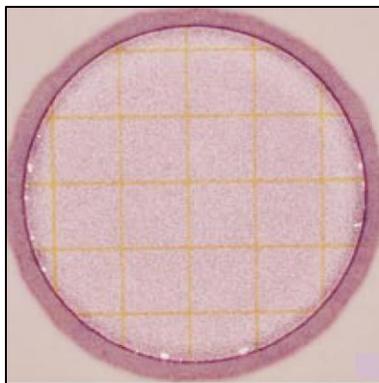


Figura 14. Crecimiento excesivo de *E. coli*, vire del medio a azul

- c) Cuando existen cifras altas de coliformes y las colonias produzcan menos gas y las colonias azules pueden ser menos definitivas (Figura 15). Contar todas las colonias azules sin gas y/o zonas azules como *E. coli*, preferentemente aislar las colonias azules con gas para su mejor identificación.

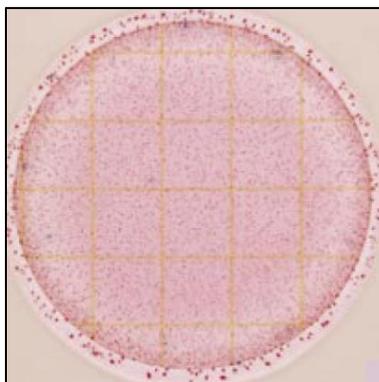


Figura 15. Crecimiento excesivo de microorganismos coliformes

- d) Cuando un número alto de organismos no coliformes, como *Pseudomonas*, estén presentes en las placas Petrifilm EC, el gel puede volverse amarillo (Figura 16).

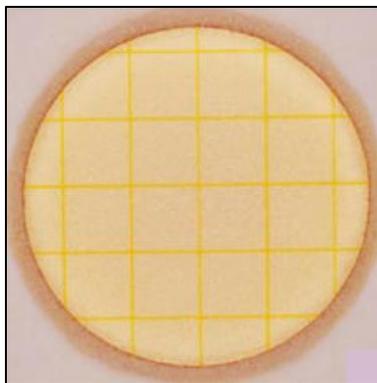


Figura 16. Crecimiento de otros microorganismos en la placa, *Pseudomonas*

4. Los ejemplos 1 a 10 (Figura 17) muestran varios patrones de burbujas asociados con colonias que producen gas. Todas deben ser consideradas en el recuento.

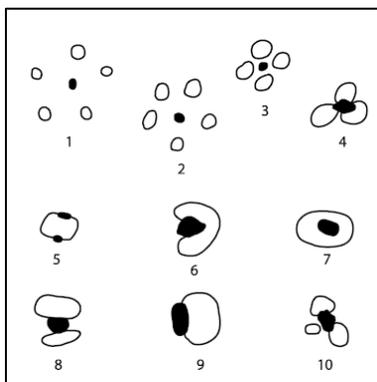


Figura 17. Morfología de colonias con burbuja a considerar en el recuento

4.3. Hongos y levaduras YM

La morfología característica del crecimiento en las placas Petrifilm levaduras y hongos YM es la siguiente:

Levaduras: Colonias pequeñas, tienen bordes definidos, de color rosa-tostado a azul-verdoso, las colonias pueden aparecer elevadas (3 dimensiones) y con color uniforme (Figura 18).

Hongos: Colonias grandes, con bordes difusos, color variable azul verdoso a variable con la incubación prolongada, las colonias aparecen planas y con un centro oscuro con borde difuso (Figura 19).



Figura 18. Morfología de crecimiento de levaduras en placa Petrifilm YM

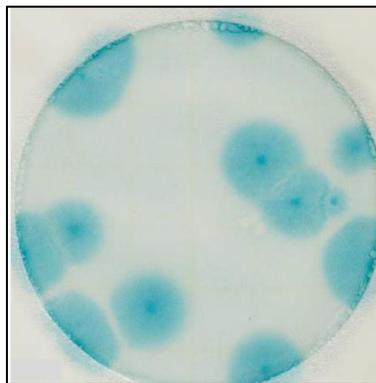


Figura 19. Morfología de crecimiento de hongo en placa Petrifilm YM

Consideraciones de lectura en placas Petrifilm levaduras y hongos YM

- a) Cuando el número de colonias de levaduras u hongos sobrepasan 150, se debe hacer una estimación, realizar el conteo promedio de un cuadrado y multiplicar por 30 para obtener el recuento total por placa. El área inoculada de una placa Petrifilm levaduras y hongos es de aproximadamente 30 cm².
- b) Se considera como muy numeroso para contar cuando el crecimiento de levaduras y hongos contiene un elevado número de colonias y se distingue

en la placa pigmentación en zonas de la placa incluso en los bordes de la placa.

- c) Si aparecen colonias débiles, es decir, ligera pigmentación, no está bien definido que microorganismo es, dejar un período adicional de 12 horas de tiempo de incubación para mejorar la interpretación (Figura 20).

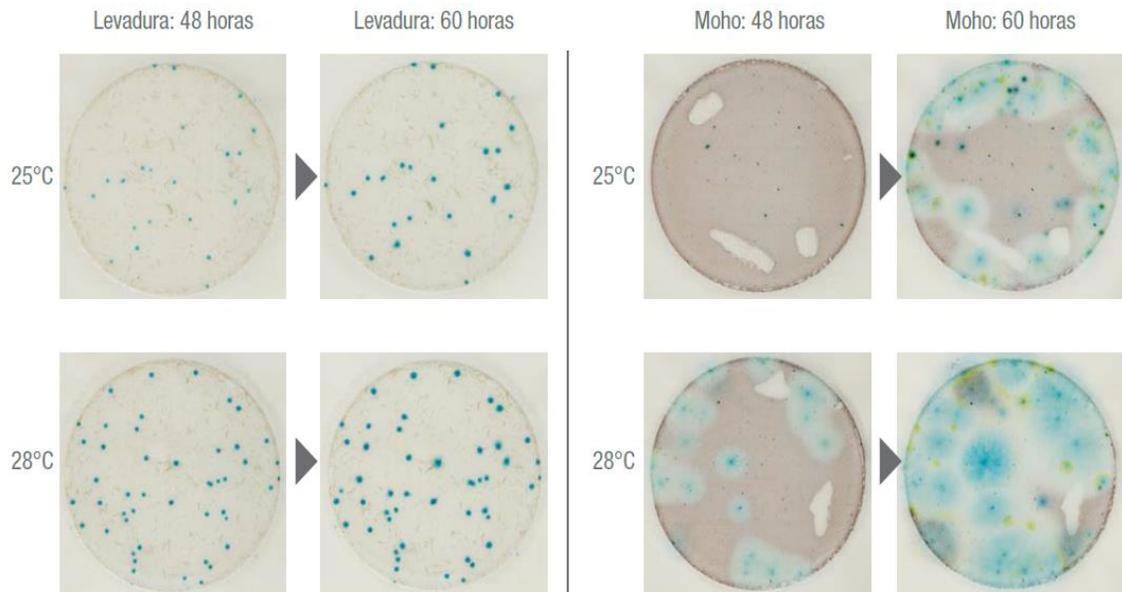


Figura 20. Influencia de tiempo/temperatura en la mejora del crecimiento para una mejor interpretación y recuento

Paso 5. Expresión de resultados

Para los análisis de equipos y manipuladores se debe realizar el siguiente cálculo una vez que se haya realizado el recuento de cada una de las placas para obtener el recuento total, debido a la dilución que se realizó para su inoculación:

$$\text{Colonias contadas por placa} \times \text{Volumen del diluyente} = \text{Recuento total} / \text{muestra}$$

Para los análisis de medio ambiente por exposición en placa no requiere de ningún calculo adicional, solo se realiza el recuento del crecimiento por placa y por tipo de microorganismo.

Los resultados obtenidos de los análisis deben ser comparados con el siguiente cuadro de límites microbiológicos permisibles, establecido por la planta envasadora de alimentos en polvo, cuando se realizaba por método tradicional:

Cuadro 4. Límites microbiológicos establecidos con método tradicional

Muestra/Análisis	Mesófilos Aerobios	Coliformes Totales	<i>E. coli</i>	Levaduras y Hongos
Equipos (UFC/100 cm ²)	1000	10	Ausencia	100
Manipuladores (UFC/mano)	1000	10	Ausencia	100
Medio Ambiente (UFC/área)	100	No aplica	No aplica	100

UFC: Unidades formadoras de colonias

Etapa 3. Realización de los análisis con técnica de siembra microbiológica con placas Petrifilm

Los análisis microbiológicos para equipos, manipuladores y medio ambiente se realizaron en las instalaciones del laboratorio de Microbiología de la planta maquiladora de alimentos en polvo, con repeticiones mensuales hasta completar cinco análisis de cada muestra.

En el cuadro 5 se muestra la programación y realización de los análisis microbiológicos a equipos, manipuladores y medio ambiente:

Cuadro 5. Programación de los análisis microbiológicos

No. de análisis	Fecha de análisis
A1	10 de agosto del 2016
A2	13 de septiembre del 2016
A3	19 de octubre del 2016
A4	16 de noviembre del 2016
A5	14 de diciembre del 2016

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Equipos

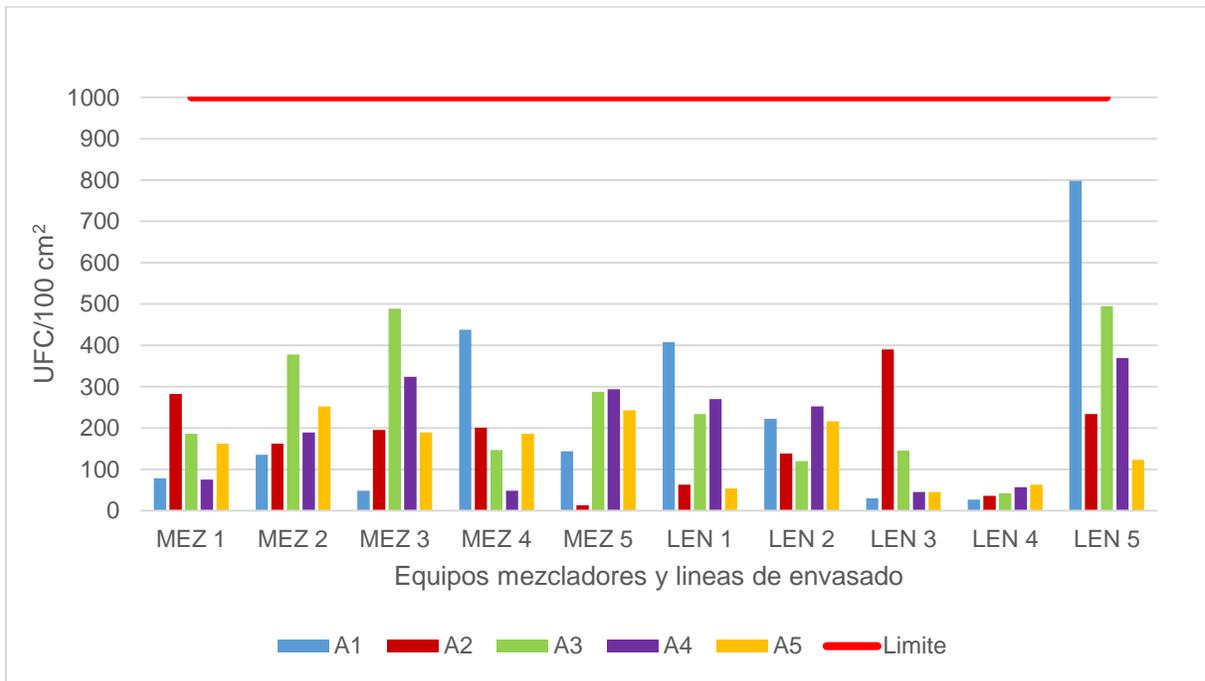
Los resultados microbiológicos de los equipos analizados son mostrados en el cuadro 6:

Cuadro 6. Carga microbiana presente en equipos

No.	Análisis/Equipo	Espf.	MEZ 1	MEZ 2	MEZ 3	MEZ 4	MEZ 5	LEN 1	LEN 2	LEN 3	LEN 4	LEN 5
A1	Mes. Aerobios (UFC/100cm ²)	1 000	78	135	48	438	144	408	222	30	27	798
	Col. Totales (UFC/100cm ²)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/100cm ²)	100	15	9	9	15	0	72	0	0	0	66
A2	Mes. Aerobios (UFC/100cm ²)	1 000	282	162	195	201	13	63	138	390	36	234
	Col. Totales (UFC/100cm ²)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/100cm ²)	100	15	6	12	12	12	0	24	48	0	42
A3	Mes. Aerobios (UFC/100cm ²)	1 000	186	378	489	147	288	234	120	145	42	495
	Col. Totales (UFC/100cm ²)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/100cm ²)	100	30	27	36	30	18	30	12	9	15	24
A4	Mes. Aerobios (UFC/100cm ²)	1 000	75	189	324	48	294	270	252	45	57	369
	Col. Totales (UFC/100cm ²)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/100cm ²)	100	15	15	45	0	24	24	9	12	3	27
A5	Mes. Aerobios (UFC/100cm ²)	1 000	162	252	189	186	243	54	216	45	63	123
	Col. Totales (UFC/100cm ²)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/100cm ²)	100	18	15	3	18	18	0	3	15	21	3

Espf. Especificación / Aus. Ausente / UFC. Unidades Formadoras de Colonias/ MEZ. Mezcladores/ LEN. Línea de envasado

En la gráfica 1, se muestra el recuento obtenido de *mesófilos aerobios* de las muestras de equipos y líneas de envasado y las repeticiones de los análisis contra la especificación establecida por la planta de una cuenta máxima de 1 000 UFC/100cm²:

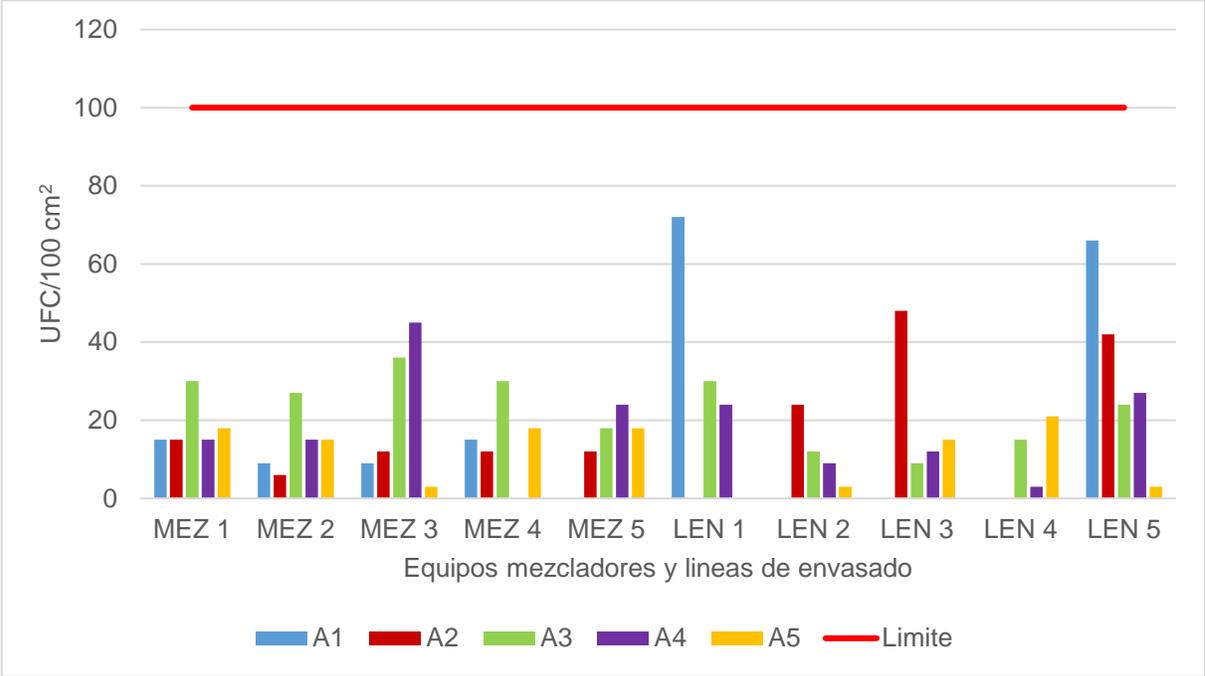


Gráfica 1. Presencia de Mesófilos Aerobios por Equipo

Como se puede observar los *resultados de mesófilos aerobios*, los equipos de mezclado y envasado se encuentran **en cumplimiento** con la especificación establecida con método tradicional.

No se grafican los resultados de *coliformes totales* y *E. coli*, ya que como se observa en el cuadro 6, no hubo crecimiento de estos microorganismos en las placas Petrifilm EC, por lo tanto, los equipos de mezclado y envasado se encuentran **en cumplimiento** con la especificación establecida con método tradicional.

En la gráfica 2, se muestra el recuento obtenido de hongos y levaduras de las muestras de equipos y líneas de envasado y las repeticiones de los análisis contra la especificación establecida por la planta de una cuenta máxima de 100 UFC/100cm²:



Gráfica 2. Presencia de Hongos y Levaduras por Equipo

Como se puede observar los *resultados de hongos y levaduras*, los equipos de mezclado y envasado se encuentran **en cumplimiento** con la especificación establecida con método tradicional.

Entre los controles de la planta maquiladora de alimentos en polvo que sustentan los resultados sin incidencias son:

- Código de colores de utensilios de limpieza por producto.
- Procedimientos de limpieza, con técnica de lavado definida para cada equipo.

- Uso de detergente alcalino biodegradable para llevar a cabo la remoción de la suciedad.
- Concentración de jabón definida según el tipo de suciedad.
- Tiempo de acción del jabón en la superficie del equipo.
- Agua para enjuague clorada y monitoreada con análisis microbiológico con técnica de siembra de NMP.

Resultados con cuenta microbiana elevada o fuera del límite microbiológico permisible establecido, se asocia a una limpieza y desinfección deficiente en cuanto a técnica por parte de quien realiza la actividad, es decir, el personal no se encuentra capacitado, no se respetó la concentración o tiempo de acción del jabón, etc.

En general, los controles implementados tienen una función positiva y se refleja en los resultados con bajos niveles de carga microbiana cumpliendo con el 100% los parámetros establecidos por la planta envasadora de polvos, sin tener un riesgo significativo de contaminación microbiana por parte de los equipos.

Recomendaciones

Para mantener resultados de equipos sin incidencia o resultados con cuentas elevadas que pongan en duda la confiabilidad del producto se plantean las siguientes recomendaciones:

- Una capacitación de la técnica de lavado constante del personal encargado de la limpieza de los equipos.
- Una mayor supervisión y estricta revisión de los equipos de acuerdo con un check list de partes y zonas de los equipos con mayor dificultad de limpieza antes de ser utilizados.
- Mantener un análisis microbiológico de los equipos de mezclado y líneas de envasado bajo un monitoreo constante y con frecuencias establecidas.
- Reducir a la mitad los límites microbiológicos de especificación, si se mantiene resultados similares a los obtenidos en el proyecto y así proporcionar mayor confiabilidad a los clientes.
- Ampliar parámetros microbiológicos a análisis de microorganismos patógenos.

3.2 Manipuladores

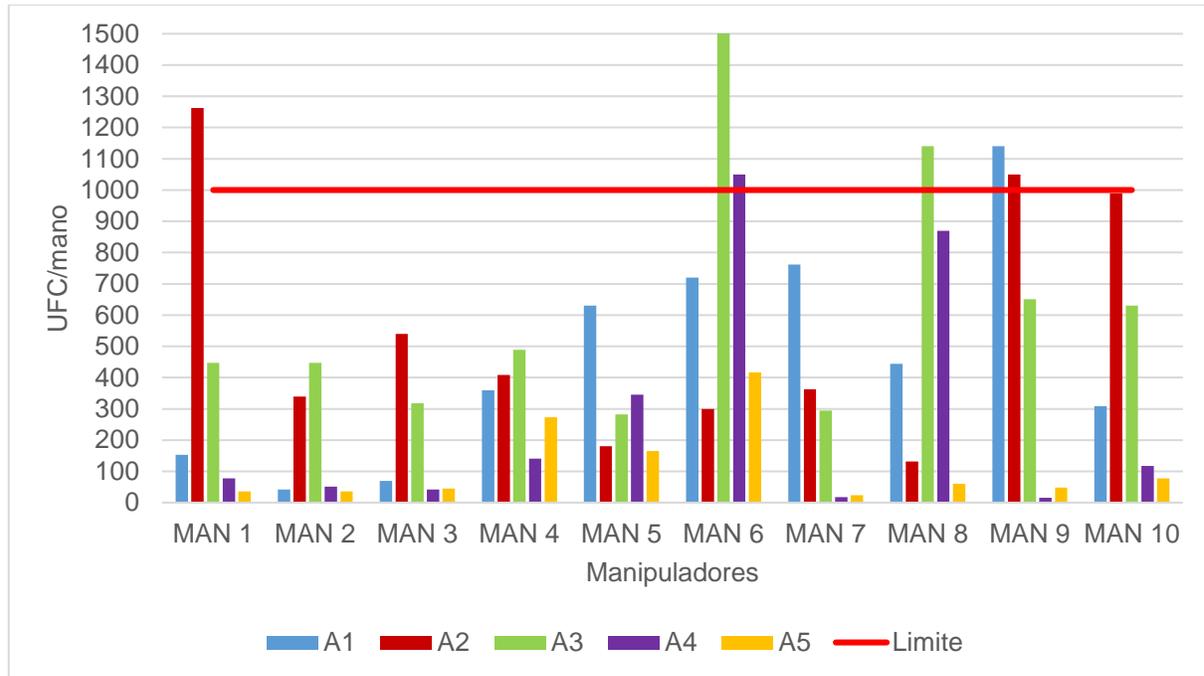
En el cuadro 7, se muestran los resultados microbiológicos de diez manipuladores que tienen actividades de contacto directo, pesar materia prima, mezclar y alimentar líneas de envasado:

Cuadro 7. Carga microbiana presente de manipuladores

No.	MANIPULADOR	Espf.	MAN 1	MAN 2	MAN 3	MAN 4	MAN 5	MAN 6	MAN 7	MAN 8	MAN 9	MAN 10
A1	Mes. Aerobios (UFC/mano)	1 000	153	42	69	360	630	720	762	444	1140	309
	Col. Totales (UFC/mano)	10	0	0	0	0	0	0	42	78	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/mano)	100	21	12	18	15	42	9	15	15	48	24
A2	Mes. Aerobios (UFC/mano)	1 000	1263	339	540	408	180	300	363	132	1050	990
	Col. Totales (UFC/mano)	10	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/mano)	100	3	60	3	3	30	15	15	12	21	27
A3	Mes. Aerobios (UFC/mano)	1 000	447	447	318	489	282	1980	294	1140	651	630
	Col. Totales (UFC/mano)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/mano)	100	12	24	15	33	36	105	12	30	18	75
A4	Mes. Aerobios (UFC/mano)	1 000	78	51	42	141	345	1050	18	870	15	117
	Col. Totales (UFC/mano)	10	0	0	0	0	0	24	0	114	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/mano)	100	3	3	0	45	54	63	15	3	3	0
A5	Mes. Aerobios (UFC/mano)	1 000	36	36	45	273	165	417	24	60	48	78
	Col. Totales (UFC/mano)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	Aus										
	Lev y Hongos (UFC/mano)	100	9	12	12	12	3	18	0	36	0	6

Espf. Especificación / Aus. Ausente / UFC. Unidades Formadoras de Colonias/ MAN. Manipulador

En la gráfica 3, se muestra el recuento obtenido de *mesófilos aerobios* de las muestras de manipuladores y las repeticiones de los análisis contra la especificación establecida por la planta de una cuenta máxima de 1 000 UFC/mano:



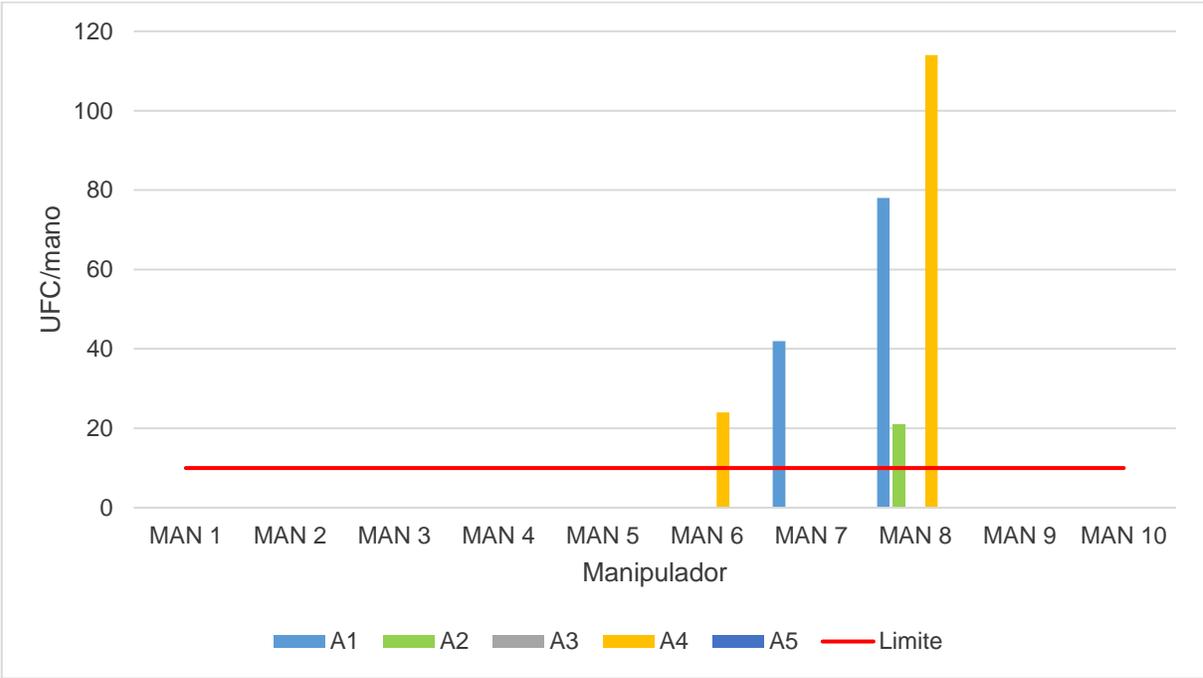
Gráfica 3. Presencia de Mesófilos Aerobios por Manipulador

Como se observa en la gráfica 3, en el primer análisis (A1), hay una incidencia por el manipulador 9. En el segundo análisis (A2), se observan dos incidencias por el manipulador 1 y 9. Para el tercer análisis (A3), se observan dos incidencias por el manipulador 1 y 9. Para el tercer análisis (A3), se observan dos incidencias por el manipulador 6 y 8. En el cuarto análisis (A4), incide solo el manipulador 6, teniendo un total de seis cuentas de mesófilos aerobios que se encuentran fuera del límite establecido.

Los resultados con una carga microbiana de mesófilos aerobios elevada hay mayor probabilidad de presencia de microorganismos coliformes, son resultados que

alertan la posición del manipulador ya que es un riesgo para la inocuidad del producto en el proceso.

En la gráfica 4, se muestra el recuento obtenido de coliformes totales de las muestras de manipuladores y las repeticiones de los análisis contra la especificación establecida por la planta de una cuenta máxima de 10 UFC/mano:

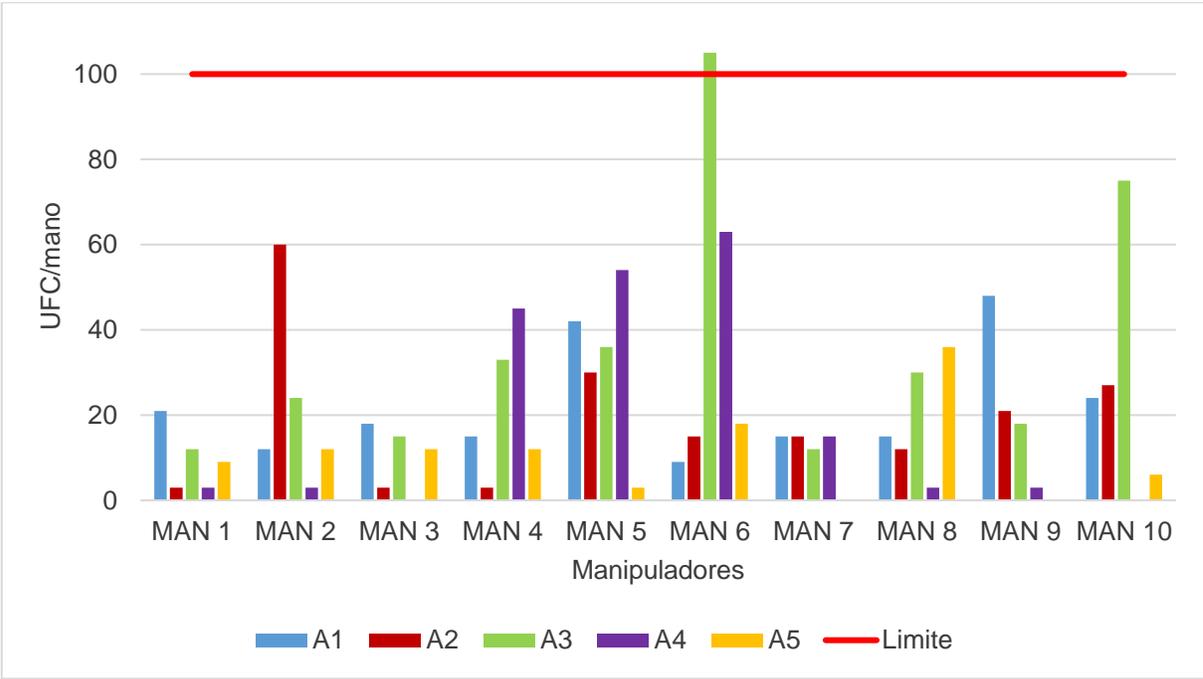


Gráfica 4. Presencia de Coliformes Totales por Manipulador

Como se observa en la gráfica 4, en el primer análisis (A1), hay dos incidencias por el manipulador 7 y 8. En el segundo análisis (A2), se observan una incidencia por el manipulador 8. Para el tercer análisis (A3), hubo cero incidencias. En el cuarto análisis (A4), hay dos incidencias por el manipulador 6 y 8, teniendo un total de cinco cuentas de coliformes totales que se encuentran fuera del límite establecido. Afortunadamente las incidencias de coliformes totales no involucran presencia de *E. coli*, sin embargo, con ello no aseguramos que en el resto de la flora microbiana

haya presencia de microorganismos no analizados (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus*) que deben incluirse al monitoreo para un mayor control y menor riesgo en el proceso.

En la gráfica 5, se muestra el recuento obtenido de hongos y levaduras de las muestras de manipuladores contra la especificación establecida por la planta de una cuenta máxima de 100 UFC/mano:



Grafica 5. Presencia de Hongos y Levaduras por Manipulador

Como se observa en la gráfica 5, la mayoría de los análisis para este parámetro se encuentran dentro de especificación a excepción del manipulador 6 en el tercer análisis.

Incidir con cuentas microbianas fuera de los límites microbiológicos establecidos, se debería reposicionar al manipulador para eliminar o disminuir el riesgo con acciones

que apoyen al manipulador cada que se realiza la actividad ya que representa un riesgo para la inocuidad del producto.

La presencia de una carga microbiana elevada en las manos de los manipuladores directos del producto representa una falta grave de higiene al no llevar a cabo una de las principales prácticas de manufactura de una planta alimentaria, el lavado de manos.

Entre los controles implementados por la planta maquiladora de alimentos en polvo que sustentan una baja y aceptable incidencia de los resultados son los siguientes:

- Se cuenta con una aduana de entrada acondicionada con lavamanos e instructivos de técnica de lavado correcto de manos paso a paso para llevar a cabo la actividad.
- Despachador de sanitizante para el personal
- Agua para enjuague clorada y monitoreada con análisis microbiológico con técnica de siembra de NMP.
- Utilización de jabón neutro para remoción de la suciedad de las manos de los manipuladores.
- Estaciones de lavado de manos en zonas estratégicas de planta, área de alimentado de líneas.
- Orden y limpieza de áreas por parte de los usuarios.
- Capacitación de buenas prácticas de manufactura, inocuidad alimentaria y la influencia que tiene el manipulador y su actividad sobre los productos (concientización de trabajar en la Industria Alimentaria).

La presencia de una carga microbiana elevada en las manos de los manipuladores que tienen contacto directo con el producto representa una falta grave de higiene al no llevar a cabo una de las principales prácticas de manufactura de una planta y el lavado de manos.

Recomendaciones

Entre las recomendaciones para reducir y mantener cuentas dentro de los límites establecidos para los manipuladores son:

- Mantener una estricta higiene por parte del personal operativo, especialmente los que se encuentran en contacto directo con los productos, en el lavado de manos antes de iniciar la manipulación de los productos alimenticios, después de haber usado los servicios higiénicos, después de manipular cajas de envases, bultos u otros artículos contaminados, después de barrer, recoger y manipular los recipientes de basura, después de tocar el dinero, llaves o alhajas.
- Hacer inspecciones de limpieza de manos y verificar que se tengan las uñas del personal operativo estén cortas, limpias, sin esmalte y sin anillos, sus muñecas libres de relojes, factores potenciales de contaminación.
- Cambiar de posición al personal operativo que incida con resultados fuera de los límites microbiológicos permisibles establecidos para evitar que el personal sea un factor de riesgo de contaminación.

- Dar seguimiento a personal que incida con resultados positivos con al menos tres ocasiones seguidas y verificar que ha creado conciencia con evitar contacto con zonas sucias.
- Ampliar el análisis microbiológico de los manipuladores para *Salmonella* y *S. aureus* para un mayor control y menor riesgo en el proceso.
- Si se cuentan con un mayor apoyo de recursos para la adquisición de las placas Petrifilm, ampliar el análisis a personal que forma parte de la cadena de proceso, aunque no se encuentre en contacto directo con el producto, para reducir aún más un riesgo de contaminación.

3.3 Medio ambiente

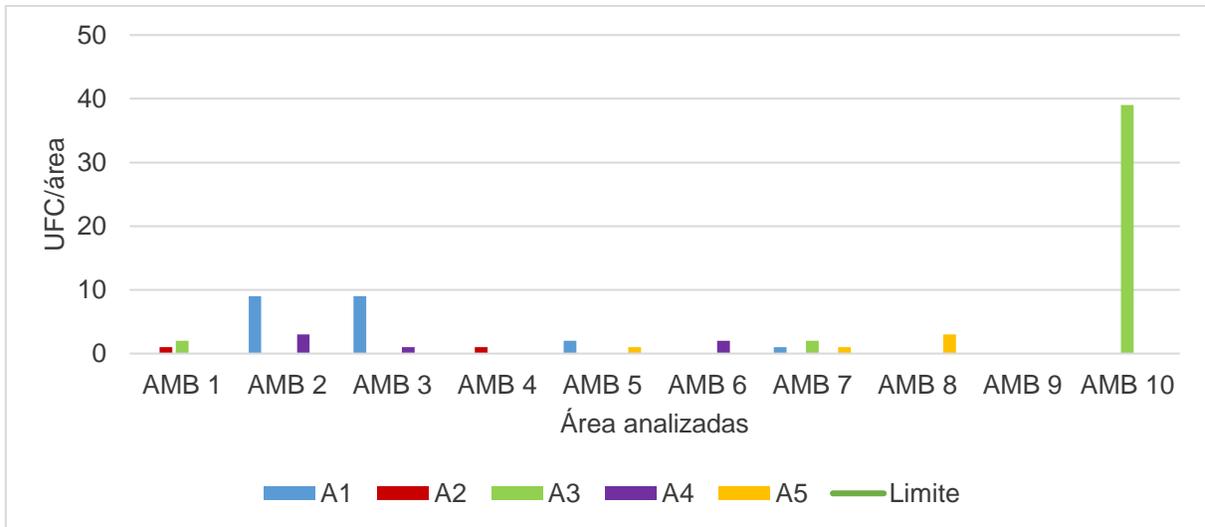
En el cuadro 8, se muestran los resultados microbiológicos de diez áreas en las que se realizó análisis microbiológico con placas Petrifilm por exposición de paca, se realizan actividades donde se encuentra materia prima, producto mezclado o para envasarse expuesto al medio ambiente:

Cuadro 8. Carga microbiana presente de ambientes

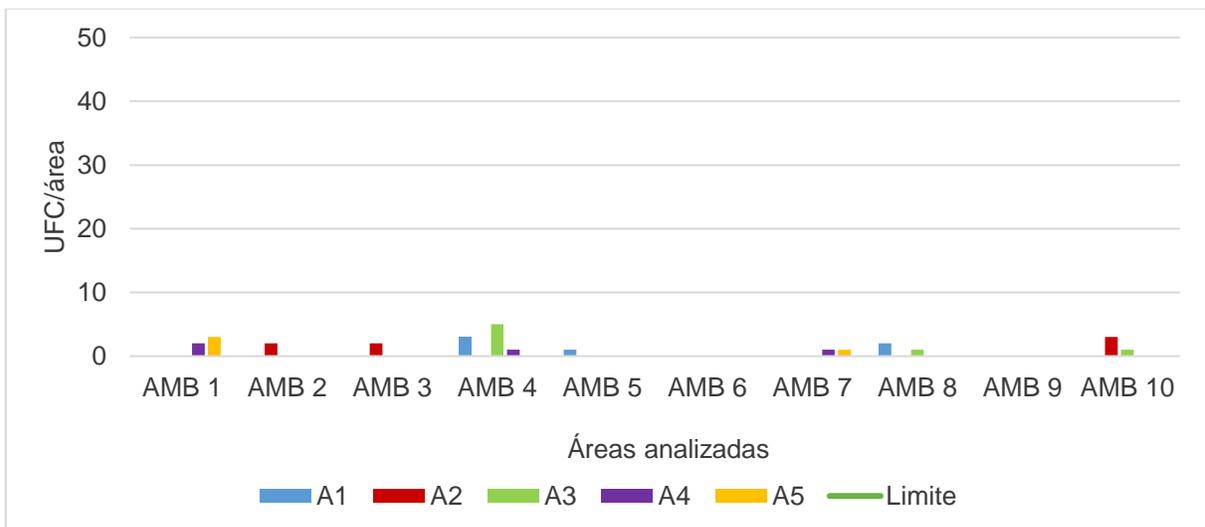
No.	AMBIENTE	Espf.	AMB 1	AMB 2	AMB 3	AMB 4	AMB 5	AMB 6	AMB 7	AMB 8	AMB 9	AMB 10
A1	Mes. Aerobios (UFC/área)	100	0	9	9	0	2	0	1	0	0	0
	Lev y Hongos (UFC/área)	100	0	0	0	3	1	0	0	2	0	0
A2	Mes. Aerobios (UFC/mta)	100	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Lev y Hongos (UFC/mta)	100	0	2	2	0	0	0	0	0	0	3
A3	Mes. Aerobios (UFC/mta)	100	2	0	0	0	0	0	2	0	0	39
	Lev y Hongos (UFC/mta)	100	0	0	0	5	0	0	0	1	0	1
A4	Mes. Aerobios (UFC/mta)	100	0	3	1	0	0	2	0	0	0	0
	Lev y Hongos (UFC/mta)	100	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A5	Mes. Aerobios (UFC/mta)	100	0	0	0	0	1	0	1	3	0	0
	Lev y Hongos (UFC/mta)	100	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Espf. Especificación / UFC. Unidades Formadoras de Colonias /AMB. Ambiente

En la gráfica 6, se muestra el recuento obtenido de *mesófilos aerobios* y en la gráfica 7, el recuento de *hongos y levaduras* de las placas expuestas en las áreas de pesado, mezclado y envasado contra la especificación establecida por la planta de una cuenta máxima de 100 UFC/área:



Grafica 6. Presencia de Mesófilos Aerobios por Área



Grafica 7. Presencia de Hongos y Levaduras por Área

Los resultados microbiológicos de las áreas analizadas entran dentro de los límites microbiológicos permisibles, por lo que los controles implementados no favorecen la proliferación microbiana sobre el producto.

Entre los controles implementados por la planta maquiladora son:

- Áreas separadas exclusivas para llevar actividades de pesado de materias primas, mezclado y envasado.

- Sistema de extracción de partículas suspendidas en el ambiente en buenas condiciones y eficiente.
- Limpiezas profundas de techos, paredes y pisos para cambios de productos, evitar contaminación cruzada.
- Procedimientos de técnica de áreas, con los requerimientos de utensilios y medidas de seguridad.
- Uso de agua clorada para enjuague para limpieza de áreas.
- Termonebulizaciones mensuales, para mejora de la calidad de aire y como control de plagas en áreas de proceso.
- Los manipuladores tienen la responsabilidad de hacer uso de cubrebocas y de uniforme en zonas de proceso.

Los resultados microbiológicos arrojan cargas microbianas bajas, por lo que los controles implementados sirven para mantener un ambiente adecuado no siendo un factor de riesgo de contaminación en los productos.

Recomendaciones

Las recomendaciones que considerar para mantener y asegurar que no se tiene un riesgo potencial el medio ambiente donde se realiza el proceso de elaboración y envasado de alimentos en polvo son:

- Llevar a cabo la ampliación del análisis microbiológico del medio ambiente con el microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes*.
- Reducir el rango de los límites microbiológicos para el monitoreo del medio ambiente.

CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El análisis microbiológico de equipos, manipuladores y medio ambiente ayuda a detectar posibles fuentes de contaminación en el proceso de mezclado y envasado de alimentos en polvo en la planta maquiladora.
- El método rápido Petrifilm es una alternativa muy buena para sustituir el método tradicional, ya que elimina la preparación de los medios de cultivo, se visualiza mejor el crecimiento y la morfología de las colonias y el insumo de menor tiempo y economía, ofrecen ventajas que justificarían su utilización para el análisis microbiológico de materia prima, producto terminado, equipos, manipuladores y medio ambiente.
- El uso de placas Petrifilm eficiente la técnica de inoculación en los análisis microbiológicos, es decir, se realiza mayor número de análisis en menor tiempo.
- La entrega de resultados microbiológicos con las pruebas rápidas se realiza en un periodo no mayor a 60 horas, siendo hongos y levaduras los microorganismos que se desarrollan en mayor tiempo.
- Los controles implementados para manipuladores y medio ambiente sirven para no presentar un riesgo potencial de contaminación durante los procesos.
- Los resultados de equipos y medio ambiente arrojaron datos que no superan los límites microbiológicos permisibles.

- El 100% de los resultados de los equipos se encuentran dentro de los límites microbiológicos permisibles con cuentas microbiológicas variables.
- Se puede asegurar que los equipos de mezclado y líneas de envasado, medio ambiente donde se realiza la operación e intervención de manipuladores con bajo porcentaje de incidencias, las condiciones higiénico-sanitarias en general cumplen con las especificaciones establecidas por la planta maquiladora de alimentos en polvo.

4.2. Recomendaciones

- Estructurar un programa de monitoreo o control microbiológico para equipos, manipuladores y medio ambiente como parte de su sistema de verificación del sistema de inocuidad de la planta maquiladora de alimentos en polvo.
- Que el analista de microbiología se encuentre en constante capacitación para apoyo del prerrequisito de control microbiológico de la planta maquiladora.
- Diseñar un programa de capacitación para el personal operativo con los programas de prerrequisitos y de buenas prácticas de manufactura, para que conozcan la importancia de mantener orden y limpieza en las áreas de trabajo y del impacto que pueden tener si no se realizan dichas acciones.
- Para los manipuladores se debe mejorar la capacitación del personal para concientizar la forma de trabajar en la industria alimentaria.
- Verificación anual del agua de proceso utilizada para la limpieza de equipos, lavado de manos y áreas de proceso bajo la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994.

BIBLIOGRAFÍA:

- Adams M.R. & Moss M.O. (1997). Microbiología de los alimentos. Primera Edición, Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.
- Alexopoulos C.J. & Mims C.W. (1985). Introducción a la micología. Primera Edición, Editorial Omega S.A. Barcelona, España.
- Bravo F. (2002). El manejo higiénico de los alimentos, Guía para la obtención del distintivo H. Primera Edición. Editorial Limusa.
- Doyle M.P, L.R. Beuchat & T.J. Montville. (2001). Microbiología de los alimentos, fundamento y fronteras. Primera Edición, Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.
- Frazier W.C. & Westhoff D.C. (1993). Microbiología de los alimentos. Cuarta Edición, Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.
- Fung, D. Y. C. & Lee, C. M. (1981) Double-tube anaerobic bacteria cultivation system. Food Science
- Fung, D. Y. C. (2002) Rapid methods and automation in microbiology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.
- García M.J. & García V. (2002). Técnicas de descontaminación: Limpieza, desinfección, esterilización. Primera Edición, Editorial S.A. Ediciones Parafino.
- Johansson, T. (1998). Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food- processing environments. International Journal of Food Microbiology.

- Hayes, P.R. (1993). Microbiología e higiene de los alimentos. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.
- Herrans, C. (2008). Métodos rápidos y automatizados en microbiología alimentaria. Monográfico VI MRAMA, Alimentaria Journal.
- Hobbs B.C. (1997). Higiene y toxicología de los alimentos. Tercera Edición, Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.
- Hyginov C. (2002). Guía para la elaboración de un plan de limpieza y desinfección-De aplicación en empresas del sector alimentario. Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.
- International Commission on Microbial Specifications for Food, of the International Union of Biological Societies. ICMSF (2000). Microorganismos de los alimentos: su significado y métodos de enumeración. Segunda Edición. Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.
- International Commission on Microbial Specifications for Food, of the International Union of Biological Societies. ICMSF (2001). Microorganismos de los alimentos: Ecología microbiana de los alimentos, Vol. 6. Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2004). Biología de los microorganismos. Décima Edición. Editorial Pearson education. Madrid, España.
- Pascual, M. & Calderón, V. (1999). Microbiología alimentaria. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España.

- Perdomo, H., Casanova O.N. & Ciganda V.S. (2001). Contaminación de agua subterránea con nitrato y coliformes en el litoral de Uruguay. Agrocienza, Primera Edición Vol. V.
- Prescott, Harley & Klein (2009). Microbiología. Séptima Edición, Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana.
- Tortora, G. (1993). Introducción a la Microbiología. Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España.

BIBLIOGRAFÍA DE PÁGINAS WEB

- Alonso L.X. & Poveda J.A. (2008, diciembre). Estudio comparativo de técnicas de recuento rápido para el análisis de alimentos. Consultado el 22 de mayo 2017 en:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/ciencias.pdf>
- Andino, F., Castillo, Y. (2010, febrero). Microbiología de los alimentos: Un enfoque para la inocuidad alimentaria. Consultado el 17 de abril 2017 en:
<https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia>
- Apella, M., Araujo, P. (2005). Microbiología del agua. Conceptos básicos: Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. Consultado el 08 de junio del 2017 en:
https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02
- De Santos, R., (2008). Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. Consultado el 22 de marzo del 2017 en:
<https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1108/1125>

- FAO (1991). Manual of Food Quality Control. 12. Quality Assurance in the Food Control Microbiological Laboratory. Consultado el 26 de mayo del 2017 en:
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ANALISISDESUPERFICIES_19579.pdf
- FAO, (2015). Inocuidad de los alimentos- Peligros Biológicos. Consultado el 17 de abril del 2017 en:
<http://www.paho.org2015-peligros-biologicos&catid=7678%3Ahaccp>
- Fuentes, M. (2014, febrero). E&L Empresa y Limpieza: Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Consultado el 17 de julio del 2017 en: <http://empresaylimpieza.com/not/862/limpieza-y-desinfeccion-en-la-industria-alimentaria>
- Michanie, S. (2014, abril). Ingeniería alimentaria: Monitoreo de la higiene de superficies. Consultado el 20 de junio del 2017 en:
<http://www.ialimentaria.com>
- Prescal, Grupo de empresas., (2012). Manipulación de alimentos: Manual común. Consultado el 12 de julio del 2017 en:
http://www.juntadeandalucia.es/empleo/recursos2/material_didactico/especialidades/materialdidactico_manipulacion_alimentos/PDF/Manual_Comun
- CEEI. Centro Europeo de Empresas e Innovación, Analiza Calidad. (2005). Microorganismos Indicadores Consultado el 28 de junio del 2017 en:
<http://www.analizacalidad.com/docftp/fi168arf2005-1.pdf>

- 3M. (2006). Placas Petrifilm para el recuento de aerobios. Consultado el 10 de julio del 2017 en:
http://docs.wixstatic.com/ugd/a68beb_c6128e3cabf840fd9bd7449690b9691a.pdf
- 3M. (2006). Placas Petrifilm para el recuento de coliformes. Consultado el 10 de julio del 2017 en:
http://docs.wixstatic.com/ugd/a68beb_d7d07b6cc2d54898ba114885900bcf81.pdf
- 3M. (2006). Placas Petrifilm para el recuento de *E. Coli*/Coliformes. Consultado el 10 de julio del 2017 en:
http://docs.wixstatic.com/ugd/a68beb_a3972f4ebcb74ceba06bdf687249ff86.pdf
- 3M. (2013). Placa Petrifilm rápida para recuento de mohos y levaduras. Consultado el 10 de julio del 2017 en:
http://docs.wixstatic.com/ugd/a68beb_bef7d6f0c6a941f19b02869bcac67a58.pdf

NORMAS CONSULTADAS

- NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

- NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.