

NOTA TÉCNICA

ROBUSTEZ DEL RECUENTO TOTAL AEROBIO AL MODIFICAR LA ETAPA DE DILUCIONES DECIMALES¹

Eric Wong-González²

RESUMEN

Robustez del recuento total aerobio al modificar la etapa de diluciones decimales. El objetivo de esta investigación fue determinar la robustez del recuento total aerobio al modificar la etapa de diluciones decimales y se realizó en el 2006 en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Para esto se probó el efecto de matriz (vegetales, salchichón y leche), nivel de inóculo (alto: $10^6/g$ o $10^6/ml$ o bajo: $10^3/g$ o $10^3/ml$) y método de dilución (dilución 10:90 o dilución 1:9 ml de muestra en ml de diluyente respectivamente) sobre el recuento total aerobio de muestras inoculadas. Ninguno de los efectos y sus interacciones fue significativo, evidenciando una alta robustez del método al hacer la modificación en las diluciones decimales. Esto implica que se puede sustituir al dilución 10:90 por una de 1:9 ahorrando recursos, favoreciendo la homogenización de la dilución por ser un volumen más pequeño y facilitando la manipulación y el lavado de la cristalería correspondiente (tubos en lugar de botellas).

Palabras claves: Validación, modificación, análisis microbiológico, alternativa, ahorro.

ABSTRACT

Ruggedness of aerobic plate count when modifying the serial dilutions step. The objective of this research project was to determine the ruggedness of aerobic plate count when modifying the serial dilution step. Experiments were performed in 2006 at the Food Microbiology Laboratory at the Food Science and Technology National Center. Effects of matrix (vegetables, Italian sausage and milk), inoculation level (high: $10^6/g$ or $10^6/ml$ or low: $10^3/g$ or $10^3/ml$) and dilution method (10 ml:90 ml or 1 ml:9 ml sample:diluent ratio) on the aerobic plate count of inoculated samples were evaluated. None of the effects and their interactions were significant showing high ruggedness of the method when the serial dilution step was modified. Dilution 10:90 can be substituted for a 1:9 dilution. In turn less resources are needed, homogenization is easier for a lower volume and manipulation and washing of tubes (9 ml) more convenient than bottles (90 ml).

Key words: Validation, modification, microbiological analysis, alternative, savings.



INTRODUCCIÓN

La estimación del número de microorganismos en un alimento es necesaria desde muchos puntos de vista.

Por ejemplo, la carga microbiana puede indicarnos si un producto cumple con las recomendaciones, especificaciones o reglamentaciones microbiológicas que han sido establecidas. También, los recuentos

¹ Recibido: 20 de setiembre, 2007. Aceptado: 25 de agosto, 2008.

² Escuela de Tecnología de Alimentos, Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. eric.wong@ucr.ac.cr

pueden indicar si un alimento está deteriorado, pueden servir para predecir la vida útil y evaluar la inocuidad de un alimento y si las condiciones en que fue producido fueron adecuadas (Banwart 1989).

De acuerdo con Downes e Ito (2001), el recuento total aerobio es una técnica general ampliamente utilizada para estimar el número de microorganismos en muestras de alimentos. El recuento total aerobio se utiliza como un indicador de la población bacteriana en las muestras y resulta útil para evaluar su calidad. El procedimiento general para realizar un recuento total aerobio incluye la preparación de la muestra, diluciones decimales, montaje de las diluciones en placas en un medio apropiado, incubación de las placas y recuento (Maturin y Peeler 1998).

Las diluciones decimales se realizan para poder tener placas en las que se puede contar fácilmente y con precisión el número de colonias (Banwart 1989). Estas diluciones consisten en colocar un volumen de la muestra en un volumen de diluyente en una relación 1:10, como por ejemplo 11 ml de muestra en 99 ml de diluyente (Downes e Ito 2001) o 10 ml de muestra en 90 ml de diluyente (Maturin y Peeler 1998, Banwart 1989). Estos dos últimos ejemplos son los volúmenes aceptados en los métodos oficiales y son los que tradicionalmente se utilizan.

En ocasiones, los laboratorios de análisis cuentan con limitaciones presupuestarias que los obligan a buscar métodos alternativos o variaciones en los métodos que les permita ahorrar recursos. Considerando que las diluciones decimales se realizan en una relación 1:10 de acuerdo con lo expuesto anteriormente, una nueva alternativa sería reducir las diluciones oficiales a un volumen de 1 ml de muestra en 9 ml de diluyente, cumpliendo con la proporción. Esto implicaría un ahorro del 90% de los recursos destinados a preparar el diluyente. Sin embargo, realizar cambios de esta naturaleza implica la validación del método alternativo, específicamente estudiar su robustez.

De acuerdo con Peters *et al.* (2007) y AOAC (2002) la determinación de la robustez de un método consiste en tomar el método oficial y someterlo a un pequeño cambio en el procedimiento y comprobar la influencia que dicho cambio tiene en los resultados obtenidos, con respecto al método sin modificaciones.

El análisis de la robustez de un método sometido a un cambio debe considerar el efecto de matriz (aplicarse en alimentos de diferente naturaleza), el efecto del nivel inicial de inóculo (como mínimo debe probarse un nivel bajo y uno alto) y la realización de al menos cinco repeticiones para cada combinación de esos efectos (AOAC 2002).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación consistió en evaluar la robustez del recuento total aerobio sometido a un cambio en la etapa de diluciones decimales. El cambio consistió en realizar las diluciones con 1 ml de muestra en 9 ml de diluyente en lugar de 10 ml en 90 ml respectivamente, como indica el método oficial. De no encontrar diferencia entre el método oficial y el modificado (alta robustez), podrían ahorrarse recursos importantes al determinar el recuento total aerobio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el 2006 en el Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), localizado en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica.

Recuento total aerobio y método de dilución

Para realizar el recuento total aerobio se siguió, como método oficial, el procedimiento descrito por Downes e Ito (2001). Como método alternativo, se varió la etapa de diluciones decimales utilizando 1 ml de muestra en 9 ml de diluyente, en lugar de 10 ml en 90 ml respectivamente.

Matrices alimenticias

Se trabajó con tres matrices representativas de los siguientes grupos alimenticios: vegetales, cárnicos y lácteos. En el grupo de vegetales se trabajó con vegetales mixtos enlatados, en el grupo de cárnicos con salchichón criollo (embutido tipo bologna) y en el grupo de lácteos con leche pasteurizada UHT semidescremada (2 % grasa). Estos grupos son los

más analizados en el laboratorio, por lo que fueron escogidos para determinar su efecto sobre el recuento total aerobio realizado utilizando los dos métodos de dilución.

Cultivo y nivel de inóculo

Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 31785 (Manassas, VA, USA). Esta cepa se mantuvo en agar estándar a 37 °C. A partir de cultivo sólido fresco (18 horas de incubación) se preparó el estándar de Mc. Farland # 0,5 con una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/ml. A partir de este estándar se realizaron las diluciones necesarias para obtener el nivel de inóculo bajo (aproximadamente 10^3 /g o 10^3 /ml en la matriz) y el nivel de inóculo alto (aproximadamente 10^6 /g o 10^6 /ml en la matriz). De acuerdo con AOAC (2002), en estudios de técnicas de análisis como el recuento total, las conclusiones obtenidas para este microorganismo, que se utiliza como un indicador, pueden generalizarse para todas las bacterias.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se determinó el recuento total aerobio en las tres matrices inoculadas, para los dos niveles de inoculación con base en los dos métodos de diluciones como única variación del procedimiento oficial. Para cada combinación de los efectos se realizaron 10 repeticiones. Se trabajó a un nivel de significancia del 5 % ($\alpha=0,05$).

Se utilizó un diseño irrestricto al azar en un arreglo factorial 3 X 2 X 2, en donde el efecto matriz se estudió en tres niveles (vegetales, salchichón y leche), el efecto nivel de inóculo en dos niveles (alto y bajo) y el efecto método de dilución en dos niveles (dilución 1 ml de muestra en 9 ml de diluyente y dilución 10 ml de muestra en 90 ml de diluyente). Este diseño fue evaluado aplicando un análisis de covarianza para conocer la significancia de los efectos simples y sus interacciones. La interacción triple no se analizó por considerarse sin sentido teórico. Adicionalmente, se incluyó el recuento inicial como covariable para eliminar su efecto por ser diferente en los diversos experimentos realizados. Se trabajó a un nivel de significancia del 5 % ($\alpha=0,05$). Todos los análisis se

realizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1.2 (Sas Institute Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se observan las probabilidades y potencias de prueba para los efectos estudiados y sus interacciones. En el Cuadro 2, como referencia, se presentan los recuentos totales aerobios determinados para la combinación de efectos estudiados. Como puede observarse, los efectos son independientes, y no se afectan entre sí, ya que ninguna interacción resultó significativa ($p=1,0000$).

Cuadro 1. Probabilidad asociada y potencia de prueba para los efectos analizados en la prueba de robustez. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Centro Nacional de Ciencias y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2006.

Efecto analizado	Probabilidad asociada	Potencia de prueba ¹
Matriz	1,0000	1,0000
Nivel de inóculo	1,0000	1,0000
Método de dilución	1,0000	1,0000
Matriz x nivel de inóculo	1,0000	1,0000
Matriz x Método de dilución	1,0000	1,0000
Nivel de inóculo x Método de dilución	1,0000	1,0000

¹ Nivel de significancia de 0,05 y diferencia mínima a detectar de $0,1 \log_{10}$ (UFC/ml o UFC/g).

El efecto del método de dilución, razón de ser de esta investigación, resultó no significativo ($p=1,0000$, $1-\beta=1,0000$). Esto, aunado al hecho de que ninguna interacción fue significativa, implica que el cambio realizado en el método de dilución no afectó el resultado obtenido en el recuento total aerobio, en ninguno de los dos niveles de inóculo ($p=1,0000$, $1-\beta=1,0000$) estudiados ni para ninguna de las matrices evaluadas ($p=1,0000$, $1-\beta=1,0000$).

El efecto de matriz alimenticia no resultó significativo ($p=1,0000$, $1-\beta=1,0000$) indicando que ninguno

Cuadro 2. Recuento total aerobio según matriz, nivel de inóculo y método de dilución utilizado. Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Centro Nacional de Ciencias y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2006.

Matriz	Nivel de inóculo	Método de dilución (ml de muestra:ml diluyente)	Recuento total aerobio (log ₁₀ UFC/g o UFC/ml) ¹
Vegetales	Bajo	10:90	3,25 ± 0,06
		1:9	3,19 ± 0,06
	Alto	10:90	6,56 ± 0,05
		1:9	6,57 ± 0,03
Salchichón	Bajo	10:90	3,09 ± 0,02
		1:9	3,03 ± 0,04
	Alto	10:90	6,94 ± 0,01
		1:9	6,95 ± 0,02
Leche	Bajo	10:90	3,03 ± 0,06
		1:9	3,00 ± 0,04
	Alto	10:90	6,49 ± 0,03
		1:9	6,58 ± 0,05

¹ UFC/g para vegetales y salchichón; UFC/ml para leche UHT.

de los grupos de alimentos analizados influyó sobre el efecto en el cambio de método de dilución. Esto significa que no importa si el alimento es de naturaleza acuosa (vegetales), grasosa (salchichón) o mixta (leche), el método de dilución 1:9 funciona igual que el de 10:90 para predecir el recuento total aerobio. Lo mismo ocurrió con los niveles de inóculo, pues tanto en la carga alta como en la baja, los resultados por ambos métodos de dilución resultaron iguales ($p=1,0000$, $1-\beta=1,0000$).

En conclusión el recuento total aerobio presentó una robustez alta al modificar la etapa de diluciones decimales (utilizar una relación volumen de muestra: volumen de diluyente de 1:9 (tubos) en lugar de una relación de 10:90 (botellas). Este cambio puede aplicarse con confianza de obtener los mismos resultados, con la ventaja de que al utilizar tubos de 9 ml se ahorran recursos, y se genera menos material para lavado tras aplicar el método. Existe una mayor facilidad de manipulación de la cristalería y se logra homogenizar la dilución más fácilmente en comparación con las botellas.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 2002. AOAC international methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. AOAC International, Washington DC. 25 p.
- Banwart, G.J. 1989. Basic food microbiology. 2 ed. Chapman & Hall, New York. 773 p.
- Downes, FP; Ito, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. APHA, Washington DC. 676 p.
- Maturin, LJ; Peeler, JT. 1998. Aerobic plate count. *In*: Bacteriological analytical manual (capítulo 3). 8 ed. FDA, Maryland. sp.
- Peters, FT; Drummer, OH; Musshoff, F. 2007. Validation of new methods. Forensic Science International 165: 216-224.