

Comparación de los Métodos de Bioluminiscencia y Recuento en Placa como control de calidad en producto terminado de bebida de malta y refrescos pasteurizados en una empresa de Bogotá D.C.

CRISTINA BURGOS¹, LILIANA MURILLO¹, ISABEL GUTIÉRREZ², JANTEH ARIAS¹

²Empresa de Bebidas y Refrescos Bavaria. ¹Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 43 - 82 Edificio Félix Restrepo. Oficina 111 Santafé de Bogotá. E mail: jdcariasjaveriana.edu.co

RESUMEN

En la actualidad las industrias productoras de alimentos se ven en la necesidad de implementar metodologías que faciliten la obtención de resultados en un tiempo corto. Es por esto que en esta investigación se buscó validar la técnica de Bioluminiscencia como una alternativa de control microbiológico que proporcione resultados rápidos y sensibles basados en la reacción por ATP con la enzima luciferasa presente en todos los organismos vivos.

Para llevar a cabo dicha validación se enfrentó la técnica de Bioluminiscencia con la de Recuento Estándar en Placa ya que esta última es la prueba estándar utilizada en la planta para el control microbiológico de los refrescos de fruta y la bebida de malta.

El procedimiento realizado consistió en la inoculación de los productos en estudio con microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) identificados en estudios anteriores, para garantizar que los resultados obtenidos se acomodaran a la situación real de los productos en la planta. A partir de la inoculación se procedió a tomar muestras paralelas para las dos técnicas con un intervalo de dos horas para cada toma en condiciones controladas durante un período de 12 horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se establecieron rangos de medición, sensibilidades y especificidades de las técnicas con el fin de conocer cual es la más precisa y más confiable para la detección de microorganismos en producto alterado. Finalmente se pudo concluir que la técnica de Recuento Estándar en Placa es más sensible y específica obteniendo resultados cuantitativamente confiables en un periodo más largo de tiempo.

ABSTRAC

Actualy food industrias seems to have necessity to implement new methodologies to improve and obtain results in a few time. That is the reason why in this research we wanted to validate the biolumiscence technique as alterantive to control all microbiological problems and have quickly and sensitiva results, based in the ATP reaction with the luciferasa enzyme present in all alive microorganisms.

To develop this validation we faced up the Bioluminiscence technique to the plaque recount because this is the last standard test used in plant to control all microbiological request in fruits refreshments and malt beverage.

This procedure was made it, doing inoculation of the study products with microorganisms (bacteria, fungus, yeast) identify in previous studies to give guarantee of the obtained results and find out if this are the reality situation of the plant products.

The samples where talking at the same time with intervals of two hours in controled conditions during 12 hours. We stablished sensitivies measuring and specifies levels of the techniques, to know wich one is more precise and confident to detect microorganims in an contaminates product.

Finally we can conclude that the standard technique is more sensitive and specific having cuantitative results in an longer period.

PALABRAS CLAVE

Unidades Formadoras de colonia pata técnica de Recuento en Planca, URL: Unidades Relativas de Luz para la técnica de bioluminiscencia, ATP: Trifosfato de Adenosina, Bioluminiscencia, Control de Calidad.

INTRODUCCIÓN

Debido a las diferentes técnicas de manufactura y presentación del producto existe una necesidad creciente de verificar la ausencia de microorganismos viables en un volumen determinado del producto. El control microbiológico estándar utilizado es el Recuento en Placa con un tiempo de cuarentena de 10 a 15 días. La Bioluminiscencia por ATP como una alternativa a los procedimientos de control de calidad microbiológico tradicionales proporciona resultados rápidos, exactos y sensibles a través de una operación sencilla. La técnica de detección está basada en la reacción ATP (Adenosin-trifosfato) presente en todos los organismos vivos. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente ya sea en una mesada (lote) o en el producto final. Mediante un Luminómetro portátil se mide la cantidad de fotones emitidos en URL o Unidades Relativas de Luz que es proporcional a la cantidad de microorganismos presentes. En vista de lo anteriormente mencionado este proyecto pretende considerar el método de Bioluminiscencia basado en la reacción de ATP que permite la detección rápida de microorganismos como una estrategia dinámica, sensible y específica frente a la metodología estática de Recuento en Placa que depende de la producción de biomasa visible.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

Inicialmente se realizó una prueba piloto con 30 muestras al azar de cada producto (refrescos de mora, mango, naranja, durazno) con un volumen por bolsa de 200 ml y 30 botellas al azar de bebida de malta con un volumen de 100 ml la cual permitió tener un tamaño de muestra apto para obtener unos datos finales satisfactorios.

Se hizo a cada muestra de refresco y a cada botella de bebida de malta una inducción de contaminación previamente estandarizado (UFC existentes en el inóculo: *B. licheniformis*, *Rhodotorula sp* y *Penicillium sp* para refrescos de fruta; *Lactobacillus sp*, *Hansenula sp* y *Penicillium sp*, para bebida de malta) y crioconservada en glicerol al 600% a fin de realizar diferentes recuentos microbiológicos como son

Tabla 1. Análisis microbiológico para refrescos de fruta y bebida de malta

MICROORGANISMO	TÉCNICAS	AGAR	TEMP °C	TIEMPO
<i>B. Licheniformis</i>	Profundidad	Plate Count	37	24-48 h
<i>Lactobacillus sp</i>	Profundidad	SDA	37	24-48 h
Mohos y Levaduras	Profundidad	PDA	25	3-5 días

Paralelamente se tomaron muestras del producto en estudio sin inocular aplicando la técnica de Recuento en Placa y la técnica de Bioluminiscencia agregando 100 microlitros de la muestra al dispositivo de hisopo y realizando la lectura en el luminómetro con el propósito de descartar cualquier contaminación antes de agregar el inóculo y conocer el rango de partida de cada producto. Estos mismos procedimientos se realizaron a los productos inoculados.

PRUEBA FINAL

A partir del tamaño muestral deducido por análisis estadístico de la prueba piloto, se realizaron pruebas paralelas de bioluminiscencia y recuento en placa a los productos en estudio induciendo contaminación con el mismo inóculo utilizado en la prueba inicial (piloto) a lo largo de doce horas con un intervalo de 2 horas para cada medición

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRUEBA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE BIOLUMINISCENCIA FRENTE AL RECUENTO ESTÁNDAR EN PLACA PARA REFRESCOS DE FRUTA Y BEBIDAS DE MALTA

- ESTADÍSTICA

La sensibilidad de un método puede definirse como la proporción de los microorganismos buscados que pueden desarrollarse en las condiciones de la prueba y mostrar reacciones características. (Doyle, 2001)

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Positivos verdaderos (PV)}}{(\text{PV}) + \text{Falsos negativos (FN)}}$$

La especificidad se refleja en la proporción de microorganismos no buscados que muestran dichas reacciones. (Doyle, 2001)

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativos verdaderos (NV)}}{(\text{NV}) + \text{Falsos negativos (FN)}}$$

De acuerdo a esta prueba estadística la probabilidad de reconocimiento de los microorganismos para la técnica de bioluminiscencia fue:

Tabla 2. Probabilidad de hallazgo de microorganismos para la Técnica de Bioluminiscencia

PRODUCTO + MICROORGANISMO	PROBABILIDAD DE HALLAZGO PARA URL (%)
Refresco naranja + Bacteria	81.25
Refresco naranja + Levadura	77.25
Refresco naranja + Moho	53.8
Refresco mora + Bacteria	65.5
Refresco mora + Levadura	83.3
Refresco mora + Moho	77.7
Refresco mango + Bacteria	70
Refresco mango + Levadura	83.75
Refresco mango + Moho	29.83
Refresco durazno + Bacteria	81.25
Refresco durazno + Levadura	87.75
Refresco durazno + Moho	38.75
Bebida de malta + Bacteria	16.25
Bebida de malta + Levadura	85
Bebida de malta + Moho	72.5

Dada la variabilidad en el comportamiento de los microorganismos no se pudo establecer con exactitud la probabilidad de hallazgo de los mismos aplicando esta prueba estadística para la técnica de Recuento en Placa por lo que se estableció un análisis de ausencia - presencia de los microorganismos inoculados a partir de los recuentos en placa observados. (Tabla 3)

Los resultados obtenidos aplicando la técnica de Bioluminiscencia permiten conocer el porcentaje de probabilidad de hallazgo de los microorganismos marcado en un rango amplio de URL, disminuyendo el nivel de contabilidad para determinar cuantitativamente la carga contaminante presente en el producto. Este amplio rango puede ser atribuido a la alta carga de ATP contenido en los componentes propios de cada producto que no permiten distinguir de forma clara el ATP no microbiano del microbiano en el momento de analizar la muestra.

Con respecto al Recuento Estándar en Placa permite conocer la sensibilidad y especificidad de la técnica debido a que todos los recuentos para los diferentes microorganismos fueron positivos. Este resultado pudo ser originado a partir del medio de cultivo específico utilizado para cada tipo de microorganismo el cual proporciona los nutrientes y las condiciones requeridas para su óptimo desarrollo. Sin embargo, la población inicialmente inoculada se vio afectada por diferentes factores tales como pH, conservantes, saborizantes, estabilizantes y propiedades típicas de las frutas y de las bebidas de malta que provocaron tanto la disminución como el aumento de la población microbiana a lo largo del tiempo. Otra posible explicación a este fenómeno (disminución y aumento de la población) puede ser que los microorganismos lleguen a la fase críptica (conocida como la fase en donde en ausencia o disminución de nutrientes, el

microorganismo comienza a esporular para sobrevivir), originándose un cambio en la curva de crecimiento.

Tabla 3. Rangos de UFC de productos en estudio

MICROORGANISMO + PRODUCTO	RECUESTO EN PLACA(UFC)
Refresco naranja + Bacteria	8-23
Refresco naranja + Levadura	19-53
Refresco naranja + Moho	10-91
Refresco mora + Bacteria	3-26
Refresco mora + Levadura	7-26
Refresco mora + Moho	2-38
Refresco mango + Bacteria	4-31
Refresco mango + Levadura	8-37
Refresco mango + Moho	1-100
Refresco durazno + Bacteria	6-120
Refresco durazno + Levadura	7-26
Refresco durazno + Moho	57-106
Rango Total	1-120
Bebida de malta + Bacteria	20-39
Bebida de malta + Levadura	8-37
Bebida de malta + Moho	39-108
Rango total	8-108

LÍMITES DE CONFIANZA PARA LA MEDIA DE UNA POBLACIÓN REPRESENTADA EN UFC Y URL

La manera más informativa de cuantificar el error aleatorio es construir intervalos (límites) de confianza de acuerdo a los resultados de la prueba. Los intervalos de confianza permiten al lector observar el intervalo de valores compatible con los resultados obtenidos, pudiéndole comparar con el de otras pruebas. (Stephen, 1990).

Aplicando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\bar{X} \pm t \times s}{\sqrt{n}}$$

se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4. Límites de confianza para la media de la población en estudio.

PRODUCTO+MICROORGANISMO	URL	UFC
Refresco naranja+Bacteria	6.66<μ<7.23	14.2<μ<19.8
Refresco naranja+Levadura	6.30<μ<6.69	29.2<μ<36.9
Refresco naranja+Moho	6.83<μ<7.26	26.0<μ<29.3
Refresco mora+ Bacteria	2.55<μ<3.04	15.7<μ<17.9
Refresco mora+ Levadura	2.12<μ<3.38	12.6<μ<29.0
Refresco mora+ Moho	2.80<μ<3.19	16.7<μ<18.1
Refresco mango+ Bacteria	5.57<μ<6.02	18.4<μ<21.5
Refresco mango+ Levadura	5.20<μ<5.59	14.8<μ<27.5
Refresco mango+ Moho	5.60<μ<6.08	18.5<μ<27.6
Refresco durazno+ Bacteria	5.60<μ<6.06	19.7<μ<38.3
Refresco durazno+ Levadura	5.56<μ<5.94	9.37<μ<18.6
Refresco durazno+ Moho	5.30<μ<5.45	79.0<μ<85.2
Bebida de malta+Bacteria	1.99<μ<2.40	24.9<μ<30.5
Bebida de malta+Levadura	3.26<μ<3.63	15.1<μ<27.9
Bebida de malta+Moho	2.40<μ<2.79	59.7<μ<76.5

CONCLUSIONES

La metodología empleada durante el estudio muestra una alta confiabilidad del mismo, puesto que permitió el cumplimiento de los objetivos propuestos. El análisis de regresión aplicado a la técnica de Recuento Estándar en Placa demostró que para los refrescos de fruta el 66.6% de las UFC acepta la H_0 lo que indica que no hay una variación significativa en la población existente a través del tiempo al igual que en la bebida de malta cuyo porcentaje es el mismo. El análisis de regresión aplicado a la técnica de Bioluminiscencia demostró que para los refrescos de fruta el 50% de las URL acepta la H_0 lo que indica que no hay variación significativa en la población existente a través del tiempo y para la bebida de malta es de un 66.6% aceptando la H_0 . De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de las pruebas de sensibilidad y especificidad aplicadas a las dos técnicas en estudio se pudo comprobar que la técnica de Recuento Estándar en Placa es más sensible y específica que la de Bioluminiscencia debido a las condiciones óptimas que ésta brinda para su crecimiento y cuantificación. Por medio de un análisis de intervalos de confianza se pudo precisar el factor de correlación de UFC y URL. El método de Bioluminiscencia permite obtener resultados en un corto periodo de tiempo, sin embargo, no especifica cuantitativamente la población microbiana existente en una muestra determinada debido al ATP no microbiano presente en la muestra. El método de Recuento Estándar en Placa garantiza la obtención de resultados microbiológicamente confiables de una manera más económica pero con un periodo de tiempo más prolongado que la técnica de Bioluminiscencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.R. ; Moss, M.O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.; 1997; pp 67-69, 395-398.
- Alfa Laval. **Manual de Pasteurizador**. 1995
- ANDI.. Cap IV. **De los refrescos de fruta**. Resolución N° 7992 de 1991
- Ashuzw, P.R. **Producción y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gas**. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.; 1999; pp 350.
- Barrios, L.D.; Bravo, C. P. En: **Optimización del proceso de pasteurización en refrescos de naranja y mango en una planta procesadora en Santafé de Bogotá**. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. 1999.
- Berlitz, H. D. **Química de los alimentos**. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.; 1991.
- BIOCONTROL. **Manual del luminómetro**. 2000.
- BioMéreux. **Manual de medios de cultivo**. 1999.
- Brock, T. **Biología de los microorganismos**. 8ª Edición. Méjico: Prentice Hall; 1997.
- Daniel, W. **Bioestadística**. México: Noruega Editores; 1996; pp 175, 455-456.
- Doyle, M. **Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras**. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.; 2001; pp 122, 428, 734-737.
- BBC (European Brewers Convention). **Beer Pasteurization Manual**. 1995; pp 352-385.
- Fenneman, O. **Química de los alimentos**. Barcelona España: Editorial Reverté; 1993.
- Frazier, W.C **Microbiología de los alimentos**. 4ª edición; Zaragoza España: Editorial Acribia; 1993; pp 423.
- García N.Y.; Gutiérrez, A.P. En: **Alternativa para inhibir el crecimiento de microorganismos en bebida concentrada de malta**. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana; 2001.
- Hough, J.S. **Biología de la cerveza y la malta**. Zaragoza España: Editorial Acribia S. A.; 1990; pp 126-129.
- ICONTEC. **Normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos**. Resolución N° 7992 (1995).
- ICONTEC. **Bebidas de cebada malteada**. NTC 4474.
- Jay, J. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3ª edición. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.; 1994; pp 40, 162-165.
- Master Brewers. 1982.
- Merck. **Manual de medios de cultivo**. 1999.
- Muller, G **Microbiología de los alimentos vegetales**. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.; 1981; pp 192.
- Ordoñez, J. A. **Tecnología de los alimentos: Componentes de los alimentos y procesos**. Vol 1. España: Editorial Síntesis; 1998; pp 151-154.
- Pérez, E.; Roa, A. **En Optimización del proceso de producción de una bebida a base de avena**. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana; 2001.
- Pineda, E. **Metodología de la investigación: Manual para desarrollo de personal de salud**. 2ª edición; OMS; 1997.
- Roger, V. **Lactología técnica**. Zaragoza España: Editorial Achbia S.A.; 1998.
- Varnam, A; Butherland, J.P. **Bebidas**. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.; 1997; pp 38-39
- Werner, B. **Prevención de infecciones "condiciones de pasteurización para la destrucción de microorganismos en la industria de bebidas"**.
- (a) www.Jenck.com/celsis.htm
- (b) www.fao/iaea.com
- (c) ww.botany.utoronto.ca/researchlab/malloch/moulds/Penicillium
- (d) www.jade.bo@utoronto.ca/researchlabs/mallochlab/malloch/moulds/lpenicillum
- (e) www.asmusa.org/branch/brscal/photos.rhodotorula.html
- (f) www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorfasp?articleid=6
- (g) www.itismolinari.mi.it/documents/pea/hansenulaphoto.htm