

## **Evaluación de la Incertidumbre en el Método de Bacterias Aerobias en una matriz de alimentos.**

Saavedra Villarreal N.<sup>a,\*</sup>, Zaragoza García J.M.<sup>a</sup>, Del Ángel Sifuentes B.S.<sup>a</sup>, Aguirre Flores D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología, Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, CP 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

\*nidiasisaave25@hotmail.com

### **RESUMEN:**

En el presente trabajo se evaluó la incertidumbre asociada a la determinación de mesófilos aerobios expresada como cuenta total en ufc/mL por el método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en placa, Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, en la microbiología sanitaria es de vital importancia contar con un control de la calidad, dentro del cual, debe considerarse el método de ensayo para garantizar una óptima calidad de los datos resultantes, con respecto a la normativa vigente, El cálculo de la incertidumbre está siendo abordado por la comunidad de laboratorios y se espera que en un futuro se disponga de directrices más claras en este campo. La incertidumbre, como un atributo cuantificable, es un concepto relativamente nuevo en la historia de las mediciones, a pesar de que los conceptos de error y análisis de error han sido parte de la práctica de la ciencia de la medición por largo tiempo. De manera general se acepta que cuando todas las componentes, conocidas o supuestas, del error han sido evaluadas y se han aplicado las correcciones, aún persiste una incertidumbre acerca de la confiabilidad del resultado expresado.

En este trabajo se realiza una estimación de la incertidumbre en los ensayos microbiológicos de cuanta de bacterias aerobias en alimentos, siguiendo las recomendaciones que aparecen en documentos normalizativos nacionales e internacionales. Se ofrecen los resultados alcanzados en la cuantificación de este importante parámetro. Los componentes de la incertidumbre se organizaron en tablas, lo que permite realizar de una forma rápida una apreciación global..

### **ABSTRACT:**

In the present work, the uncertainty associated with the determination of aerobic mesophiles expressed as total bill in cfu / mL was evaluated by the method for the Aerobic Bacteria Account in plate, Official Mexican Standard NOM-092-SSA1-1994, in the sanitary microbiology It is of vital importance to have a quality control, within which, the test method must be considered in order to guarantee an optimum quality of the resulting data. with respect to current regulations, the calculation of uncertainty is being addressed by the laboratory community and it is expected that in the future clearer guidelines will be available in this field. Uncertainty, as a quantifiable attribute, is a relatively new concept in the history of measurements, although the concepts of error and error analysis have been part of the practice of measurement science for a long time. It is generally accepted that when all the known or assumed components of the error have been evaluated and the corrections have been applied, uncertainty persists about the reliability of the expressed result.

In this work an estimation of the uncertainty in the microbiological assays of how many aerobic bacteria in food is made, following the recommendations that appear in national and international normative documents. The results achieved in the quantification of this important parameter are offered. The components of the uncertainty were organized in tables, which allows a rapid global assessment..

### **Palabras clave:**

Incertidumbre expandida, incertidumbre combinada, bacterias aerobias, alimentos, análisis microbiológico, ensayo.

### **Key words:**

Expanded uncertainty, combined uncertainty, aerobic bacteria, food, microbiological analysis, test.

**Área:** Microbiología y biotecnología

## INTRODUCCIÓN

La incertidumbre de medida es un parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando. El concepto de incertidumbre, como un atributo cuantificable, es relativamente nuevo en la historia de las mediciones en México, aunque los términos error y análisis de error han sido bastamente usados como parte práctica de la ciencia de las mediciones o metrología. Cuando se han evaluado todas las componentes, conocidas y supuestas de un error, y se han aplicado las correcciones adecuadas, todavía queda como remanente una incertidumbre sobre la corrección del resultado establecido, esto es, la duda de cuán bien representa el resultado de la medición al valor de la magnitud que se está midiendo. La incertidumbre del resultado de una medida refleja la falta de conocimiento exacto del valor del mensurando. Esa incertidumbre proviene de los efectos aleatorios y de la corrección imperfecta del resultado de la medida debida a efectos sistemáticos.

El objetivo de un sistema de gestión de las mediciones es gestionar el riesgo de que los equipos y procesos de medición pudieran producir resultados incorrectos que afecten a la calidad del producto de una prueba de ensayo. De acuerdo a los lineamientos en nuestro país sobre la evaluación de la competencia técnica de los laboratorios de calibración y ensayo, se solicita la estimación de la incertidumbre de las mediciones, las cuales deben aplicar criterios técnicos uniformes y consistentes, propuestos por la Entidad Mexicana de Acreditación A.C. (EMA), la cual entró en vigor en Julio del 2008, esta Guía técnica de Trazabilidad e Incertidumbre de las Mediciones sirven de apoyo a la aplicación de la norma NMX-EC-17025-INMC-2006.

Cuando se crea un modelo para evaluar la incertidumbre y se analizan las diferentes variables que influyen en el proceso de medición, cualquier evento, fenómeno o propiedad que pueda restar nitidez al valor del mensurando, participa como factor o componente de la incertidumbre en el valor de la medición. Cabe mencionar que no siempre serán tomadas en cuenta todas ellas, pues habrá algunas que sus valores no sean significativos y serán descartadas.

Entre las variables que afectan la incertidumbre se encuentran: a) la medición; de la cual se obtiene información del estado de una propiedad empírica (proceso de medición) y b) la estabilidad de los instrumentos de medición donde se considera el ruido propio o ambiental y la combinación de diversos errores aleatorios.

La evaluación de la incertidumbre debe efectuarse, si y solo si, se cumple con los requisitos que se enuncian a continuación: las personas que realizan el análisis de incertidumbre deben tener un buen conocimiento del proceso de medición y de sus limitaciones, así como de la naturaleza de las magnitudes que deben medirse. Además deben conocer el propósito de la medición y uso que se le dé.

Hasta la fecha, los conceptos básicos que se utilizan para cuantificar son de naturaleza estadística, por lo tanto, el personal de evaluación debe tener un conocimiento de esta disciplina. La instalación, los reactivos, el tipo de equipos, los aditamentos y las condiciones ambientales así como sus posibles variaciones deben estar definidos. Los tipos de instrumentos y de los equipos deben estar especificados. El comportamiento de los mismos, a largo plazo, así como la acción de las variables de influencia, deben ser conocidos o por lo menos enmarcados dentro de ciertos valores y finalmente, el procesamiento de la información recolectada debe estar definido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### METODOLOGÍA MICROBIOLÓGICA:

Se utilizó el método de vertido de placa (Pour Plate) para los recuentos de bacterias mesófilas aerobias.

#### Número de muestras.

El número de muestras utilizadas por matriz (alimento para bebé: papilla de carne y verduras), se evaluó en un nivel de inóculo por cada analista como se muestra en la Tabla II. El análisis se realizó por duplicado de placas para bacterias mesófilas aerobias.

**Preparación de muestras inoculadas para bacterias mesófilas aerobias.**

Se utilizó una matriz: alimento para bebé: papilla de carne y verduras. La matriz se inoculó con un nivel de *Escherichia coli* conocido, se realizaron dos repeticiones de los inóculos. Para las muestras homogenizadas se realizaron diluciones (10<sup>-2</sup>) utilizando 10 mL de la muestra diluida y mezclando con 90 mL de buffer fosfato, pH 7.2. Se utilizó el método de vertido de placa para las siembras de cada una de las muestras, se colocó 1 mL de cada dilución por duplicado en platos Petri estériles y se agregó 15 mL de medio Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar). Se esperó tres minutos para que el medio se solidificara. Una vez solidificado el medio, se colocaron los platos Petri en la incubadora a 37 °C por 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó el recuento sugerido por el método Aerobic Plate Count, FDA.

**Preparación de muestras control inoculadas.** En 100 mL de buffer fosfato, pH 7.2 se agregó 1 mL del inóculo. La muestra control fue diluida y sembrada como se describió anteriormente.

**Preparación de placas para control de medio.** Para controlar la esterilidad del medio, se vertió 15 mL de medio Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar) en placas Petri individuales. Se incubó a 37 °C por 24 y 48 horas respectivamente.

**Recuento y registro de colonias UFC/g o UFC/mL.** Para reportar UFC/g o mL se utilizó la siguiente:

$$C = \frac{N_{11}d_1 + N_{12}d_1 + N_{21}d_2 + N_{22}d_2}{n} \quad \text{Ec. (1)}$$

Dónde: N = Número de colonias por g o mL de producto. d = Dilución de la que se obtuvieron los primeros recuentos. n = Número de diluciones tomadas para el cálculo.

Para la presente evaluación de la incertidumbre se tomó como referencia la NMX-EC-17025-INMC-2006 y la EUROCHEM. La estimación de la incertidumbre de una medición se realiza en las siguientes etapas: especificaciones del mesurando, expresar el modelo matemático del mensurando, identificar las fuentes de incertidumbre, cuantificar la incertidumbre de cada componente, combinar las incertidumbres estándares, calcular la incertidumbre expandida y definir expresión de los resultados.

El modelo utilizado tiene la ventaja de que con el estudio de cada una de las contribuciones permite identificar las fuentes que más contribuyen a la incertidumbre y así reducirlas para mejorar los resultados de los ensayos. El objetivo de este trabajo es la estimación de la incertidumbre en los ensayos microbiológicos de bacterias aerobias en alimentos mediante la técnica de cuenta en placa, aplicando las recomendaciones de los documentos normalizativos nacionales e internacionales más actualizados, con el objetivo de cumplir con los requisitos de la NC ISO 17025:2000.

A continuación se describe la metodología para calcular la incertidumbre de la determinación de bacterias aerobias en placa para muestras de matriz líquida de alimentos según norma NOM-092-SSA1-1994.

1. El método objeto de estudio fue el Ensayo de “Determinación de bacterias aerobias en placa para muestras de alimentos en una matriz líquida, mediante la técnica de cuenta en placa”.

**El modelo de trabajo utilizado está basado en los siguientes documentos normalizativos:**

Guía para la expresión de la incertidumbre de las mediciones (ISO 17025, 2006)

Guía para cuantificar la incertidumbre en las mediciones analíticas (EURACHEM/CITAC, 2000).

NC TS-367: 2004. Guía para la estimación y expresión de la incertidumbre de la medición en análisis Químico.

Etapas fundamentales para la estimación de la incertidumbre:

- Descripción del Mensurando.
- Identificación de las Fuentes de Incertidumbre.

- Cuantificación de los Componentes de la Incertidumbre.
- Cálculo de la Incertidumbre Combinada.
- Cálculo de la Incertidumbre expandida.

La incertidumbre de la medición expandida  $U$  está dada por:

$$U = k \times RSD_r \times c$$

donde:

$k$  = factor de cobertura.

$RSD_r$  = desviación típica relativa hallada según se describió anteriormente.

$c$  = concentración del analito. [Ec. (1)]

Para estimar la incertidumbre de los instrumentos de medición de volumen se utilizó una evaluación tipo B, con distribución triangular, usando la ecuación 2.

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. (2)}$$

La etapa final fue calcular la incertidumbre expandida, que se determina al multiplicar la incertidumbre combinada  $u_c$  por el factor de cobertura ( $k = 2$ ), factor de cobertura al 95% de nivel de confianza) elegido para calcular una incertidumbre expandida ( $U_{exp}$ ).

$$U = u(\ ) \times 2, \text{ para } k = 2 \quad \text{Ec. (3)}$$

La incertidumbre expandida se requiere para proporcionar un intervalo con un nivel de confianza al 95%, el cual se espera que abarquen una fracción grande de la distribución de valores, los cuales pueden ser razonablemente atribuidos al mesurando. De esta manera la incertidumbre de bacterias aerobias expresado en UFC/G obtenido queda expresado como:

$$\text{Bacterias Aerobias} \frac{UFC}{g} = \frac{UFC}{g} \pm U_{(exp)} \quad \text{Ec. (4)}$$

Identificar todas las posibles fuentes de incertidumbre. Las principales fuentes de incertidumbre en la medición quedan incluidas en Tabla I.

**Tabla I.** Principales fuentes de incertidumbre en la medición

<i>Etapa operativa</i>	<i>Fuentes de incertidumbre</i>	<i>Magnitud involucrada</i>
<i>Sub-muestreo</i>	<i>Toma de muestra</i>	<i>masa</i>
<i>Método de preparación de la muestra</i>	<i>Analista</i>	<i>volumen</i>
<i>Calibración externa</i>	<i>Verificación de material volumetrico</i>	<i>volumen</i>
<i>Medición</i>	<i>Repetibilidad y reproducibilidad del proceso de cuenta en placa</i>	<i>UFC</i>

En la NMX-17025-IMNC-2006 se recomiendan las fuentes de incertidumbre que han sido mencionadas en la Tabla I, sin embargo en la prueba a realizar, se ha descartado la etapa de sub-muestreo, ya que en este caso en particular se trabajó con diferentes matrices que fueron muestreadas por la empresa interesada en el estudio, así la fuente de incertidumbre que se considera en el cálculo será: 1) método de preparación de la muestra, se toma la muestra por duplicado para realizar la prueba, el resultado por duplicado proporciona información que corresponde al tratamiento que se les da a las muestras antes de ser analizadas y la incertidumbre se puede notar por la dispersión en la reproducibilidad de los datos obtenidos en la confirmación del método del analista, 2) verificación de material volumétrico utilizado en la medición, que involucra la incertidumbre estándar de linealidad y resolución y 3) repetibilidad y reproducibilidad del proceso expresada como la incertidumbre del analista.

Para la cuantificación de cada componente se considera que la cuantificación de la incertidumbre combinada involucrada en la ecuación del modelo matemático queda definida por la Ec. (1) La incertidumbre de la resolución queda definida por la Ec. (2), donde dicha incertidumbre se calcula suponiendo una distribución triangular, el valor obtenido fue  $u(\text{resolución})$ .

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla II, quedan resumidos los resultados de las cuentas en placa de bacterias aerobias y su repetibilidad, en la Tabla III, se muestra la distribución de la incertidumbre combinada para el método de bacterias aerobias en placa y en la tabla IV observamos los resultados finales y su incertidumbre expandida.

Los valores mostrados en la tabla III corresponden a la incertidumbre asociada a cada uno de los factores de influencia en la cuenta de bacterias aerobias en placa para una matriz sólida que fueron analizadas de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994.

La evaluación de la incertidumbre realizada en este trabajo se llevó a cabo en una muestra con diez repeticiones en las cuales se obtuvieron conteos de 5,400 a 11,000 ufc/g. Adicionalmente en la evaluación de la incertidumbre no se incluyeron algunos otros factores de influencia como son las etapas de sub muestreo, entre otros.

**Tabla II.** Repetibilidad y recuento de bacterias aerobias en placa por el analista 1.

Repetición	Placa 1 Dil 1:100	Placa 2 Dil 1:100	Promedio	Promedio*FD (UFC/g)	Log(promedio)	Promedio
Repetición 1	70	89	79.5	8000	3.9031	3.8714
Repetición 2	51	55	53.0	5300	3.7243	Desviación estándar
Repetición 3	112	99	105.5	11000	4.0414	
Repetición 4	66	67	66.5	6700	3.8261	0.10898
Repetición 5	76	78	77.0	7700	3.8865	DSR
Repetición 6	80	89	84.5	8000	3.9031	0.0281
Repetición 7	58	50	54.0	5400	3.7324	DSR <sup>2</sup>
Repetición 8	100	101	100.5	11000	4.0414	0.00079
Repetición 9	63	71	67.0	6700	3.8261	r
Repetición 10	60	75	67.5	6750	3.8293	0.0000

**Tabla III.** Distribución de la incertidumbre combinada para el método de bacterias mesófilas aerobias

Componente de la incertidumbre	Valor de la incertidumbre
Incertidumbre conteo	0.9944
Incertidumbre equipos	0.00959 mL

	0.02015 mL
--	------------

Se evaluó el procesador creado para determinar la incertidumbre de la cuenta de bacterias aerobias en una matriz sólida, con la finalidad de conocer si este diseño cumple con las especificaciones dictadas por la NMX-EC-17025-INMC-2006.

Los resultados obtenidos de incertidumbre para dicha prueba se encuentran entre 98 y 151 ufc/g valores que al ser redondeados da un resultado de 100 ufc/g, por lo que la incertidumbre estimada se encuentra dentro de los valores esperados ya que representa un valor menor al 2 % del resultado obtenido por muestra, esto corrobora que el proceso de la prueba tiene un alto grado de confiabilidad en los valores obtenidos. Además se verificó que los factores externos como medio ambiente, analista, inóculo y equipo de laboratorio no influyen de manera negativa al momento de realizar el análisis.

**Tabla IV. Incertidumbre expandida en la determinación de bacterias aerobias en placa.**

Muestra	Promedio*FD (UFC/g)	U ( UFC/g)
Repetición 1	8000	123
Repetición 2	5300	98
Repetición 3	11000	151
Repetición 4	6700	126
Repetición 5	7700	115
Repetición 6	8000	123
Repetición 7	5400	117
Repetición 8	11000	146
Repetición 9	6700	126
Repetición 10	6800	109
	7600	±100

## CONCLUSIÓN

Podemos concluir que este procesador puede proporcionar una idea clara del intervalo en el que se encuentra el verdadero valor del mesurando y cuáles son las variables significativas que influyen en este proceso de estimación, el cual cumple satisfactoriamente. Además, la estimación de la incertidumbre en el laboratorio de prueba permite llevar a la evaluación del desempeño de los equipos y los analistas involucrados en el proceso. En este trabajo se presentaron resultados de la Cuenta de Bacterias Aerobias en una matriz sólida de alimento para bebé, con la finalidad de resaltar la eficiencia del procesador de incertidumbre cuando se manejan concentraciones entre 2,500 y 25,000 ufc/g, como podemos observar encontramos valores de incertidumbre menor al 2 % lo que resalta la eficiencia del procesador.

## BIBLIOGRAFÍA

Robert , M., Mayarí,R., & Espinosa, M.,(2005). Estimación de La Incertidumbre en los Ensayos Microbiológicos de Coliformes Totales y Fecales en Aguas y Aguas Residuales mediante la Técnica de Tubos Múltiples de Fermentación, *CENIC. Ciencias Biológicas*, Vol. 36, No. Especial.

NMX-17025-IMNC-2006. IMNC. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (2006).

Eurachem-Citac “Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement” 2nd. Edition (2000).

## Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SAA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

NMX-Z-055:1996 IMNC Metrología – Vocabulario de términos fundamentales y generales, equivalente al documento International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1993. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (1996).