



Verificación de métodos alternativos para la cuantificación de mohos y levaduras en una empresa alimentaria según la Norma ISO 16140-3:2021

Verification of alternative methods for the quantification of molds and yeasts in a food company according to the ISO 16140-3:2021 standard

MARÍA T. ARAUJO SÁEZ^{1*}, LAURA DE OLIVEIRA^{2**}, LIZET BOU RACHED^{3***},
MARÍA ISABEL CALDERÓN^{4***}, ALICIA MARIELA RINCÓN^{5***}, ANA MARÍA REYES^{6***}

Resumen

La verificación es un proceso clave en el aseguramiento de la calidad analítica, mediante el cual un laboratorio confirma que un método validado funciona correctamente bajo sus condiciones específicas y en las matrices alimentarias de su interés. Según la norma ISO 16140-3:2021, todo método alternativo debe ser verificado antes de su aplicación rutinaria, como paso posterior a la validación. En este estudio se verificaron tres métodos alternativos, Petrifilm RYM, MC-Media Pad YM y Microfast YM, para el recuento de mohos y levaduras en alimentos, como opciones más rápidas y eficaces frente al método de referencia Agar Papa Dextrosa (PDA). Se estandarizó un procedimiento para la obtención de inóculos estables en forma de "pool" con cepas representativas, se revisó el alcance de validación de cada método con el fin de determinar su aplicabilidad en distintas categorías de alimentos, y se definió el tipo de verificación según su validación (parcial o completa). Con base en esta información, se seleccionaron seis matrices: una de fácil manejo y cinco con propiedades desafiantes, como bajo pH y baja actividad de agua, entre otras. La verificación se realizó en dos fases: la implementación en laboratorio y la aplicación en matrices alimentarias. En ambas, los métodos cumplieron los criterios de aceptación, mostrando desviaciones estándar de reproducibilidad intralaboratorio (SIR) y desviaciones estimadas (eBias) conformes. Los resultados demostraron que los tres métodos pueden implementarse en la empresa, con la ventaja de reducir los tiempos de incubación de 120 a 72 e incluso a 60 horas, además de disminuir las horas-hombre. Estas mejoras contribuyen a una mayor eficiencia operativa, reducción de costos y continuidad de la cadena productiva, sin comprometer la calidad ni la inocuidad de los alimentos.

Palabras clave: Verificación, métodos alternativos, microbiología, mohos y levaduras, ISO 16140-3:2021, SIR, eBias

Abstract

Verification is a key process in analytical quality assurance through which a laboratory confirms that a validated method performs correctly under its specific conditions and within the food matrices of interest. According to ISO 16140-3:2021, every alternative method must be verified before routine use, as a step following validation. In this study, three alternative methods, Petrifilm RYM, MC-Media Pad YM, and Microfast YM, were verified for the enumeration of molds and yeasts in foods, as faster and more efficient options compared to the reference method, Potato Dextrose Agar (PDA). A standardized procedure was developed for obtaining stable inocula in the form of a "pool" composed of representative strains. The validation scope of each method was reviewed to determine its applicability to different food categories, and the type of verification was defined according to the corresponding validation level (partial or full). Based on this information, six matrices were selected: one easy-to-handle and five with challenging properties, such as low pH and low water activity, among others. Verification was carried out in two phases: laboratory implementation and evaluation in food matrices. In both methods, the acceptance criteria were met, with compliant intralaboratory reproducibility standard deviations (SIR) and estimated deviations (eBias). The results demonstrated that the three methods can be implemented in the company, offering the advantage of reducing incubation times from 120 to 72 or even 60 hours, as well as decreasing labor hours. These improvements contribute to greater operational efficiency, cost reduction, and continuity of the production chain, without compromising food quality or safety.

Keywords: Verification, alternative methods, microbiology, yeasts and molds, ISO 16140-3:2021, SIR, eBias

*Mención Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. **Gerencia de Investigación y Soporte Analítico (GISA), Empresas Polar. ***Unidad de Investigación Análisis de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. Correspondencia: email: lizetbourachedr@gmail.com y mariaraujots1625@gmail.com

Orcid: ¹[0009-0007-1947-7369](https://orcid.org/0009-0007-1947-7369)

²[0009-0003-7516-8449](https://orcid.org/0009-0003-7516-8449)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2025.88.2.11](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.88.2.11)

³[0009-0005-8951-0377](https://orcid.org/0009-0005-8951-0377)

⁴[0000-0002-2094-8638](https://orcid.org/0000-0002-2094-8638)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

⁵[0009-0003-7187-6966](https://orcid.org/0009-0003-7187-6966)

⁶[0009-0003-7516-8449](https://orcid.org/0009-0003-7516-8449)

Recepción: 06/10/2025

Aprobación: 20/10/2025

Introducción

En la industria alimentaria, el análisis microbiológico cumple un papel fundamental para garantizar la inocuidad y calidad de los productos. Este tipo de análisis permite detectar microorganismos que, además de deteriorar alimentos, pueden representar riesgos para la salud, como es el caso de mohos y levaduras. Estos hongos microscópicos se desarrollan en diversas condiciones ambientales y poseen capacidades metabólicas que los hacen responsables de alteraciones en el sabor, el olor, la textura y la apariencia de los productos. Además, algunos son capaces de producir micotoxinas, compuestos tóxicos termoestables que pueden persistir en los alimentos incluso después del procesamiento (Tournas y col., 2001; Marc, 2022).

La proliferación de mohos y levaduras no solo compromete la seguridad alimentaria, sino que también puede generar pérdidas económicas significativas para las empresas, ya sea por rechazos de productos, reclamos de los consumidores o daños a la reputación comercial (Hussain y Dawson, 2013). Por ello, su detección y cuantificación tempranas son clave para prevenir riesgos sanitarios y comerciales.

Tradicionalmente, el recuento de mohos y levaduras se ha realizado mediante el cultivo en Agar Papa Dextrosa (PDA), considerado el método de referencia, es decir, aquel que cuenta con aprobación internacional y amplia aceptación como procedimiento estándar para la detección o cuantificación de un determinado analito (ISO 16140-1, 2016). Este método ha sido adoptado por normas como la COVENIN 1337 (1990) y el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) de la FDA (Food and Drug Administration,

2001). Sin embargo, sus limitaciones, como largos tiempos de incubación (hasta 120 h), la preparación manual del medio y la alta demanda de recursos, han impulsado el desarrollo de métodos alternativos más rápidos, eficientes y fáciles de usar (Beuchat y Mann, 2016).

Un método alternativo es aquel que detecta o cuantifica el mismo analito que el método de referencia, pero mediante procedimientos diferentes y cuya equivalencia debe ser comprobada a través de una validación (ISO 16140-1, 2016). Entre estos destacan las películas secas rehidratables, como Petrifilm RYM, MC-Media Pad YM y Microfast YM, que consisten en placas listas para usar con medios de cultivo deshidratados, las cuales se activan al incorporar la muestra líquida que actúa como agente rehidratante (Samayoa y Hernández, 2023). Estas placas ofrecen ventajas significativas, como la reducción del tiempo de obtención de resultados (48-72 h), mayor practicidad operativa y mejor aprovechamiento del espacio en la incubadora (ADRIA Développement, 2022; Campden BRI y Q Laboratories, 2021).

Aunque estos métodos han sido validados por organismos internacionales para demostrar su equivalencia frente al método de referencia, la norma ISO 16140-3:2021 establece que cada laboratorio debe realizar una verificación interna antes de implementar el método, como paso posterior a la validación. Esta verificación tiene como objetivo confirmar que el método funciona correctamente bajo las condiciones específicas del laboratorio y en las matrices que son de su interés.

En el caso de los métodos cuantitativos, la verificación se desarrolla en dos etapas consecutivas, a saber, la verificación de

la implementación y la verificación de los artículos alimentarios (Putri y col., 2024). En ambas, se analizan matrices relevantes para el laboratorio, siempre que estén incluidas dentro del alcance de validación del método. No obstante, si durante los estudios de validación se incluyeron al menos cinco categorías diferentes de alimentos, el método se considera de amplio rango y puede aplicarse a cualquier categoría de producto, incluso si no todas fueron validadas de forma individual (Zagovalov y col., 2023).

La primera etapa de verificación, de carácter intralaboratorio, busca comprobar que el laboratorio es capaz de aplicar correctamente el método validado en sus condiciones habituales de trabajo. Para ello, se analiza una única matriz bajo distintas condiciones operativas, como diferentes analistas, lotes, equipos y materiales, evaluando la precisión de los resultados mediante la desviación estándar de reproducibilidad y comparándolos con los reportados en la validación interlaboratorio (ISO 16140-3, 2021).

La segunda etapa evalúa si las matrices de análisis habituales afectan el rendimiento del método. Aunque un método pueda estar validado para una amplia gama de productos, no todas las matrices han sido ensayadas durante la validación, por lo que el laboratorio debe confirmar su aplicabilidad en las matrices de su interés, ya que factores como la composición del alimento pueden interferir en los resultados. Por ello, se seleccionan matrices con condiciones desafiantes, como bajo pH, baja actividad de agua (aw) y alto contenido de grasa, y se evalúa la recuperación microbiana mediante la desviación de la estimación (eBias), comparando los resultados obtenidos con un control de inóculo (ISO 16140-3, 2021).

Tomando en cuenta todos estos aspectos y en línea con lo establecido por la norma ISO 16140-3:2021, el objetivo de este trabajo fue verificar tres metodologías alternativas -Petrifilm RYM, MC-Media Pad YM y Microfast YM - para la cuantificación de mohos y levaduras en una empresa alimentaria. Para ello, se inició con una revisión de las matrices en las que la empresa analiza mohos y levaduras, y se estandarizó un procedimiento para la obtención de inóculos. Posteriormente, se evaluó el alcance de validación de los métodos alternativos y, con base en estos resultados y en el interés de la empresa, se seleccionaron diversas matrices para su inclusión en el protocolo de verificación.

Materiales y Métodos

El esquema general de la metodología de este estudio se detalla en la Figura 1.

REVISIÓN DE LAS MATRICES

Se recopiló una base de datos correspondiente a los últimos siete meses de seis de las principales plantas productivas de la empresa, que incluye las materias primas y productos terminados analizados mediante recuento en placa de mohos y levaduras.

ESTANDARIZACIÓN DE INÓCULOS DE MOHOS Y LEVADURAS

Siguiendo un instructivo interno de la empresa, se estandarizó un método para la preparación de inóculos en forma de cócteles (pools), uno específico para levaduras y otro para mohos. Para ello, se seleccionaron cepas indicadoras de calidad con diferentes tiempos de crecimiento, algunos más prolongados que otros, lo

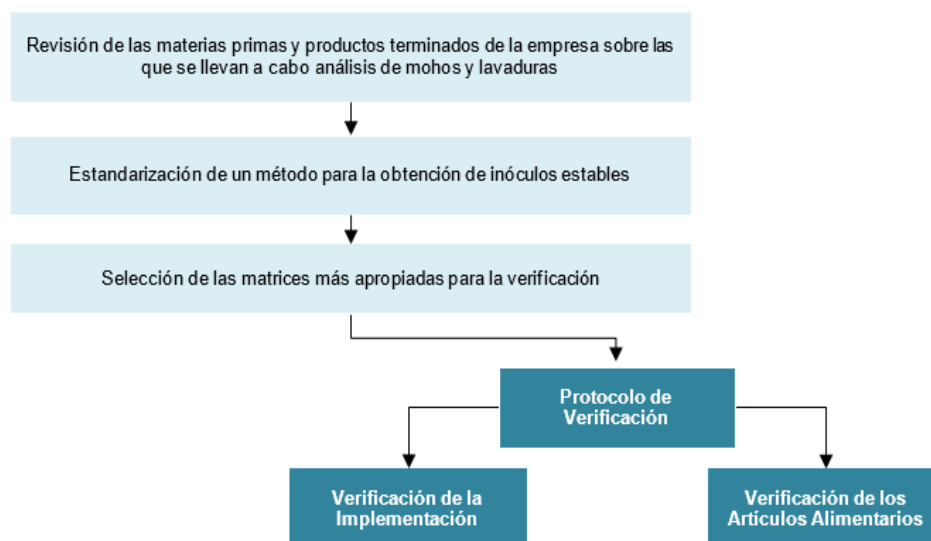


Figura 1. Esquema metodológico general (Fuente: Elaboración propia)

que resultó clave para verificar los métodos dentro del rango de tiempo establecido por los proveedores (48–72 h) y aportar mayor representatividad al estudio.

Se emplearon un total de cinco cepas de levaduras y cinco de mohos, todas proporcionadas por la empresa, tal como se muestra en la Tabla I.

Tabla I.

Cepas de levaduras y mohos utilizadas para la obtención de inóculos

Cepas de Levadura	Cepas de Mohos
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1. <i>Byssoschlamys fulva</i>
2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2. <i>Paecilomyces fulvus</i>
3. <i>Pichia anomala</i>	3. <i>Neosartorya fischeri</i>
4. Dos (2) levaduras sin identificar, aisladas de procesos productivos.	4. <i>Penicillium glabrum</i>
	5. <i>Aspergillus niger</i>

Fuente: Elaboración propia

Cada cepa se cultivó individualmente en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 25 °C. Las levaduras se incubaron en medio acidificado con ácido tartárico durante 5 días, mientras que los mohos se incubaron en medio no acidificado durante 10 días

para favorecer la esporulación. A partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones raspando el crecimiento microbiano con asas estériles. Para las levaduras, se emplearon 7 mL de agua destilada estéril y para los mohos, 10 mL de agua peptonada al 0,1% con 0,1% de Tween, a fin de facilitar la humectación. Las suspensiones de mohos fueron posteriormente filtradas para eliminar las estructuras no esporuladas.

Para determinar la concentración de cada suspensión, se realizó un recuento en placa tras aplicar diluciones seriadas, a partir de una estimación inicial de 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Las diluciones consecutivas fueron de 10^6 , 10^4 , 10^3 y 10^2 . A partir de la concentración de 10^4 UFC/mL de la suspensión, se realizaron las siembras por el método de superficie y las placas se incubaron durante 5 días.

Con base en las concentraciones de cada suspensión, se prepararon cócteles de inóculo con concentraciones entre 10^7 y 10^8 UFC/mL. En el caso de las levaduras, la mezcla se agitó, centrifugó y el sobrenadante fue descartado; luego se

restituyó el volumen con agua peptonada al 0,1% para mantener la concentración inicial. Finalmente, se determinaron las concentraciones de ambos cócteles mediante recuento en placa y se evaluó su estabilidad en el tiempo (ISO 16140-3, 2021).

EVALUACIÓN DEL ALCANCE DE LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

Se revisaron los informes de validación de los métodos alternativos con el fin de identificar las categorías de alimentos incluidas en dichos estudios. Esta información permitió determinar si los métodos son aplicables a una gama amplia o limitada de productos y, así, establecer en qué matrices pueden utilizarse durante el proceso de verificación, conforme a su alcance de validación (ADRIA Développement, 2022; Campden BRI y Q Laboratories, 2021; Lei y col., 2021).

SELECCIÓN DE LAS MATRICES

Con base en la aplicabilidad y el tipo de validación de los métodos alternativos, se definió un número mínimo pero representativo de matrices de interés para la empresa, cumpliendo los criterios de la norma ISO 16140-3:2021 para las fases de verificación.

Para Petrifilm RYM y MC-Media Pad YM, que cuentan con validación completa, la selección de matrices se realizó en función de las dos fases de verificación. En la verificación de implementación, se eligió una matriz de fácil manejo, de modo que la variabilidad observada reflejara únicamente la capacidad técnica del laboratorio para aplicar los métodos, sin interferencias por heterogeneidad de la matriz. En la verificación de productos alimentarios, se

seleccionaron cinco matrices “desafiantes” de diferentes categorías de alimentos para evaluar cómo sus características podrían afectar la recuperación microbiana de los métodos.

En el caso de Microfast YM, que cuenta con validación parcial, solo se realizó la segunda fase de verificación, ya que no existen datos de desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio (SR) que permitan verificar la implementación. Por motivos prácticos y sin comprometer la representatividad del estudio, se emplearon la misma matriz de fácil manejo y las mismas cinco matrices desafiantes que en los otros métodos.

DISEÑO DEL PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN

Primero se verificaron Petrifilm RYM y MC-Media Pad YM, que fueron los métodos disponibles al inicio del estudio, siguiendo los tiempos de incubación indicados por los proveedores (48 y 72 h). Para Microfast YM, se ensayaron incubaciones de 60 y 72 h con el objetivo de evaluar la posibilidad de reducir el tiempo de incubación de 60 h a 48 h.

1. Verificación de la implementación

Se analizaron 12 muestras de la matriz seleccionada para compensar posibles pérdidas de datos ocasionadas por errores prácticos durante el ensayo, superando así el mínimo requerido de 10 muestras (ISO 16140-3, 2021). Cada muestra fue homogeneizada, dividida en dos porciones (A y B), contaminada con un volumen determinado del cóctel de inóculo y sembrada por duplicado.

Este procedimiento, ilustrado en la Figura 2, se aplicó por separado para

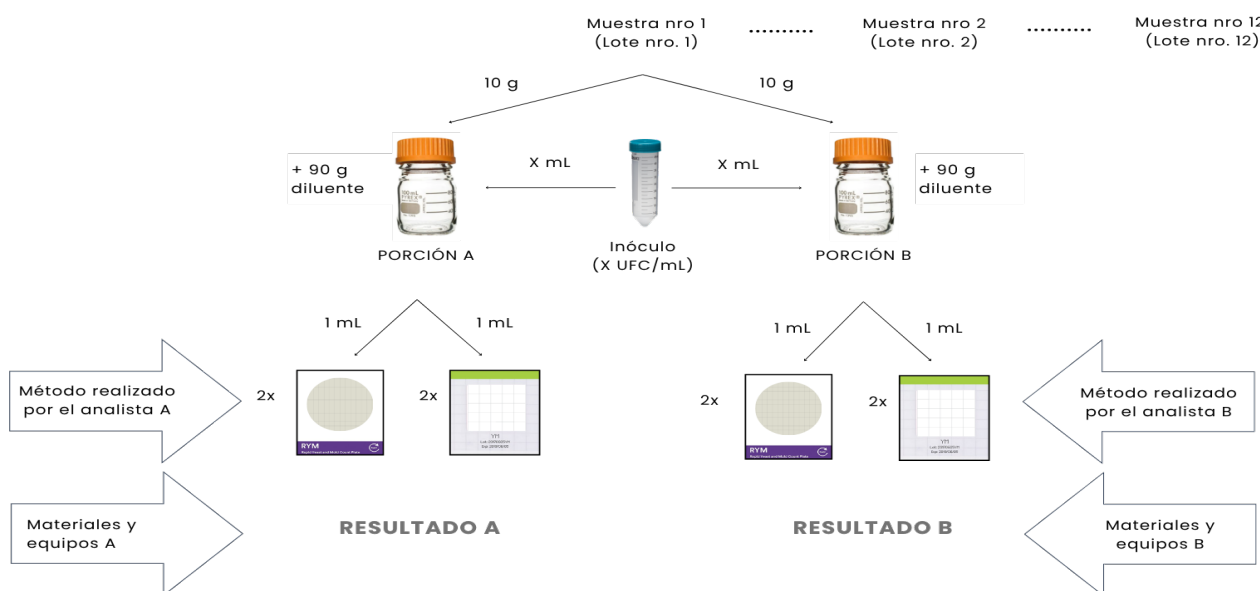


Figura 2. Esquema de protocolo de verificación de la implementación
(Fuente: Elaboración propia, basada en la norma ISO 16140-3, 2021)

mohos y levaduras, en cumplimiento de lo establecido por algunas normas nacionales que exigen su análisis de forma individual (COVENIN 1337, 1990).

La preparación de muestras se realizó conforme a la norma COVENIN 1126:2022. La Tabla II muestra los diluyentes empleados para esta primera etapa y la siguiente.

Los niveles de contaminación utilizados fueron de $1,2 \times 10^2$ a $1,2 \times 10^5$ UFC/g para levaduras y de 2×10^2 a 2×10^5 UFC/g para mohos. En los niveles de contaminación más altos, fue necesario realizar diluciones seriadas para garantizar que los recuentos se encontraran dentro del rango contable.

Tabla II.
Diluyentes seleccionados para cada matriz

Fase de la verificación	Matriz	pH experimental	Temperatura (C)	Contenido de grasa (%)	Diluyente seleccionado
Verificación de la implementación	Helado	7,02	23,0	<20	Agua peptonada 0,1 %
	Harina	6.28	23,0	<20	Agua peptonada 0,1 %
	Conc.	3,81	22,7	<20	Agua peptonada doble bufferada
Verificación de los artículos alimentarios	Naranja				Agua peptonada doble bufferada + 0,6% Tween 80
	Mayonesa	4,11	23,0	65	Agua peptonada 0,1 %
	Sirope	7.01	23,0	<20	Agua peptonada + Tween 80
	Cacao	6.91	23,0	<20	

Fuente: Elaboración propia basada en la norma COVENIN 1126:2022

Para asegurar la reproducibilidad y minimizar sesgos, las porciones A y B fueron analizadas bajo condiciones distintas, utilizando diferentes analistas, materiales y equipos (micropipetas, campanas de flujo laminar e incubadoras). Finalmente, se calculó la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (SIR) a partir de los resultados transformados a logaritmo decimal (\log_{10} UFC/g), utilizando la siguiente ecuación:

$$s_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

En esta fase, la SIR del método verificado debe ser igual o menor al doble de la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio (SR) reportada en la validación.

2. Verificación de los artículos alimentarios

Para todos los métodos, se analizaron tres muestras de cada una de las matrices seleccionadas, todas procedentes de distintos lotes. Cada muestra, dividida en dos porciones (A y B), fue contaminada con tres niveles distintos de inóculo (bajo, medio y alto), de acuerdo con la norma ISO 16140-3:2021. En cada nivel se incluyó además una tercera porción sin inocular, utilizada como control negativo para descartar la presencia de contaminación natural, así como un control de inóculo para la comparación. El procedimiento general, representado en la Figura 3, se aplicó de manera independiente tanto para mohos como para levaduras.

La preparación de las muestras se realizó según la norma COVENIN 1126:2022, utilizando los diluyentes indicados en la Tabla II para cada matriz. Las porciones A y B fueron inoculadas con un volumen adecuado del cóctel de inóculo, con niveles de $1,2 \times 10^3$, $1,2 \times 10^4$ y $1,2 \times 10^5$ UFC/g para levaduras, y de 2×10^3 , 2×10^4 y 2×10^5 UFC/g para mohos. En los niveles más altos se realizaron diluciones seriadas con el fin de garantizar que los recuentos permanecieran dentro del rango contable.

Los resultados obtenidos en las matrices se expresaron en \log_{10} UFC / porción analizada (100 mL), y los del cóctel de inóculo en \log_{10} UFC / volumen agregado a la porción (0,1 mL para mohos y 0,4 mL para levaduras). Con estos datos se calculó la desviación estimada (eBias), definida como la diferencia absoluta entre los resultados de las matrices artificialmente contaminadas y los del control de inóculo.

Se espera que, en cada nivel de contaminación, esta diferencia no supere los 0,5 \log_{10} . Si se supera este valor, se debe evaluar una posible contaminación natural a partir de los controles negativos (sin inóculos).

Resultados Y Discusión

REVISIÓN DE LAS MATRICES

Se recopiló información sobre las materias primas y productos terminados sometidos a análisis de mohos y levaduras, lo que permitió construir una base de datos útil para la selección de matrices en el proceso de verificación.

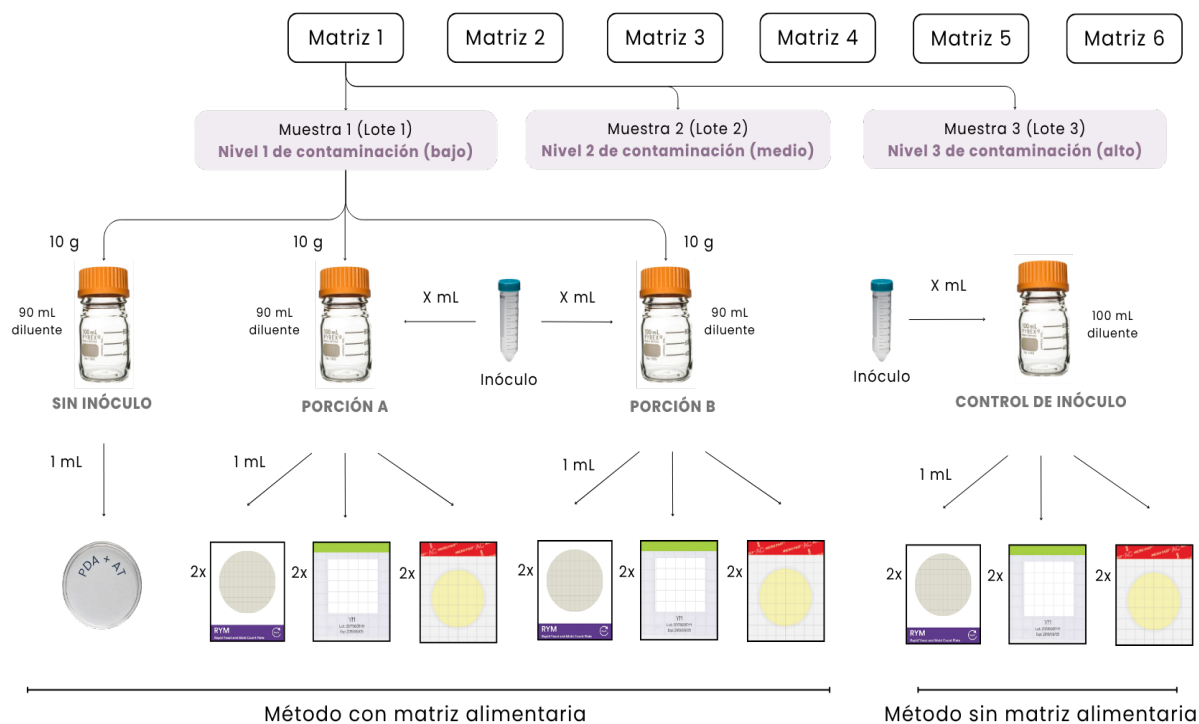


Figura 3. Esquema del protocolo de verificación de artículos alimentarios
(Fuente: Elaboración propia, basado en la norma ISO 16140-3, 2021)

Estandarización de Inóculos de Mohos y Levaduras

Se elaboraron varios cócteles de inóculos: tres para levaduras y dos para mohos, cuyas concentraciones, expresadas en UFC/mL, y volúmenes finales se encuentran en la Tabla III.

A diferencia de los primeros intentos, los finales permitieron obtener volúmenes de hasta 33 mL gracias al uso de más placas y a un mayor volumen de diluyente, sin afectar significativamente la concentración de los inóculos, lo que permitió contar con el volumen necesario para los análisis. Los inóculos utilizados en la verificación

Tabla III.
Título (UFC/mL) de los cócteles de inóculos de levaduras y mohos

Cóctel de inóculo	Levaduras			Mohos		
	Volumen final (mL)	Título (UFC/mL)	Título (log10 UFC/mL)	Volumen final (mL)	Título (UFC/mL)	Título (log10 UFC/mL)
Prueba 1	7	1,39E+08	8,143	6	6,60E+07	7,820
Prueba 2	24	1,43E+08	8,155	33	2,10E+07	7,322
Prueba 3	33	1,41E+08	8,149			

(prueba 3 para levaduras y 2 para mohos) mantuvieron estable su concentración durante los 5 meses del estudio, con variaciones menores a 0,5 log₁₀ UFC/mL, manteniéndose dentro del mismo orden de magnitud (Figuras 4 y 5) (ISO 16140-3, 2021).

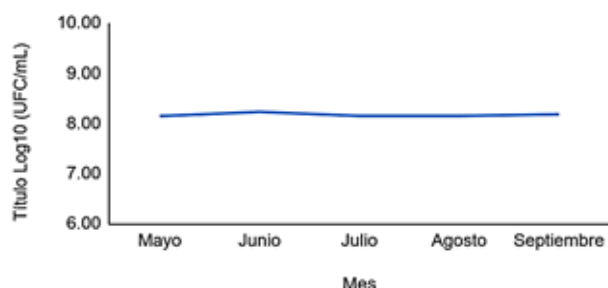


Figura 4. Estabilidad del Inóculo de Levadura (Prueba 3)3, 2021)

amplia aplicabilidad de los métodos. En la primera fase, se eligió el helado como única matriz por su fácil manejo y homogeneización, mientras que en la segunda fase se seleccionaron cinco matrices con características desafiantes, entre ellas harina, concentrado de naranja,

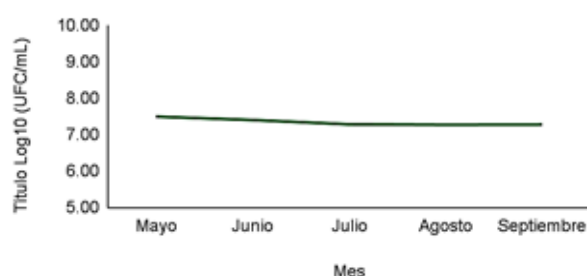


Figura 5. Estabilidad del Inóculo de Mohos (Prueba 2)

Evaluación del alcance de la validación de los métodos alternativos

La Tabla IV resume los datos extraídos de los informes de validación emitidos por organismos oficiales para los métodos alternativos. A partir de esta información, se comprobó que los métodos son aplicables a una amplia variedad de alimentos, ya que sus estudios de validación incluyeron al menos cinco de las quince categorías definidas en el Anexo A de la norma ISO 16140-3:2021.

Selección de las matrices

La Tabla V presenta las matrices seleccionadas en cada fase de la verificación de los métodos alternativos, de acuerdo con la norma ISO 16140-3:2021.

Se seleccionaron un total de seis matrices de distintas categorías de alimentos, incluidas algunas fuera del alcance de validación, considerando la

mayonesa, sirope y cacao. Estas últimas presentaron condiciones particulares, como baja actividad del agua (*aw*), pH ácido, alto contenido de grasa o de azúcar y la presencia de compuestos antimicrobianos.

Protocolo de verificación

Para Petrifilm RYM y MC-Media Pad YM, los resultados a las 48 h fueron aceptables para la verificación, pero la recuperación microbiana fue mucho menor que a las 72 h. Esto se debió a que las cepas de crecimiento lento solo alcanzaron un desarrollo completo a las 72 h, momento en el que la recuperación fue más adecuada e incluso se duplicó en algunos casos. Por ello, los resultados finales se reportaron únicamente a las 72 h.

Con base en los resultados anteriores, para el método Microfast YM se realizaron lecturas a las 60 h, a fin de evaluar si la recuperación microbiana obtenida era menor o similar a la alcanzada a las 72 h. De acuerdo con los resultados obtenidos,

Tabla IV.
Información de validación de los métodos alternativos

Métodos a evaluar	Casa comercial	Organización de certificación	Nro. de certificado	Alcance de validación	Amplitud de los alcances
Placas Petrifilm™ Rápida para Recuento de Levaduras y Mohos (RYM)	3M	AFNOR Certification	3M 01/13-07-14	1. Productos cárnicos y pesqueros 2. Productos lácteos 3. Productos derivados del huevo 4. Frutas, vegetales y cereales 5. Chocolate y productos de panadería 6. Alimentos para animales (piensos) 7. Muestras ambientales	Una amplia gama de alimentos
MC-Media Pad™ YM Levaduras y Mohos (YM)	Millipore	MICROVAL NEN	2015LR51	1. Productos lácteos 2. Confitería, panadería y huevos 3. Frutas y vegetales 4. Alimentos listos para el consumo 5. Alimentos multicomponentes	Una amplia gama de alimentos
Microfast® Yeast & Mold Count Plate	Meizheng	AOAC Performance Tested Method	122101	1. Productos lácteos 2. Frutas, vegetales y cereales 3. Frutas y productos frescos 4. Alimentos multicomponentes 5. Alimentos para mascotas y animales	Una amplia gama de alimentos

Fuente: Elaboración propia basada en ADRIA Développement (2022); Campden BRI y Q Laboratories (2021); Lei y col. (2021)

Tabla V.
Matrices seleccionadas en la verificación

Fase de la verificación	Nro.	Matriz	Característica desafiante	Categoría
Verificación de la implementación	1	Helado	No aplica	Leche y productos lácteos sometidos a tratamiento térmico
	2	Harina	Baja aw	Verduras y hortalizas, semillas, frutos secos, fruta y cereales secos
Verificación de las matrices	3	Conc. de Naranja	pH ácido	Frutas y productos frescos
	4	Mayonesa	Alto contenido de grasa + pH ácido	Alimentos de múltiples componentes o componentes de comida
	5	Sirope	Alto contenido de azúcar	Chocolate, productos de panadería y pastelería, confitería
	6	Cacao	Baja aw + antimicrobianos naturales	Chocolate, productos de panadería y pastelería, confitería

Fuente: Elaboración propia basada en la norma ISO 16140-3:2021

esto permitiría evaluar la posibilidad de reducir el tiempo de incubación de 72 a 60 h. Ambos tiempos mostraron resultados equivalentes y conformes.

Verificación de la implementación

Las desviaciones estándar intralaboratorio (SIR) obtenidas en la verificación, junto con el doble de las desviaciones estándar interlaboratorio de reproducibilidad (SR) reportadas en la validación, se presentan en la Tabla VI según el método alternativo y el microorganismo evaluado.

Ambos métodos alternativos cumplieron con el criterio de aceptabilidad establecido para la verificación de la implementación, ya que sus SIR fueron inferiores al doble de las SR reportadas en la validación, tanto para mohos como para levaduras.

Verificación de los artículos alimentarios

Las desviaciones estimadas (eBias) obtenidas para los tres niveles de contaminación (inóculo bajo, medio y alto) aplicados en cada tipo de matriz se presentan en las Tablas VII, VIII y IX.

Para todos los métodos, los resultados de las cinco matrices evaluadas muestran que, para cada nivel de contaminación, la diferencia entre los valores obtenidos en la matriz y en el inóculo fue menor que 0,5 log₁₀. Esto confirma que los métodos cumplen con el criterio de aceptación requerido en esta etapa de verificación.

Conclusiones

Se verificaron tres metodologías alternativas, Petrifilm RYM, MC-Media Pad YM y Microfast YM, para la cuantificación de mohos y levaduras en una empresa de alimentos, siguiendo las especificaciones de la norma ISO 16140-3:2021.

Se construyó una base de datos con las matrices en las que se realiza el recuento de mohos y levaduras en seis de las principales plantas de la empresa.

Se estandarizó un procedimiento para obtener cócteles de inóculos de mohos y levaduras en volúmenes suficientes y con concentraciones estables, que se mantuvieron sin variaciones significativas durante cinco meses.

Tabla VI.
Resultados de la verificación de la implementación

Método Alternativo	Levaduras			Mohos		
	SIR (verificación)	2 x SR (validación)	Criterio de aceptación	SIR (verificación)	2 x SR (validación)	Criterio de aceptación
Petrifilm RYM	0,0275	0,1920	Conforme	0,0720	0,1920	Conforme
MC-Media Pad YM	0,0688	0,3853	Conforme	0,0581	0,3853	Conforme

SIR: Desviación estándar intralaboratorio. SR: Desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio

Tabla VII.
Matrices seleccionadas en la verificación

Matriz Conflictiva	Levaduras (eBias)				Mohos (eBias)			
	Inóculo bajo	Inóculo medio	Inóculo alto	Resultado	Inóculo bajo	Inóculo medio	Inóculo alto	Resultado
Harina	0,47	0,46	0,06	Conforme	0,12	0,03	0,12	Conforme
Concentrado de Naranja	0,41	0,03	0,04	Conforme	0,12	0,11	0,16	Conforme
Mayonesa	0,37	0,15	0,03	Conforme	0,27	0,21	0,06	Conforme
Sirope	0,13	0,02	0,06	Conforme	0,17	0,11	0,12	Conforme
Cacao	0,33	0,00	0,04	Conforme	0,44	0,16	0,07	Conforme

eBias: Desviación estimada

Tabla VIII.
Resultados de verificación de artículos alimentarios (MC-Media Pad YM)

Matriz Conflictiva	Levaduras (eBias)				Mohos (eBias)			
	Inóculo bajo	Inóculo medio	Inóculo alto	Resultado	Inóculo bajo	Inóculo medio	Inóculo alto	Resultado
Harina	0,01	0,23	0,07	Conforme	0,07	0,04	0,12	Conforme
Concentrado de Naranja	0,30	0,13	0,07	Conforme	0,01	0,06	0,04	Conforme
Mayonesa	0,20	0,03	0,04	Conforme	0,04	0,04	0,11	Conforme
Sirope	0,14	0,02	0,06	Conforme	0,00	0,09	0,00	Conforme
Cacao	0,34	0,03	0,11	Conforme	0,06	0,05	0,02	Conforme

eBias: Desviación estimada

Tabla IX.
Resultados de verificación de artículos alimentarios (Microfast YM)

Matriz Conflictiva	Levaduras (eBias)				Mohos (eBias)			
	Inóculo bajo	Inóculo medio	Inóculo alto	Resultado	Inóculo bajo	Inóculo medio	Inóculo alto	Resultado
Harina	0,02	0,04	0,02	Conforme	0,19	0,25	0,04	Conforme
Concentrado de Naranja	0,05	0,00	0,08	Conforme	0,01	0,09	0,14	Conforme
Mayonesa	0,08	0,05	0,01	Conforme	0,03	0,14	0,06	Conforme
Sirope	0,05	0,01	0,07	Conforme	0,00	0,05	0,06	Conforme
Cacao	0,18	0,17	0,17	Conforme	0,00	0,06	0,12	Conforme

eBias: Desviación estimada

Se confirmó la aplicabilidad de los tres métodos en diversas matrices. Para la verificación, se eligieron seis matrices representativas de interés para la empresa: una de fácil manejo y cinco con características “desafiantes”. En Petrifilm RYM y MCMedia Pad YM, la selección se hizo siguiendo las dos fases de verificación; en Microfast YM, únicamente se aplicó la segunda fase, empleando las mismas matrices.

Los tres métodos mostraron una precisión adecuada (SIR conformes) y buena recuperación ($eBias < 0,5 \log_{10}$), incluso en matrices desafiantes, lo que confirma su correcto funcionamiento en las condiciones del laboratorio y su implementación en los análisis de rutina de la empresa.

Recomendaciones

Utilizar bolsas con filtro para retener partículas pigmentadas en matrices coloreadas, como el cacao, y así mejorar la visualización de colonias en MC-Media Pad YM sin necesidad de diluciones, especialmente en muestras con baja carga microbiana.

Optimizar el tiempo de incubación del método Petrifilm RYM y MCMedia Pad YM, realizando pruebas adicionales que evalúen la posibilidad de reducirlo de 72 a 60 horas, sin comprometer la recuperación microbiana.

Realizar un estudio financiero detallado e integral que considere no solo el costo directo de adquisición de las placas, sino también los ahorros indirectos asociados al método alternativo, como reducción de horas-hombre, liberación anticipada de lotes, disminución del uso y mantenimiento de autoclaves e incubadoras.

Referencias Bibliográficas

- ADRIA Développement. 2022. Validation study according to EN ISO 16140-2:2016—3MTM Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold count plate (No. 3M 01/13-07/14; NF VALIDATION). AFNOR Certification.
- Beuchat LR, Mann DA. 2016. Comparison of new and traditional culture-dependent media for enumerating foodborne yeasts and molds. *Journal of Food Protection* 79(1):95-111.
- Campden BRI, Q Laboratories. 2021. Method Comparison Study Report for the ISO 16140-2:2016 validation of MC-Media Pad YM (No. 2015 LR51; MicroVal Validation). MICROVAL.
- FDA. 2001. Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food and Drug Administration.
- Hussain MA, Dawson CO. 2013. Economic impact of food safety outbreaks on food businesses. *Foods* 2(4):585-589.
- ISO 16140-1:2016. Norma internacional ISO 16140-1. 2016. Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 1: Vocabulario. Suiza. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/62936.html>
- ISO 16140-3:2021. Norma internacional ISO 16140-3. 2021. Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un único laboratorio. Suiza. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:16140:-3:ed-1:v1:en>
- Lei L, Gone S, Benzinger MJ Jr, Thompson W, Bastin B. 2021. Validation of the MicroFast® Yeast and Mold Count Plate (YM) for Enumeration of Yeast and Mold in Selected Foods. AOAC Performance Tested Method Report 122101: 1-26.
- Marc RA. 2022. Implications of mycotoxins in food safety. En: *Mycotoxins and Food Safety—Recent Advances*. IntechOpen. Disponible en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.102495>
- Putri F, Surati S, Sitorus AAM, Nagur KS, Cahyaningsih E, Wilasti Y, Sihotang MAED. 2024. Performance characteristics of the quantitative method for *Staphylococcus aureus* in food products corresponds to ISO 16140-3:2021. *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety* 4(2): Article 2.
- Samayoa A, Hernández S. 2023. Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente. Universidad Galileo,

- Facultad de Ciencias de la Salud.
- SENCAMER. Norma Venezolana COVENIN 1337-1990: Alimentos. Métodos para recuento de mohos y levaduras. Disponible en: sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1337-1990.pdf
- SENCAMER. Norma Venezolana COVENIN 1126-2022. Toma, identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Disponible en: sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1126-2022.pdf
- Tournas V, Stack M, Mislivec P, Koch H, Bandler R. 2001. Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 18: Yeasts, molds, and mycotoxins. 8.^a ed. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Silver Spring, MD.
- Zagovalov MTK, Leyva Castillo V, Ramón Corría M, Puig Peña Y, Ferrer Márquez Y. 2023. Procedimiento para la verificación de métodos microbiológicos cualitativos de referencia de la cadena alimentaria. Revista CENIC Ciencias Biológicas 54:248-259.