

ANÁLISIS DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE UHT MEDIA VIDA
20 DIAS, PLANTA DE LÁCTEOS LA ESMERALDA, MADRID,
CUNDINAMARCA

ALBERTH SAID CANO TORRES

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

2017

ANÁLISIS DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE UHT MEDIA VIDA
20 DIAS, PLANTA DE LÁCTEOS LA ESMERALDA, MADRID,
CUNDINAMARCA

ALBERTH SAID CANO TORRES

CODIGO: 1090436629

Trabajo de grado presentando como requisito para optar al título de
Microbiólogo

TUTOR ACADEMICO

William Hernando Suarez Quintana

MSc. Microbiólogo de Alimentos

TUTORA DE PASANTIA

Ruth Montañez M

MSc. Microbióloga de Alimentos

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

2017

APROBADO POR:

Firma 1º Jurado

Firma 2º Jurado

NOTA DE ACEPTACION

Pamplona, 2017

CONTENIDO

	Pág.
1. OBJETIVOS	13
1.1 objetivo general	13
1.2 objetivos específicos	13
2. JUSTIFICACION	14
3. MARCO REFERENCIAL	15
3.1 marco legal	15
3.2 antecedentes nacionales	15
3.3 antecedentes internacionales	16
3.4 marco teórico	17
3.4.1 leche UHT	17
3.4.2 principales bacterias esporuladas en leche UHT	17
3.4.3 generalidades de las bacterias esporuladas	18
3.4.4 esporulación	18
3.4.5 germinación	19
3.4.6 características de resistencia	20
4. METODOLOGÍA	23
4.1 búsqueda de focos de contaminación	23
4.2 seguimiento de la línea de producción	23
4.3 acciones correctivas	24

5. RESULTADOS Y ANALISIS	
5.1 búsqueda de focos de contaminación	25
5.2 seguimiento de la línea de producción	25
5.3 características macroscópicas	30
5.4 acciones correctivas	31
5.4.1 modificación de proceso	31
5.4.2 lavado con ácido fosfórico 1.5%	31
6. CONCLUSIONES	33
7. SUGERENCIAS	34
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXOS	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. La esporulación y el ciclo de germinación en <i>Bacillus subtilis</i> .	20

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características microbiológicas de la leche ultrapasteurizada	15
Tabla 2. Resultados presencia de bacterias esporuladas en línea de producción leche UHT media vida 20 días	25
Tabla 3. Resultados de aerobios mesófilo.	26
Tabla 4. Resultados de coliformes totales	26
Tabla 5. Resultados de esporas aerobias	27
Tabla 6. Resultados de esporas anaerobias	27

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1. Proceso de elaboración leche UHT	21
Grafica 2. Aerobios mesófilos	28
Grafica 3. Coliformes totales	29
Grafica 4. Esporas aerobias	29
Grafica 5. Esporas anaerobias	30
Grafica 6. Esterilidad comercial (porcentaje de mejora)	31
Grafica 7. Esterilidad comercial (disminución de la carga microbiana)	32

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Fórmula para hallar el valor Z	36
Anexo 2. Cronograma de actividades	36

GLOSARIO

ORDEN: es un volumen establecido de leche a la cual se le ha verificado las características fisicoquímicas establecidas en el decreto 616 de 2006, pasteurizada y refrigerada.

PRODUCTO TERMINADO: es la leche UHT empacada y lista para ser comercializada.

ROTURA: cualquier producto terminado que presente alteración en el empaque.

TANQUE PULMON: es un tanque intermedio que permite almacenar parte de la leche pasteurizada para luego pasar al equipo UHT.

INTRODUCCION

Lácteos la Esmeralda SAS es una empresa dedicada a la producción de leche entera, media vida y bebida láctea UHT, con una producción de más de 90.000 litros diarios, se comercializa en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Bolívar. Según cifras de Asoleche Colombia se ubica en el cuarto país con mayor producción de leche en América Latina con una producción de 3.218 millones de litros en 2016.

Las plantas de producción de leche UHT a nivel nacional e internacional son susceptibles a presentar contaminación por microorganismos esporulados termorresistentes, algunos de los cuales representan un riesgo para la salud del consumidor, ya sea porque producen toxinas termoestables como las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* spp o por que al estar presentes en el producto puede causar una infección al ser ingerido dicho producto, a esto se le llama enfermedad transmitida por alimentos (ETA), otros esporulados representan un riesgo a la vida útil del producto, causando acidificación, lipólisis y proteólisis.

Estos aspectos hacen de gran importancia este estudio, ya que la leche es uno de los alimentos más completos nutricionalmente y es consumido por la población en general.

A nivel nacional se encuentra un estudio relevante y es el trabajo de Bernier Ivonne et al (2012) donde obtuvieron presencia de esporulados aerobios y anaerobios en leche UHT realizando identificación clásica y molecular.

A nivel internacional se encuentran varios estudios (Lotfi Ghellai et al), (Pinto Claudia et al), (Centola Ana et al) en los cuales se evalúa la presencia de bacterias esporuladas en el procesamiento de leche UHT y el producto final, demostrando que existen altos riesgos al encontrarse bacterias del género *Bacillus* spp capaces de sobrevivir a dicho proceso y presentar un riesgo al consumidor.

Este trabajo tiene como objetivo analizar la calidad microbiológica de la leche UHT media vida 20 días procesada en la planta de Lácteos la Esmeralda y así lograr un producto terminado que cumpla con los requerimientos del decreto 616 de 2006.

El alcance de este trabajo se limita a la leche UHT media vida 20 días procesada por Lácteos la Esmeralda.

Para este trabajo se realizó un muestreo de la línea de producción de leche UHT media vida 20 días, seguidamente se evaluó como

afectan estos focos de contaminación en la carga microbiana del producto y se llevaron a cabo acciones correctivas y el impacto de dichas acciones.

Este trabajo es de gran aplicación en el área de la microbiología, ya que la contaminación por bacterias esporuladas es un tema preocupante en las empresas de alimentos, como lo muestra el estudio de Bernier Ivonne et al, donde se identificaron bacterias esporuladas en distintas muestras de leche UHT comercializada en el país , no se han realizado los suficientes estudios que haga tomar conciencia de esta problemática a nivel nacional, aun incumpliendo con los requisitos establecidos en el decreto 616 de 2006, el cual exige ausencia de cualquier crecimiento bacteriano en leche UHT en la prueba de esterilidad comercial, aun después de más de 10 años de estar vigente dicho decreto las autoridades siguen siendo indulgentes con esta problemática.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Análisis de la calidad microbiológica de leche UHT media vida 20 días en la planta de lácteos la Esmeralda S.A.S.

1.2 Objetivos específicos

Identificar el proceso de elaboración de la leche UHT en la planta de lácteos la Esmeralda y establecer los puntos de muestreo en línea de producción de leche UHT media vida 20 días.

Registrar los análisis microbiológicos a realizar basándose en el decreto 616 de 2006 para demostrar como afecta cada etapa en la carga microbiana de la leche.

Establecer medidas de prevención y corrección para el control de bacterias esporuladas.

2. JUSTIFICACION

Lácteos la Esmeralda SAS, es una empresa dedicada únicamente a la producción de leche UHT, comercializada en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Bolívar, la cual tiene la preocupación de presentar recuento de bacterias esporuladas en la prueba de esterilidad comercial y como establece el decreto 616 de 2006 debería ser negativo para cualquier crecimiento microbiano.

La leche al ser un alimento tan nutritivo es consumido por la población en general de todas las edades, al presentarse bacterias esporuladas en la leche UHT puede presentar un riesgo, siendo bacterias del genero *Bacillus* spp las que más han sido identificadas en dicho producto, dichas bacterias representan un problema generando acidificación, lipolisis y proteólisis, este género ha sido asociado a ETA'S por el consumo de leche UHT ya que son capaces de producir enterotoxinas y causar infecciones oportunistas.

Al ver estudios realizados a nivel nacional e internacional donde el género *Bacillus* spp es el más frecuente en la leche UHT y al verse la población en general susceptible a estos riesgos de ETA'S, las personas en las cuales se pueden presentar signos severos son niños, personas de la tercera edad y personas inmunosuprimidas.

Lo cual hace necesario este estudio de análisis de la calidad microbiología de leche UHT media vida 20 días en el proceso de elaboración, de esta manera obtener un producto sin presencia bacterias esporuladas que no represente un riesgo para la salud del consumidor.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 MARCO LEGAL

El decreto 616 de 2006 tiene por objeto establecer el reglamento técnico a través del cual se señalan los requisitos que debe cumplir la leche de animales bovinos, bufalinos y caprinos destinada para el consumo humano, con el fin de proteger la vida, la salud y la seguridad humana y prevenir las prácticas que puedan inducir a error, confusión o engaño a los consumidores.¹⁴

El decreto 616 de 2006 en el artículo 19 establece los requisitos fisicoquímicos y límites microbiológicos que debe cumplir la leche UHT, en este decreto se establece que después de su elaboración se debe incubar por 10 días a 35° y 55°c para realizar la prueba de esterilidad comercial donde no se debe presentar crecimiento de bacterias.¹⁴

Tabla 1. Características microbiológicas de la leche ultrapasteurizada (decreto 616 de 2006)

índices permisibles	n	m	M	c
Rto. Microorganismos mesófilos ufc / ml	3	1.000	10.000	1
Rto. Coliformes ufc / ml	3	Menor de 1	-	0
Rto. Coliformes fecales ufc / ml	3	Menor de 1	-	0
Rto. Esporas anaerobias ufc / ml	3	Menor de 1	-	0
Rto. Esporas aeróbicas ufc / ml	3	Menor de 1	-	0

Fuente : Ministerio de la protección social, decreto 616 de 2006

3.2 ANTECEDENTES NACIONALES

El trabajo de Bernier Ivonne et al (2012) realizó la prueba de esterilidad comercial de leches UHT producidas en Colombia, siguiendo la Norma NTC 4433, obtuvieron crecimientos atípicos de este microorganismo (*Bacillus sporothermodurans*) en ausencia de oxígeno, evidenciando que este bacilo no sólo puede crecer como aerobio estricto sino también como anaerobio facultativo, realizando identificación fenotípica (características macro y microscópicas como también pruebas bioquímicas) y genotípica (PCR tradicional con base a la identificación del gen 16S ribosomal y posterior secuenciación), Estos análisis confirmaron la presencia de *Bacillus*

sporothermodurans anaeróbicos facultativos en las muestras de leche UHT analizadas.²

3.3 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

El estudio realizado por Lotfi Ghellai y Boumediene Moussaboudjema (2013) en Argelia, determinaron la presencia de bacterias formadoras de esporas en diferentes segmentos de líneas de producción de leche ultra alta temperatura (UHT) de una planta comercial y su transferencia al producto final. Las muestras se recolectaron de diferentes segmentos de líneas de producción desde la recepción hasta las secciones de envasado, durante un período de 75 días a razón de un muestreo por semana, de plantas en el noroeste de Argelia. Los resultados obtenidos por identificación bioquímica (Bacillus API 20E), interpretados por software de cálculo para identificación microbiana reflejaron la presencia de *Bacillus sphaericus*. Las otras especies encontradas fueron: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus stearothermophilus*. El estudio reveló que la proporción de bacterias aeróbicas formadoras de esporas en el producto final depende de la temperatura y los períodos de almacenamiento.¹²

El estudio realizado por Pinto Claudia et al (2017) en Brasil, determinaron conteos de microorganismos mesófilos aerobios y bacterias aeróbicas mesófilas formadoras de esporas en 91 muestras comerciales brasileñas de leche ultra alta temperatura (UHT), identificando y caracterizando 46 bacterias formadoras de esporas en términos de su potencial de deterioro. De las 20 marcas evaluadas, el 45% tenía conteos de microorganismos aerobios mesófilos superiores a $1,0 \times 10^2$ ufc/mL. Las bacterias esporuladas fueron identificadas como *Bacillus subtilis* / *amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus megaterium*, mostrando actividad proteolítica y lipolítica, los hallazgos indican que existe un riesgo potencial de que las muestras de leche UHT se deterioren durante su vida útil comercial.¹⁶

El estudio realizado por Centola Ana et al (2016), realizaron una investigación que se centró en el aislamiento de *Bacillus cereus* para evaluar la capacidad de producción enterotoxinas durante la producción de leche UHT y su vida útil, realizaron aislamientos para verificar si se presentaba *Bacillus cereus* en las diferentes fases del proceso UHT y para verificar su presencia utilizaron la técnica RAPD-PCR. Para ello, se recogieron seis grupos de muestras de leche compuestas de leche cruda, pasteurizada y UHT de una planta de procesamiento. Los resultados revelaron que las bacterias pertenecientes al grupo *Bacillus cereus* fueron aisladas del 51,6%, 81,6% y del 13,8% de las muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT, respectivamente. Aproximadamente 50,0% de aislamientos de leche cruda, 19,2% de

aislamientos de leche pasteurizada y 70,7% de aislamientos de leche UHT, estos fueron capaces de producir enterotoxinas. Se confirmó la similitud genética entre los aislados de *Bacillus cereus* de leche cruda, pasteurizada y UHT, demostrando que el microorganismo es capaz de soportar el tratamiento UHT.⁴

3.4 MARCO TEORICO

3.4.1 LECHE UHT

El decreto 616 de 2006 define la leche UHT como un producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche cruda o termizada a una temperatura entre 135 °C a 150 °C y tiempos entre 2 y 4 segundos, de tal forma que se compruebe la destrucción eficaz de las esporas bacterianas resistentes al calor, seguido inmediatamente de enfriamiento a temperatura ambiente y envasado aséptico en recipientes estériles con barreras a la luz y al oxígeno, cerrados herméticamente, para su posterior almacenamiento, con el fin de que se asegure la esterilidad comercial sin alterar de manera esencial su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual puede ser comercializada a temperatura ambiente.¹⁴

Los procesos UHT inactivan células vegetativas y esporas bacterianas patógenas, sin embargo el género *Bacillus* spp es capaz de formar endosporas altamente resistentes a los métodos físicos y químicos utilizados en la industria de alimentos, causando pérdidas económicas significativas, estos microorganismos crecen fermentando la lactosa generando ácido, también pueden degradar la grasa y proteína presente en la leche generando un deterioro.¹⁶

3.4.2 PRINCIPALES BACTERIAS ESPORULADAS EN LECHE UHT

Las bacterias de la especie de *Bacillus* spp, son aeróbicas, Gram positivas y formadoras de esporas, están muy dispersas en la naturaleza, como suelos y pastizales. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y el *Geobacillus stearothermophilus* son bacterias esporuladas que han sido aisladas de entornos de procesamiento lácteo, estas bacterias son la causa de la esterilidad reducida en la leche procesada (UHT), asociada con mal control durante el tratamiento térmico, problemas en el envasado y mala calidad microbiológica de la leche cruda. Por lo tanto, el seguimiento de los procedimientos higiénicos, el tiempo / temperatura utilizado en el proceso y la implementación de normas microbiológicas para la leche cruda destinada al procesamiento UHT es de fundamental importancia.^{3, 6, 9, 21}

Esporas de *Bacillus* spp aparecen regularmente en un ambiente estable y por lo general representan una contaminación de la leche durante el proceso de ordeño. Estas esporas aeróbicas son comunes en la leche cruda y están vinculados al deterioro en los productos UHT. ¹³

3.4.3 GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS ESPORULADAS

Algunas bacterias responden a la limitación de nutrientes mediante la formación de una endospora, un tipo de célula morfológicamente diferente, este proceso se denomina esporulación y ha sido objeto de investigación microbiológica desde finales del siglo 19 por Robert Koch y Ferdinand Cohn. La endospora es una célula metabólicamente inactiva, resistente al medio ambiente desfavorable, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas, la desecación y la radiación ionizante, una serie de factores son responsables de esta resistencia, incluyendo la deshidratación del núcleo y la compactación del ADN cromosómico. ¹⁰

3.4.4 ESPORULACION

El proceso de esporulación se divide en siete etapas y es básicamente idéntico entre los géneros *Bacillus* spp y *Clostridium* spp. Un crecimiento celular normal se puede definir como etapa cero con respecto a la esporulación, y es seguida por las etapas I y II, donde la célula inicia la división celular asimétrica y por tanto la formación de dos compartimentos separados, el más pequeño es denominado la pre-espora. La etapa II corresponde a la presentación del ADN de la célula como un filamento axial. Durante el estadio III, la pre-espora es endocitada por la célula madre para formar una célula distinta rodeada por las membranas interior y exterior. En la etapa IV donde se lleva a cabo la síntesis de la corteza, compuesta por peptidoglicano, entre las membranas interior y exterior de la pre-espora, y es seguida de la etapa V durante la cual se lleva a cabo la formación de la capa de la espora. Durante las etapas IV a VI, la célula madre también sintetiza una molécula específica de la espora que es muy abundante, ácido piridina-2,6–dicarboxílico [ácido dipicolínico (dpa)]. Esta se acumula en la pre-espora y está acompañada por una reducción de su contenido de agua. La maduración de la espora se lleva a cabo durante esta etapa, y se caracteriza porque el material de la capa se vuelve más denso. En la etapa VII se realiza la lisis de la célula madre y la liberación de la estructura de la espora madura. La estructura de la espora madura protege a los microorganismos de las condiciones desfavorables externas hasta que se vuelven favorables para el crecimiento celular. La espora latente es entonces reactivada y se somete a la germinación y el crecimiento vegetativo. ^{8, 11}

3.4.5 GERMINACION

Las esporas de las especies de *Bacillus* spp pueden permanecer latentes por mucho tiempo y son extremadamente resistentes a una gran variedad de condiciones ambientales. La germinación de las esporas se ha relacionado con la presencia de moléculas específicas en el ambiente denominadas germinantes. Los germinantes específicos que desencadenan la germinación de esporas varían entre las especies y son a menudo nutrientes necesarios para el crecimiento y la división celular. De tal forma que en condiciones apropiadas, cuando existe la unión de nutrientes específicos a los receptores de las esporas, las esporas pueden iniciar de nuevo un crecimiento activo a través de un proceso llamado germinación, seguido del crecimiento vegetativo.^{13, 7}

El paso de la espora a célula vegetativa implica tres etapas distintas: la activación, la germinación y el crecimiento. La activación puede ser provocada por condiciones de calor, el pH o la exposición a sustancias químicas que hace que la espora entre en la etapa de germinación, por lo tanto sale de su estado de latencia. La activación es un proceso reversible que no compromete a la espora en seguir con la germinación y el crecimiento, de tal forma que las esporas activadas conservan la mayoría de las propiedades que poseen las latentes. En contraste, una vez que las esporas inician la germinación, la espora ya no puede volver a su estado inactivo. La germinación puede iniciarse en respuesta a múltiples estímulos, que varían dependiendo de la especie. Estos incluyen, pero no están limitados a nutrientes metabolizables, tales como aminoácidos y azúcares específicos, algunas especies iónicas, tensoactivos catiónicos y quelatos (en particular Ca^{+2} y dpa) y algunos tratamientos físicos tales como altas presiones.^{11, 7}

El crecimiento se define como todos los eventos de desarrollo que tienen lugar después de la germinación, incluyendo el inicio del metabolismo y síntesis macromolecular (hinchazón de la espora), la emergencia (donde se desprenden las capas exteriores de las esporas) y el crecimiento de la nueva célula. Todo esto representa un retorno de la espora al crecimiento de una célula vegetativa.⁷

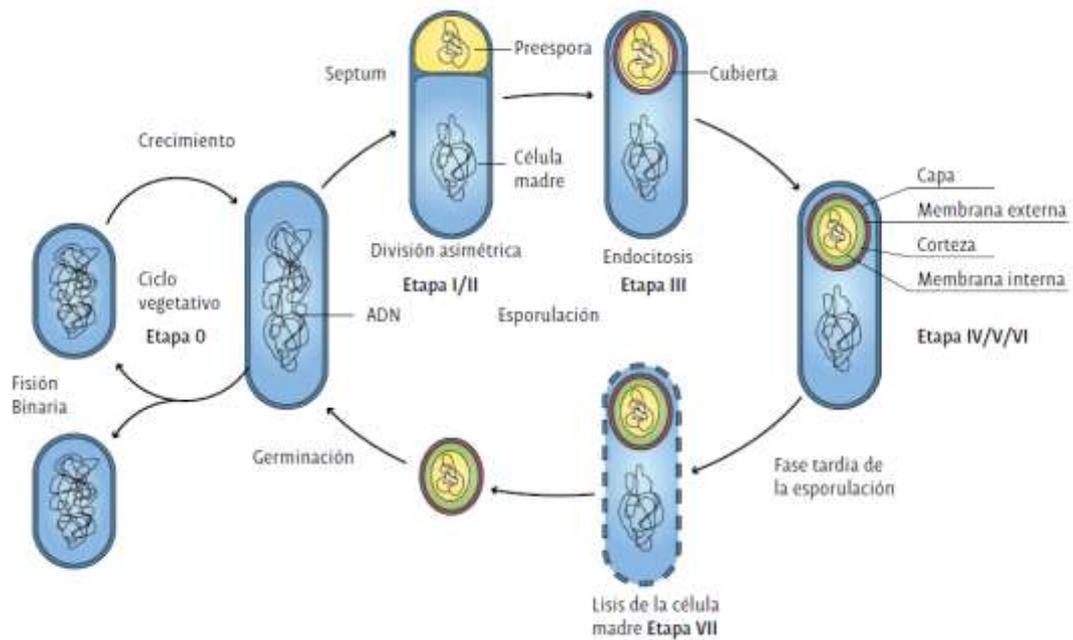


Fig 1. La esporulación y el ciclo de germinación en *Bacillus subtilis*. (Huesca L, 2014)

3.4.6 CARACTERÍSTICAS DE RESISTENCIA

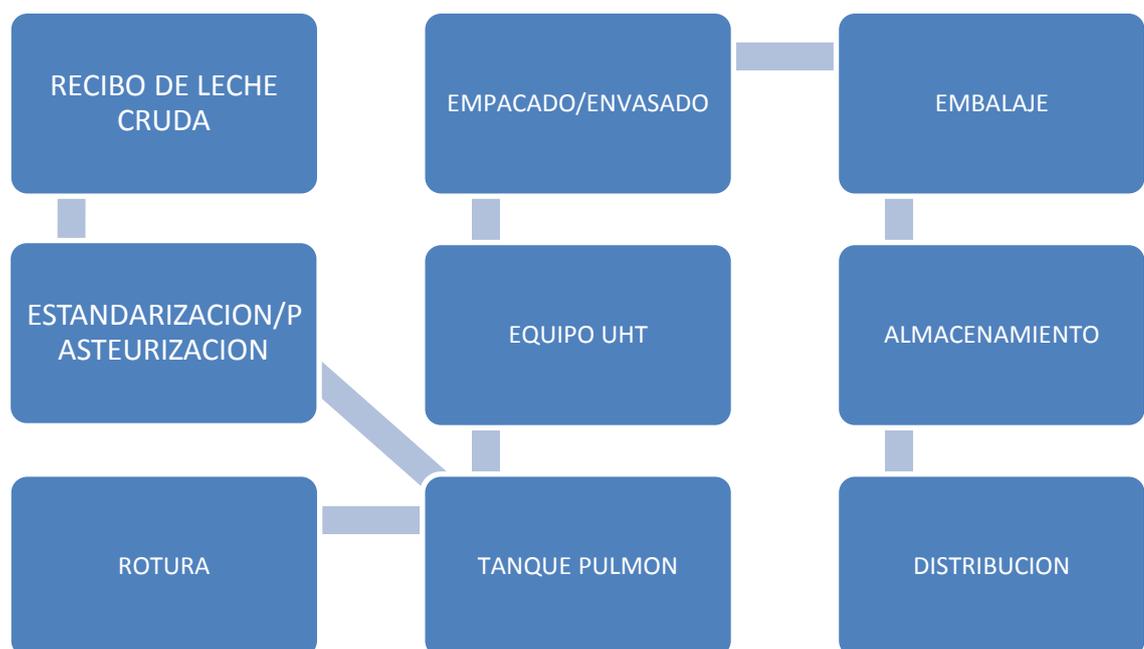
Las endosporas bacterianas sobreviven en condiciones extremas como el calor y la desecación debido al estado deshidratado del núcleo de la espora lo cual es debido en gran parte a la corteza. Esta estructura se compone de una forma de peptidoglicano que es similar, aunque no idéntico, al peptidoglicano de las células vegetativas, además cuenta con la presencia de residuos de ácido δ -lactámico murámico, resultantes en menos cadenas laterales de péptido y una reducción en el entrecruzamiento de las cadenas de glicanos. La espora posee dos membranas distintas, separadas por la pared de la célula germinal y una capa muy fina de peptidoglicano que rodea la pre-espora. El ensamblaje del peptidoglicano de la espora se produce entonces en el espacio entre las dos membranas, esto como resultado de la acción de los genes expresados en el compartimento de la célula madre, incluida una codificación para la forma, el alargamiento, la división y la esporulación.^{8, 20, 9}

Se ha reportado que las esporas inactivas de diversas especies de *Bacillus* spp contienen una gran cantidad (10-20% del total de las proteínas de la espora) de proteínas pequeñas solubles en ácido, llamadas sasp por sus siglas en inglés, en su núcleo. Estas sasp son de tres tipos α , β y γ . Estas proteínas se asocian con el ADN de las esporas, protegiéndolo de diversos tipos de daños. Diversos estudios han demostrado que las sasp de los tipos α y β son factores importantes en la resistencia de las esporas ante varios agentes, incluyendo la radiación uv, formaldehído, ácido nitroso y el calor seco, además, contribuyen

significativamente a la resistencia de las esporas al calor húmedo y al peróxido de hidrógeno, así como la osmorresistencia. Además, todas las sasp juegan un papel en el inicio del crecimiento de las esporas por que proporcionan aminoácidos por su degradación temprana durante la germinación y la espora utiliza estos aminoácidos en el desarrollo de la célula para el metabolismo y la síntesis de proteínas. Los factores importantes que confieren la resistencia química de la espora varían de acuerdo con el producto químico, pero en general incluyen: (i) las proteínas de la cubierta de la espora que probablemente reaccionan con los agentes químicos, (ii) la relativa impermeabilidad de la membrana interna de la espora que restringe el acceso de productos químicos exógenos al núcleo, (iii) la protección de ADN de la espora por su saturación con proteínas del tipo sasp y (iv) la activación de mecanismos de reparación del ADN ante los agentes que matan a la espora produciendo daños al ADN.^{20, 6, 9}

La termización o pasteurización elimina un gran parte de los microorganismos mesófilos y coliformes presentes en la leche cruda, las esporas latentes no pueden ser destruidas en esta etapa por no presentar una temperatura adecuada, al contrario estas esporas que están adaptadas a condiciones de estrés sub-letales en operaciones lecheras comerciales no necesariamente germinan por estar en un ambiente adecuado si no que necesitan una activación por calor para estimular su germinación.¹⁷

Grafica 1. Proceso de elaboración leche UHT (Planta de lácteos la Esmeralda S.A.S)



Fuente: Cano A, 2017.

Recibo de leche cruda: el carrotanque es ingresado al área de recibo, se toma muestra de la leche para realizar análisis fisicoquímico para su aceptación o rechazo, en caso de ser aceptado es descargado por medio de una manguera y enviado al silo de leche cruda en donde se mezclara con la leche ya almacenada.

Estandarización y pasteurización: la leche cruda es enviada a otro silo que se encuentre vacío, previamente lavado y desinfectado, se analiza las características fisicoquímicas y se modifican las que se encuentren fuera de parámetro, se adiciona tripolifosfato de sodio como estabilizante y se pasteuriza.

Rotura: cualquier producto terminado que presente alteración en el empaque es enviado en cestillos a esta área en espera de ser sacado de su empaque siendo vertido en un tanque para luego ser enviado por tubería al tanque pulmón.

Tanque pulmón: es un tanque intermedio que permite almacenar parte de la leche pasteurizada y mezclarla con la rotura para luego pasar al equipo UHT.

Equipo UHT: existen 2 equipos en esta planta, uno con una capacidad de procesamiento de 5000 litros por hora y el otro de 12000, esto varía dependiendo de la cantidad de cabezales que se encuentren envasando el producto.

Empacado o envasado: se realiza en el área también denominado maquinas, esta área se encuentra aséptica por la presencia de peróxido en el aire, el empaque de polietileno es puesto en las máquinas y estas realizan el envasado y sellado el producto.

Embalaje: el producto terminado sale del área de envasado por medio de bandas de plástica que giran constantemente, los operarios ordenan el producto en cestillos plásticos para luego ser transportados al área de almacenamiento.

Almacenamiento: es el área más grande de la empresa, donde el producto queda en espera a ser distribuido.

Distribución: se realiza una última revisión al producto final antes de ser cargado en vehículo del cliente y este realiza la distribución.

4. METODOLOGÍA

4.1 BÚSQUEDA DE FOCOS DE CONTAMINACIÓN

La búsqueda se realizó en las áreas que se encuentran estrictamente relacionadas con el procesamiento de la leche UHT media vida 20 días (recibo, pasteurización, área de rotura, equipos UHT, máquinas de empaqueo o envasado, embalaje). Se realizó una búsqueda en los focos de contaminación por bacterias esporuladas siguiendo la siguiente metodología sugerida por la empresa realizando frotis tres veces por semana en diferentes puntos de estas áreas:

- Se usaron hisopos estériles y tubos con 2mL de agua peptona estéril para realizar el frotis.
- Asépticamente en la cabina de siembra se agregaron 8mL de agar TSC y se cubrió con vaselina para generar un ambiente anaerobio en el tubo.
- Se incubó a 37°C por tres días y se observó la producción de gas y ennegrecimiento del tubo como resultado positivo.

4.2 SEGUIMIENTO DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN

Se realizó un seguimiento de la línea de producción (silo de orden, tanque de rotura, tanque pulmón, producto terminado) y así verificar la carga microbiana que se le agrega a la leche.

- Utilizando frascos de vidrio estériles se tomaron muestras dos veces por semana en el silo, tanque pulmón y tanque de rotura, en los dos primeros se flameó la boquilla y se dejó correr la leche para asegurar una toma de muestra aséptica, en el tanque de rotura se sumergió el frasco para tomar la muestra, para el producto terminado se tomó una bolsa de producción en el momento en que se realizó la toma de muestra.
- En el tratamiento de las muestras se realizaron diluciones seriadas para las tres primeras etapas hasta 10^{-2} .
- Se realizó la siembra en cajas y tubos estériles, los tubos con 2mL de muestra se llevaron a un calentamiento de 80°C por 10 minutos y se realizó choque térmico.
- Se sembró aerobios mesófilos y esporas aerobias en profundidad con agar SPC modificado con TTC (cloruro de trifeníl tetrazolio) y se incubó a 37°C por 2 días.

- Se sembró coliformes totales en profundidad con agar VRB y se incubó a 35°C por 1 día.
- A los tubos para esporas anaerobias se les agrego agar TSC y se cubrió con vaselina para generar un ambiente anaerobio y se incubó a 37°C por 3 días, los resultados son expresados como negativo (0.9) y positivo (100) son valores dados a manera personal, esto con el fin de poder observar gráficamente la diferencia en los resultados.
- Tras pasar 10 días de la fecha de análisis en los cuales se guardaron dos bolsas de leche para esterilidad comercial, una a 35°C y la otra a 55°C, se le realizó recuento para aerobios mesófilos, esporas aerobias y esporas anaerobias como se describió anteriormente.

4.3 ACCIONES CORRECTIVAS

Se realizaron dos acciones correctivas:

- La eliminación de la etapa llamada rotura, ya no se envía la leche directamente al tanque pulmón, ahora es reprocesada, siendo enviada al área de pasteurización para ser estandarizada y pasteurizada como una nueva orden.
- El lavado con ácido fosfórico al 1.5% se llevó a cabo en cada tubería de las etapas del proceso de elaboración de la leche UHT, con un cronograma semanal.

5. RESULTADOS Y ANALISIS

5.1 BUSQUEDA DE FOCOS DE CONTAMINACION

Se encontraron dos principales focos de contaminación que presentaban un riesgo para el proceso de elaboración de leche UHT en la planta y estos fueron el área de rotura y los cestillos de embalaje, en los cuales se evidencio un presencia constante de bacterias esporuladas sulfito reductoras y no sulfito reductoras.

Tabla 2. Resultados presencia de bacterias esporuladas en línea de producción leche UHT media vida 20 días

PRESENCIA DE BACTERIAS ESPORULADAS						
FECHA	RECIBO	PASTEURIZACION	ROTURA	EQUIPOS UHT	MAQUINAS	EMBALAJE
28/03/2017	+	-	+	-	-	-
30/03/2017	-	-	+	-	-	+
04/04/2017	-	-	-	-	-	+
06/04/2017	+	-	+	-	-	+
11/04/2017	-	-	+	-	-	+
13/04/2017	-	-	+	-	-	+
20/04/2017	-	-	+	-	-	+
25/04/2017	+	-	-	-	-	-
27/04/2017	-	-	+	-	-	+
02/05/2017	-	-	+	-	-	+
04/05/2017	-	-	+	-	-	+
09/05/2017	-	-	-	-	-	+
11/05/2017	+	-	-	-	-	+
16/05/2017	-	-	+	-	-	-
18/05/2017	-	-	+	-	-	+

Fuente: Cano A, 2017.

5.2 SEGUIMIENTO DE LA LINEA DE PRODUCCION

Los resultados presentados en los siguientes cuadros son los recuentos obtenidos de los 15 muestreos realizados, donde se encuentra el signo (-) hace referencia a que no se tomó la muestra de esa etapa en ese día, 0.9 es el valor dado a un resultado negativo y 100 el valor dado a un resultado positivo en tubos. Para apreciar el antes y después de tomar acciones correctivas se debe señalar que la primera se llevó a cabo el 28/04/17 y la segunda el 13/05/17.

Tabla 3. Resultados de aerobios mesófilos

AEROBIOS MESOFILOS UFC x mL				
FECHA	ORDEN	ROTURA	PULMON	PRODUCTO TERMINADO
28/03/2017	2,30E+03	6,00E+03	6,00E+03	0,9
30/03/2017	1,00E+01	8,70E+04	4,60E+04	0,9
04/04/2017	7,00E+01	8,00E+04	3,40E+04	0,9
06/04/2017	6,00E+02	1,60E+03	8,40E+04	0,9
11/04/2017	3,80E+03	4,10E+04	2,70E+04	0,9
13/04/2017	4,70E+03	1,60E+03	6,80E+04	0,9
20/04/2017	-	11	1,60E+03	0,9
25/04/2017	8,80E+02	-	6,70E+03	0,9
27/04/2017	2,80E+03	6,80E+04	1,00E+05	1,00E+00
ELIMINACION DE LA ETAPA DE ROTURA				
02/05/2017	1,60E+04	-	6,40E+04	0,9
04/05/2017	1,20E+03	-	5,10E+04	0,9
09/05/2017	3,40E+02	-	6,50E+03	0,9
11/05/2017	1,60E+04	5,60E+04	9,30E+04	4,00E+02
LAVADO CON ACIDO FOSFORICO AL 1.5%				
16/05/2017	-	1,60E+04	1,60E+04	0,9
18/05/2017	4,60E+03	3,30E+03	7,10E+04	0,9

Fuente: Cano A, 2017.

Tabla 4. Resultados de coliformes totales

COLIFORMES UFC x mL				
FECHA	ORDEN	ROTURA	PULMON	PRODUCTO TERMINADO
28/03/2017	4,10E+02	5,40E+03	6,00E+03	0,9
30/03/2017	0,9	5,10E+04	3,20E+02	0,9
04/04/2017	3,40E+02	4,60E+04	4,80E+04	0,9
06/04/2017	7,00E+01	1,60E+05	6,90E+04	0,9
11/04/2017	0,9	0,9	0,9	0,9
13/04/2017	0,9	6,20E+01	0,9	0,9
20/04/2017	-	0,9	7,60E+01	0,9
25/04/2017	2,00E+01	-	0,9	0,9
27/04/2017	9,00E-01	0,9	0,9	0,9
ELIMINACION DE LA ETAPA DE ROTURA				
02/05/2017	7,00E+02	-	9,00E+02	0,9
04/05/2017	0,9	-	0,9	0,9
09/05/2017	0,9	-	0,9	0,9
11/05/2017	1,30E+03	4,60E+04	3,90E+03	0,9
LAVADO CON ACIDO FOSFORICO AL 1.5%				
16/05/2017	-	4,00E+03	1,60E+04	0,9
18/05/2017	3,00E+01	7,00E+02	4,50E+03	0,9

Fuente: Cano A, 2017.

Tabla 5. Resultados de esporas aerobias

ESPORAS AEROBIAS UFC x mL				
FECHA	ORDEN	ROTURA	PULMON	PRODUCTO TERMINADO
28/03/2017	6	0,9	11	0,9
30/03/2017	1,6 X 10e3	1,6 X10e2	5	0,9
04/04/2017	17	0,9	6	0,9
06/04/2017	63	2,0 x10e2	55	0,9
11/04/2017	8	1	1	0,9
13/04/2017	1	3,9 x10e2	1	0,9
20/04/2017	-	0,9	1,6 x10e3	2
25/04/2017	0,9	-	0,9	0,9
27/04/2017	14	0,9	7 x 10e2	0,9
ELIMINACION DE LA ETAPA DE ROTURA				
02/05/2017	1,3 X10e2	-	2,2 x 103	0,9
04/05/2017	10 x 10	-	1,8 x 10e2	0,9
09/05/2017	2,5 x 10	-	3,2 x x10e3	0,9
11/05/2017	9 x10	1 x10e2	2 x10e2	3
LAVADO CON ACIDO FOSFORICO AL 1.5%				
16/05/2017	-	5 x10e2	1,6 x 10e3	0,9
18/05/2017	9 x10	2 x 10e2	7 x 10e2	0,9

Fuente: Cano A, 2017.

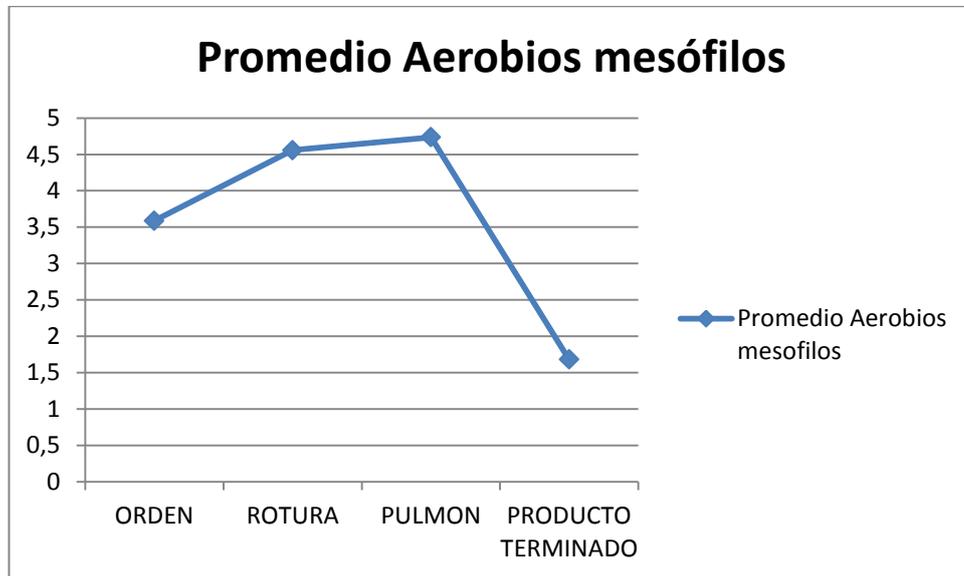
Tabla 6. Resultados de esporas anaerobias

ESPORAS ANAEROBIAS UFC x mL				
FECHA	ORDEN	ROTURA	PULMON	PRODUCTO TERMINADO
28/03/2017	0,9	0,9	0,9	0,9
30/03/2017	0,9	100	0,9	0,9
04/04/2017	0,9	0,9	100	0,9
06/04/2017	0,9	100	100	0,9
11/04/2017	0,9	0,9	0,9	0,9
13/04/2017	0,9	100	0,9	0,9
20/04/2017	-	0,9	0,9	0,9
25/04/2017	0,9	0,9	0,9	0,9
27/04/2017	0,9	0,9	0,9	0,9
ELIMINACION DE LA ETAPA DE ROTURA				
02/05/2017	100	-	0,9	0,9
04/05/2017	0,9	-	0,9	0,9
09/05/2017	0,9	-	0,9	0,9
11/05/2017	0,9	0,9	0,9	0,9
LAVADO CON ACIDO FOSFORICO AL 1.5%				
16/05/2017	-	0,9	0,9	0,9
18/05/2017	0,9	0,9	0,9	0,9

Fuente: Cano A, 2017.

Para entender mejor estos resultados se graficó el promedio de estos en Log10 y así apreciar cómo influye cada etapa en la carga microbiana de la leche

Grafica 2. Aerobios mesófilos (seguimiento en línea de producción)

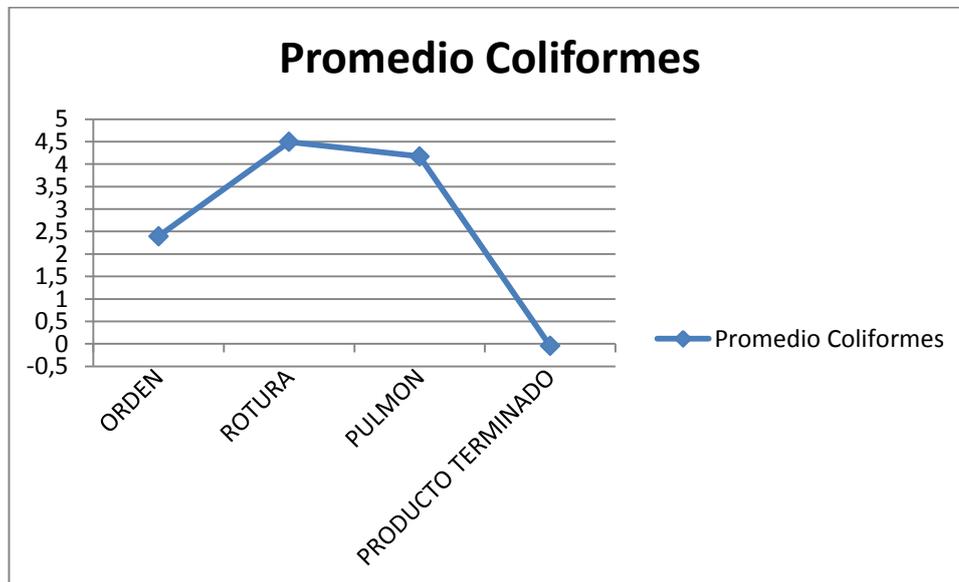


Fuente: Cano A, 2017.

Los aerobios mesófilos se encontraron en todas las etapas del proceso, inicialmente en la orden se encontró un alta concentración , esto debido a la gran carga microbiana que trae la leche cruda, estos son sensibles al proceso de termización, pero este no es suficiente para eliminarlos completamente, otro factor que puede afectar esta concentración microbiana en la orden es el lavado del silo donde se almacena, si el lavado no se realiza correctamente se presenta una re-contaminación de la leche, las acciones correctivas llevadas a cabo no afectan en gran medida el conteo de microorganismos en esta etapa. En la etapa de rotura se evidencio recuentos elevados de aerobios mesófilos , esto se debe a factores ambientales que permiten la contaminación de leche ya procesada, manipulación del personal a cargo de la rotura, cestillos donde se almacena el producto en espera de ser sacado del empaque defectuoso, las acciones correctivas llevadas a cabo afectan directamente esta etapa, ya que al no ser enviada directamente al tanque pulmón para mezclarse con la orden, esta no está proporcionando un aumento en la carga microbiana, al ser re-procesada se reduce esta carga microbiana y permite la elaboración de un nuevo producto acorde con los requerimientos del decreto 616 de 2006. En la etapa del tanque pulmón se observó la presencia de aerobios mesófilos, dado que este recibe la leche procedente de la orden y de la rotura, se puede evidenciar una carga similar a las etapas anteriores, en el tanque pulmón no existe refrigeración por lo que permite la multiplicación de los microorganismos presentes en la leche, las acciones correctivas eliminaron la presencia de

esporas anaerobias en esta etapa del proceso. En el producto terminado se presentó crecimiento de aerobios mesófilos en dos ocasiones, posiblemente esto es debido a un problema en el envasado.

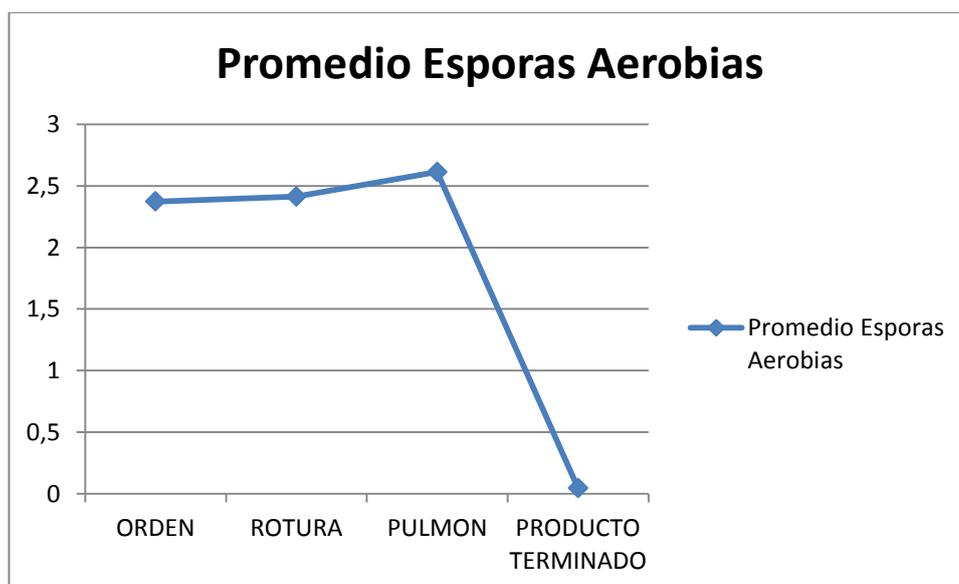
Grafica 3. Coliformes totales (seguimiento en línea de producción)



Fuente: Cano A, 2017.

Los coliformes totales se encontraron en las 3 primeras etapas del proceso y los factores que favorecieron su presencia son los mismos que lo dichos para los aerobios mesófilos (carga inicial de la leche cruda, manipulación del personal de rotura). Estos nunca se presentaron en el producto terminado, no son capaces de sobrevivir al proceso UHT.

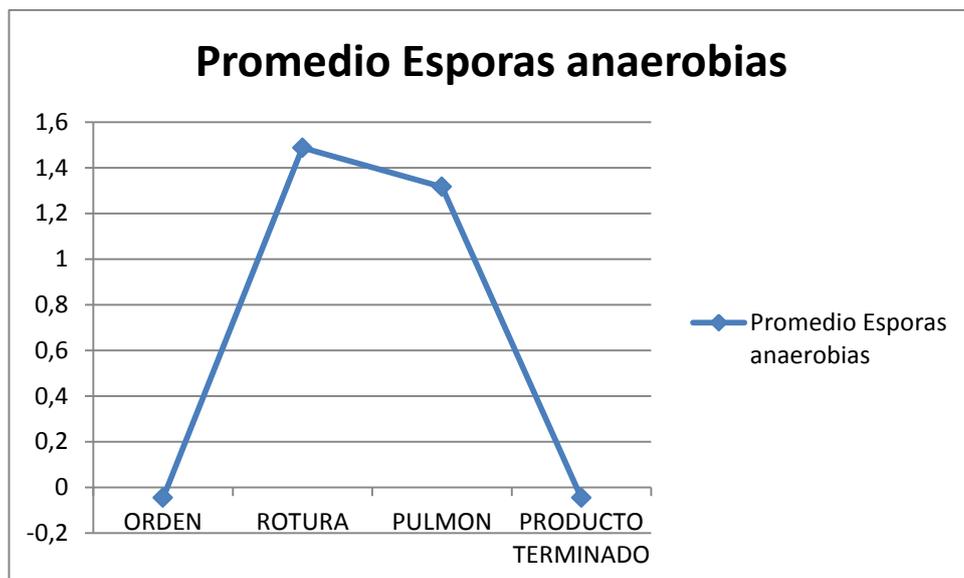
Grafica 4. Esporas aerobias (seguimiento en línea de producción)



Fuente: Cano A, 2017.

Las esporas aerobias se encontraron en las 3 primeras etapas del proceso y los factores que favorecieron su presencia son los mismos ya mencionados para aerobios mesófilos (carga inicial de la leche cruda, factores ambientales en el área de rotura). Estos no se presentaron en el producto terminado analizado el día de producción. Las acciones correctivas tienen un efecto directo sobre la presencia de estos microorganismos en la leche disminuyendo su número.

Grafica 5. Esporas anaerobias (seguimiento en línea de producción)



Fuente: Cano A, 2017.

La presencia o resultado positivo de esporas anaerobias se presentó en la etapa de rotura y el tanque pulmón, siendo el proceso de rotura la etapa donde se contaminaba la leche con estos microorganismos, en el producto terminado nunca se presentó un resultado positivo para estos microorganismos, las acciones correctivas tuvieron un efecto claro sobre su presencia en el tanque pulmón.

5.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Macroscópicamente se observaron colonias rojas (TTC) y blancas (sin TTC) de 1 a 2 mm de diámetro de forma redondeada, lisas, de borde irregular en agar SPC, (no se llevó a cabo microscopia por falta de microscopio en el tiempo en el que se realizó el estudio).

Al ver estos resultados se puede identificar que el punto que más influye en la carga microbiana de la leche es la rotura y al unirse a la orden en el tanque

pulmón aumenta aún más el contenido microbiano en esta, por lo tanto se llevaron a cabo acciones correctivas para disminuir la carga microbiana.

5.4 ACCIONES CORRECTIVAS

5.4.1 MODIFICACION DE PROCESO

Como estrategia para minimizar la carga microbiana se eliminó la etapa del proceso llamada rotura, en lugar de ser enviada directamente al tanque pulmón, la leche es reprocesada y enviada a pasteurización para elaborar una nueva orden del producto.

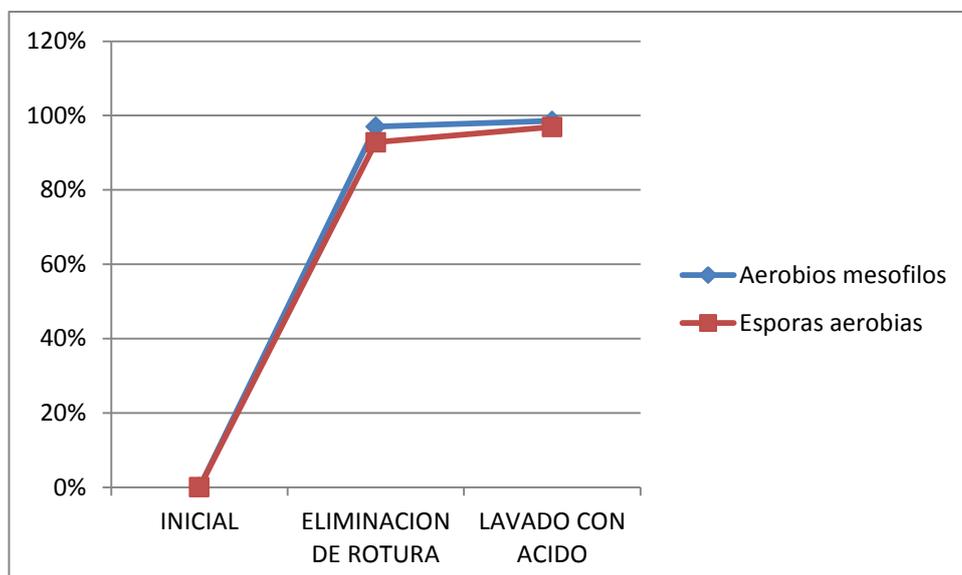
Esta acción correctiva dio como resultado una mejoría del 97% al disminuir la presencia de microorganismos en el producto final en la prueba de esterilidad comercial, este resultado se puede observar en las gráficas 6 y 7.

5.4.2 LAVADO CON ACIDO FOSFORICO 1.5%

Con el fin de eliminar el bioflim, en el proceso se realizó lavado viernes y sábado con ácido fosfórico al 1.5% siendo establecido semanalmente.

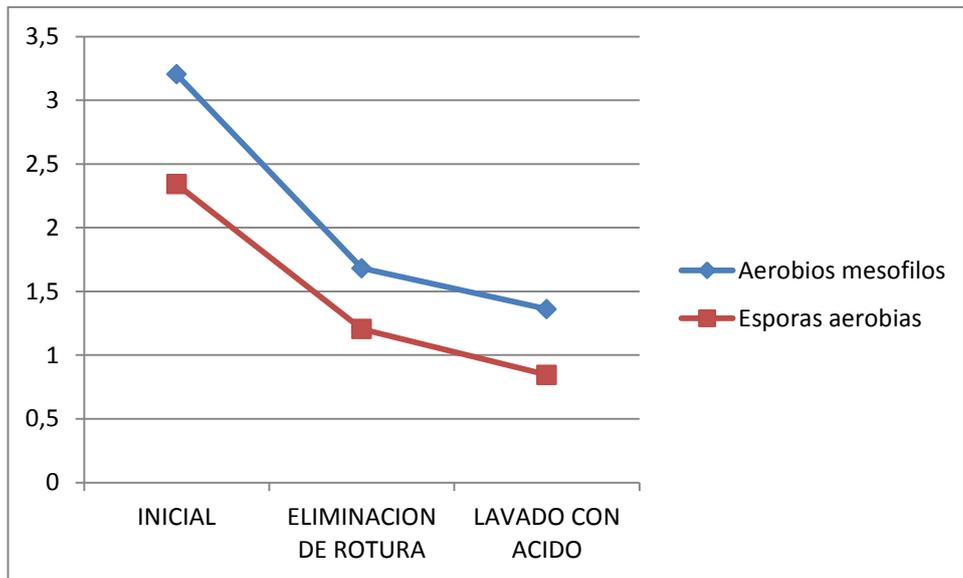
Esta acción correctiva dio como resultado un aumento al 98% en disminuir la presencia de microorganismo en el producto final en la prueba de esterilidad comercial, este resultado se puede observar en las gráficas 6 y 7.

Gráfica 6. Esterilidad comercial (porcentaje de mejora)



Fuente: Cano A, 2017.

Grafica 7. Esterilidad comercial (disminución de la carga microbiana)



Fuente: Cano A, 2017.

En la prueba de esterilidad comercial se hallaron aerobios mesófilos y esporas aerobias, siendo esto un incumplimiento a los requisitos establecidos por el decreto 616 de 2006, las acciones correctivas afectaron directamente los resultados del conteo de aerobios mesófilos y esporas aerobias (estos se expresan en log10), obteniéndose para aerobios mesófilos un conteo de 3.20 antes de las acciones correctivas, 1.68 al eliminar la etapa de rotura y 1.36 al ejecutar los lavados con ácido fosfórico al 1.5%, presentando una mejora del 97% con la primera acción correctiva y un 98.57 con la segunda acción correctiva, en el caso de las esporas aerobias antes de las acciones correctivas se obtuvo un conteo de 2.34, 1.20 al eliminar la etapa de rotura y 0.84 al ejecutar los lavados con ácido fosfórico al 1.5%, presentando una mejora del 92.80% con la primera acción correctiva y un 96.90 con la segunda acción correctiva.

Según los resultados obtenidos se puede asegurar que la etapa llamada rotura representaba uno de los focos de contaminación más importantes del proceso de elaboración de leche UHT en la planta de lácteos la Esmeralda, en este estudio no se tomó en cuenta la carga microbiana de la leche cruda, ya que es un factor que no se permitía modificar, por eso el esfuerzo se concentró en la línea de producción.

6. CONCLUSIONES

El análisis de la calidad microbiológica de la leche UHT media vida 20 días en la planta de lácteos la Esmeralda S.A.S evidencio la presencia de aerobios mesófilos y esporulados aerobios como la carga microbiana que se presentó constantemente en el proceso y en la prueba de esterilidad comercial, lo representa un problema al ser un incumplimiento en los requerimientos establecidos por el decreto 616 de 2006.

La identificación del proceso de elaboración permitió establecer los puntos clave de muestreo en la línea de producción, esta parte permitió elegir que etapas estaban más expuestas al riesgo de contaminación y llevar a cabo los análisis microbiológicos.

El registro de los análisis microbiológicos que se llevaron a cabo se basaron en los requisitos establecidos en el decreto 616 de 2006, estos sirvieron para evidenciar la carga microbiana añadida en cada etapa del proceso y como afectaba cada etapa en la calidad de la leche, revelando el no cumplimiento de la prueba de esterilidad comercial, pero si un disminución en la carga microbiana. Los principales puntos que aumentaban la carga microbiana eran la etapa de rotura y los cestillos donde se disponían el producto terminado con defectos en el polietileno, ya que por factores ambientales (pasillo directo al área de recepción de producto rechazado con una constante entrada de polvo y paso de personal) era muy propenso a la presencia de esporulados aerobios y anaerobios (sulfito y no sulfito reductores) que afectaban la calidad de la leche.

Las medidas de prevención se establecieron como acciones correctivas al eliminar la etapa de rotura y llevar a cabo los lavados de todo el proceso con ácido fosfórico al 1.5% y así disminuir la carga microbiana y prevenir futuros problemas con altas concentraciones de microorganismos que el equipo UHT no sea capaz de reducir a cero, la eliminación total de la presencia de aerobios mesófilos y esporas aerobias no fue posible, por tal motivo se realizan sugerencias.

7. SUGERENCIAS

Para lograr un 100% de mejoría o la eliminación total de las bacterias esporuladas que se pueden presentar en la leche UHT en la planta de lácteos la Esmeralda SAS, se recomienda llevar a cabo una modificación del proceso UHT al establecer un tiempo diferente al que se maneja actualmente, esto se basa principalmente en aplicar el valor Z (temperatura de destrucción) que corresponde al número de grados que es necesario ajustar o cambiar de temperatura de un sistema, para modificar el tiempo de destrucción térmico en una unidad logarítmica, la formula puede ser revisada en el anexo1.

También se sugiere el hacer cambios respecto al factor ambiental que contamina los cestillos donde se almacena la rotura, aunque esta sea re-procesada aun continua siendo un factor de riesgo.

8. BIBLIOGRAFIA

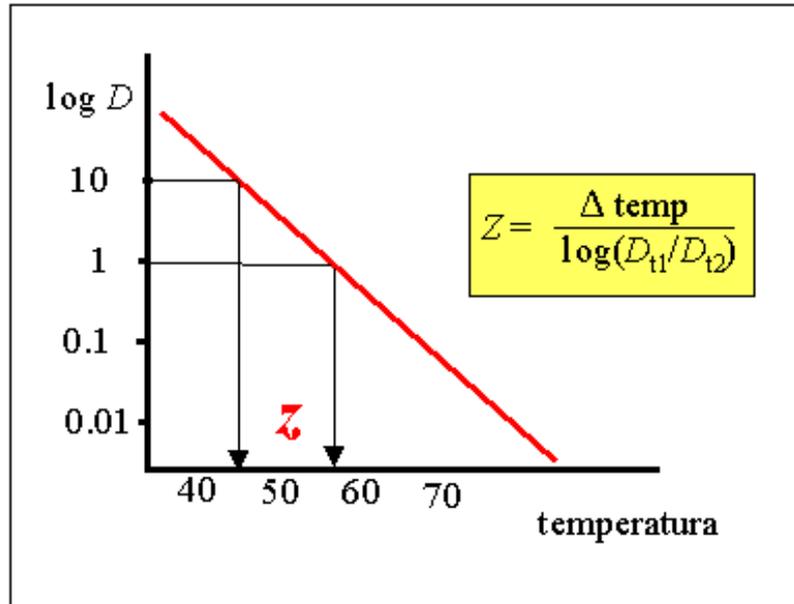
1. ALFONSO KATHERIN; Colombia: La mitad de la producción nacional de leche es informal; 6 de marzo de 2017; disponible en <https://www.portalechero.com/innovaportal/v/11314/1/innova.front/colombia:-la-mitad-de-la-produccion-nacional-de-leche-es-informal.html>
2. BERNIER I, CARDENA E, PIÑEROS O; *Bacillus sporothermodurans* anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia; Bogotá, Colombia; Alimentos Hoy; 17 de julio del 2012; Vol 21; Pag 126-137
3. CARLIN F; Origin of bacterial spores contaminating foods; Food Microbiology; 2011; Vol 28; Pag 177–182
4. CENTOLA A; ET AL; Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra-high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction; *Ciência Rural*; 2016; Vol 46; Pag 286-292.
5. CONTEXTO GANADERO; Colombia, cuarto mayor productor de leche en Latinoamérica; 6 de marzo de 2017; disponible en <http://www.contextoganadero.com/internacional/colombia-cuarto-mayor-productor-de-leche-en-latinoamerica>
6. DRIKS A, SETLOW P; Morphogenesis and properties of the bacterial spore; Washington D.C; American Society for Microbiology; 2000; Pag 191–218
7. FOSTER S, JOHNSTONE K; Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination; *Molecular Microbiology*; 1990; Vol 4; Pag 137–141
8. HIGGINS D, DWORKIN J; Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation; *FEMS Microbiology Reviews*; enero de 2012; Vol 36; Pag 131-148
9. HUESCA L, ET AL; Métodos para la inactivación de esporas en alimentos; *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*; 2014; Vol 8, Pag 48-67
10. JACSON S, ET AL; *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation; *Letters in Applied Microbiology*; 1995; Pag 103 – 105.
11. LEGGETT M, ET AL; Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance; *Journal of Applied Microbiology*; 2012; Vol 113; Pag 485-498
12. LOTFI GHELLAI, BOUMEDIENE MOUSSABOUDJEMAA; Aerobic Spore-Forming Bacteria in the Ultra High Temperature Milk Produced in

the North West of Algeria; Tlecem Algeria; Journal of Agricultural Science and Technology; septiembre 20 de 2013; Pag 697-702

13. MCGUIGGAN J, et al; Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: Factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic Bacillus spores, International Journal of Dairy Technology; 2002; Vol 55; Pag 100-107.
14. MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL; Decreto número 616 de 2006; 28 de Febrero de 2006.
15. NICHOLSON WL, ET AL; Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments; Microbiology and Molecular Biology Reviews; septiembre 2000; Vol 64; Pag 582-572
16. PINTO CLAUDIA ET AL; Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria; Rio de Janeiro Brazil; International Journal of Dairy Technology; 2017; Vol 70; Pag 1-7.
17. SCHELDEMAN P, ET AL; Bacillus sporothermodurans and other highly heat-resistant spore formers in milk, Journal of Applied Microbiology; 2006; Vol 101; Pag 542-555.
18. SERRANO GERMAN; Fortaleza de la cadena Láctea Colombiana; Bogotá Colombia; SISLAC; 2005; Pag 1-7.
19. SETLOW P, JOHNSON E; Spores and their significance, Food microbiology: fundamentals and frontiers; Washington D.C; ASM Press; 2007; 3ª. Edición; Pag 35-67
20. SETLOW P; Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals; Journal of Applied Microbiology; 2006; Vol 101; Pag 514–525
21. TE GIFFEL M; ET AL; Bacterial spores in silage and raw milk; Antonie van Leeuwenhoek; 2002; Vol 81; Pag 625–630.
22. VARNAM ALAN, SUTHERLAND JANE; Leche y productos lácteos; Zaragoza, España; Acribia S.A; 1995.

ANEXOS

Anexo 1. Fórmula para hallar el valor z



Anexo 2. Cronograma de actividades

