

Mejoramiento del manual de técnicas de análisis Microbiológicos y del programa de limpieza y desinfección empleados en la planta Lácteos La Esmeralda, SAS.

ANDREA GARCÍA LEAL

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER
2017

Mejoramiento del manual de técnicas de análisis Microbiológicos y del programa de limpieza y desinfección empleados en la planta Lácteos La Esmeralda, SAS.

ANDREA GARCÍA LEAL

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título de Microbiólogo.

RUTH ELIDE MONTAÑEZ

JEFE DE CALIDAD Y TUTORA EMPRESARIAL, PLANTA LÁCTEOS LA ESMERALDA
SAS.

Ph. D. RAMON OVIDIO GARCÍA

TUTOR ACADÉMICO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER

2017

Nota de aceptación

Firma del jurado

Firma del jurado

Pamplona, 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por permitirme cumplir cada uno de mis ideales, por acompañarme en cada paso, por su sabiduría y amor.

A mi familia, gracias por ser mi soporte y mi base fundamental durante este camino de aprendizaje; a mi Madre, Magda Leal Fernández y a mi abuela Fabiana Fernández por ser mi motor y ese apoyo incondicional en esta etapa, por cada esfuerzo y sacrificio para que me pudiera superar. A mi hermano Yerson, por ser complemento y fortaleza. Gracias a ustedes por su inmenso amor y por su paciencia, por ser ese impulso que me motiva a ser mejor persona y una excelente profesional.

A la doctora Ruth Montañez, por ser buena jefe y un apoyo fundamental durante la realización de este proyecto, por su voz de aliento y por sus buenos consejos.

A la Planta Lácteos La Esmeralda, por concederme la oportunidad de trabajar y llevar a cabo el desarrollo de este trabajo.

A los profesores Ovidio García, Félix Ortiz, Claudia Clavijo y demás docentes del programa de microbiología por su tiempo, por sus enseñanzas y sobre todo por la paciencia con la que me transmitieron sus conocimientos y me permitieron formarme como una profesional integral.

Dedico este trabajo principalmente a Dios por ser mi guía y pieza fundamental en mi vida, por permitirme culminar una etapa importante de mi vida. A mi abuelo, que desde el cielo me anima diariamente a ser mejor persona y continuar con la realización de cada uno de mis sueños. A mi Madre, por sus consejos y llamados de atención que me ayudaron a ser quien soy.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de tablas	9
Lista de figuras	10
Lista de abreviaturas	12
1. Introducción	13
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. Justificación	16
4. Marco teórico	17
4.1 Sistema teórico	17
4.1.1 La leche	17
4.1.2 Composición de la leche	17
4.1.3 Factores alteradores de la leche	17
4.1.3.1 Alteración microbiana	18
4.1.3.1.1 Sabor	18
4.1.3.1.2 Aspecto	18
4.1.3.1.3 Color	18
4.1.3.2 Alteración enzimática	18
4.1.4 Tratamientos aplicados a la leche para su conservación	18
4.1.4.1 Pasteurización	19
4.1.4.2 UHT (ultra alta temperatura)	19
4.1.4.2.1 Bacterias Esporuladas	20
4.1.5 Parámetros fisicoquímicos de la leche	20
4.1.6 Parámetros microbiológicos de la leche UHT	22
4.2 Limpieza y desinfección en plantas de lácteos	22
4.2.1 Limpieza	22
4.2.2 Tipos de limpieza	22
4.2.2.1 Limpieza en seco	22
4.2.2.2 Limpieza en húmedo	22
4.2.3 Métodos de limpieza	22
4.2.3.1 Limpieza manual	23
4.2.3.2 Sistema de limpieza en el sitio (cip)	23
4.3 Desinfección	23
4.3.1 Propiedades de los desinfectantes	23

4.3.2	Factores que condicionan la elección del desinfectante	24
4.3.3	Mecanismos de acción de los agentes desinfectantes	24
4.3.3.1	Desintegración de la célula	24
4.3.3.2	interferencia con la energía	24
4.3.3.3	Síntesis de Proteínas (interferencia de crecimiento)	25
4.3.4	Tipos de desinfectantes	25
4.3.4.1	Clorados	25
4.3.4.2	Compuestos de amonio cuaternario	25
4.3.4.3	Ácido Peracético	26
4.4	Programas de limpieza y desinfección	26
4.4.1	Componentes del programa de limpieza y desinfección	27
4.5	Documentación del sistema de gestión de calidad (procedimientos microbiológicos)	27
4.5.1	Manual de calidad	27
4.6	Legislación colombiana vigente para la industria láctea	28
4.6.1	Resolución 0127 del 7 de febrero 2001 de la secretaria de salud de Bogotá	28
4.6.2	Del ministerio de protección social el decreto 616 del 28 de febrero de 2006	28
5.	Metodología	29
5.1	Revisión de la documentación normativa colombiana vigente para análisis microbiológicos de productos lácteos y para el programa de limpieza y desinfección de industrias lácteas	29
5.2	Actualización del manual de técnicas de análisis microbiológicos y del programa de limpieza y desinfección	29
5.3	Evaluación de desinfectantes	30
5.3.1	Aislamiento de las cepas	30
5.3.2	Preparación de las diluciones de los microorganismos	31
5.3.3	Preparación de las diluciones de los desinfectantes	31
6.	Cronograma de actividades	33
7.	Resultados y discusión	34
7.1	Manual de limpieza y desinfección	34
7.2	Manual de técnica de análisis microbiológicos	34
7.3	Recuento en placa (UFC/ml), coliformes.....	35
7.3.1	Porcentaje de reducción de coliformes	36
7.4	Recuento en placa (UFC/ml), bacterias esporuladas	40
7.4.1	Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas	41
7.5	Recuento en placa (UFC/ml) de levaduras	46
7.5.1	Porcentajes de reducción de levaduras	47

8 Conclusiones	52
9 Recomendaciones	53
10 Bibliografía	54
11 Anexos	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la leche entera.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la leche deslactosada.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la leche semidescremada.

Tabla 4: Concentración de los desinfectantes a evaluar.

Tabla 5. Cronograma de actividades durante la ejecución del proyecto.

Tabla 6. Recuento en placa de Coliformes, tiempo de exposición y concentraciones evaluadas de cada desinfectante.

Tabla 7. Porcentajes de reducción, tiempos de exposición y concentraciones evaluadas frente a Coliformes.

Tabla 8. Recuento en placa de bacterias esporuladas, tiempo de exposición y concentraciones evaluadas de cada desinfectante.

Tabla 9. Porcentajes de reducción, tiempos de exposición y concentraciones evaluadas frente a bacterias esporuladas.

Tabla 10. Recuento en placa de levaduras, tiempo de exposición y concentraciones evaluadas de cada desinfectante.

Tabla 11. Porcentajes de reducción, tiempos de exposición y concentraciones evaluadas frente a levaduras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Peróxido de hidrógeno y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

Figura 2. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Citrosan y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

Figura 3. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones y sus respectivos tiempos de exposición. A. Titán, Dilución 10^{-6} y 10^{-7} ; B. Pentaquat, Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} . El porcentaje de reducción en todos los tiempos y en todas las concentraciones a las 2 diluciones evaluadas fue del 100%.

Figura 4. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Hipoclorito y sus respectivos tiempos de exposición. La Reducción en las dos diluciones evaluadas (Dilución 10^{-6} , Dilución 10^{-7}) fue igual, del 100%.

Figura 5. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Pentaquat y sus respectivos tiempos de exposición. La Reducción en las dos diluciones evaluadas (Dilución 10^{-6} , Dilución 10^{-7}) fue igual, del 100%.

Figura 6. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Citrosan y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

Figura 7. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Peróxido de hidrógeno y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

Figura 8. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Titán y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

Figura 9. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Hipoclorito y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

Figura 10. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Pentaquat y Titán y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

Figura 11. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Citrosan y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

Figura 12. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Peróxido de hidrógeno y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

Figura 13. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Hipoclorito y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

LISTA DE ABREVIATURAS

1. NTC – Norma Técnica Colombiana.
2. g – Gramos.
3. mL – Mililitros.
4. ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.
5. NMP – Número más Probable.
6. % – Grados Celsius.
7. INVIMA – Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamento y Alimentos.
8. UV – Ultravioleta.
9. DRBC – Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol.
10. BHI – Brain Heart Infusion.
11. UFC – Unidad Formadora de Colonia.
12. DRBC – Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol.
13. BHI – Brain Heart Infusion.
14. UFC – Unidad Formadora de Colonia.
15. YGC – Extracto de levadura–glucosa–cloranfenicol.
16. SPC – Standard Plate Count.
17. TCC–2,3,5–T rifeniltetrazolio cloruro.
18. VRB – Violeta cristal-Rojo neutro-Bilis-Lactosa.

1. INTRODUCCIÓN

La leche es uno de los alimentos mayormente consumidos en toda la población por sus altas fuentes nutricionales y por sus condiciones organolépticas se convierte es un producto con alta demanda en el mercado. Su vida útil es corta, por tanto si no es expuesta a tratamientos térmicos adecuados en el tiempo requerido pierde fácilmente su calidad ya que su composición al ser principalmente una mezcla compleja de materia grasa, proteína, lactosa, minerales, vitaminas y otros componentes que se encuentran en solución, hacen de esta uno de los alimentos apetecidos por los microorganismos para su buena proliferación puesto que les proporciona todos los nutrientes y condiciones básicas para su buen desarrollo (Simpson, *et al.*, 2000).

En Colombia, una de las principales fuentes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) es la alta carga microbiológica que se encuentra en la leche cruda debido a las malas prácticas de ordeño, por ello surge la necesidad de tratamientos que disminuyan estas cargas microbianas pero que a su vez no alteren las condiciones organolépticas de la leche (Early, 2000).

Para lograr obtener productos de calidad, se debe conservar desde el inicio las condiciones aptas de la leche, desde los hatos hasta su comercialización. Se deben tener en cuenta principalmente que los valores nutricionales de la leche no se vean afectados por la presencia de agentes externos como antibióticos, detergentes, conservantes y agua. Es decir, debe estar microbiológicamente y fisicoquímicamente en condiciones aceptables (Vázquez-Ojeda, *et al.*, 2014).

El prolongar el tiempo de vida útil de la leche conlleva a la búsqueda de procesos tecnológicos que permitan su higienización y esterilización consecutivamente, por ello en la mayoría de plantas de productos lácteos se emplean procesos UHT con rangos de temperaturas de 132 a 155°C por 1 a 5 segundos, con la intención de prolongar la vida útil de la leche durante 6 meses, minimizando las cargas microbianas entre 5 a 15 reducciones decimales e igualmente evitando las pérdidas y cambios nutricionales y organolépticos (Simpson, *et al.*, 2000).

Además, no solo es primordial buscar los tratamientos térmicos adecuados para la conservación de la calidad de la leche, si no también, contar a nivel de planta con las instalaciones y los equipos adecuados para el buen procesamiento. Por ello La limpieza y desinfección eficaz de todas las superficies y ambientes, que se encuentran en contacto con la leche deben ayudar a reducir, pero sobre todo a controlar las posibles fuentes de contaminación biológica (Serrano, 2005).

En la planta Lácteos La Esmeralda se producen principalmente productos con leche obtenida de los mejores hatos lecheros colombianos, la cual es recolectada y llevada a la planta de producción donde es procesada bajo estrictos estándares de calidad,

cumpliendo la normatividad y conservando su valor nutritivo, entregando a los clientes alimentos inocuos y saludables dentro de los cuales están, Leche Pasteurizada Entera, Leche UHT Larga Vida Entera y Leche Deslactosada Semidescremada (Lácteos La Esmeralda, 2017).

La finalidad de este trabajo es diseñar los programas de técnicas de análisis microbiológicos y de limpieza y desinfección de la planta Lácteos La Esmeralda SAS, que serán implementados de manera regular para favorecer en el aseguramiento de la calidad de los productos que se procesan. Es significativo destacar que aunque se usen los tratamientos térmicos aptos y se operen las temperaturas óptimas de almacenamiento, el no vigilar ni controlar los sistemas de limpieza y mantenimiento de la planta se relacionaría con productos terminados contaminados ya sea por equipos, ambientes, superficies, empaques, o por el mismo personal operador, por ello es importante tener todos los procedimientos escritos, incluyendo agentes y sustancias utilizadas así como las concentraciones, formas de uso, equipos e implementos requeridos para efectuar las operaciones.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- 2.1.1** Elaborar el plan de mejoramiento del manual de técnicas de análisis Microbiológicos y del programa de limpieza y desinfección en la planta Lácteos La Esmeralda, SAS.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1** Contrastar los métodos de evaluación microbiológicos utilizados en la planta con los exigidos según el decreto 616 de 2006 para verificar si se cumplen a cabalidad.
- 2.2.2** Comparar los procesos de limpieza y desinfección de la planta con los ya establecidos en la NTC 5245 (Prácticas de limpieza y desinfección para plantas y equipos utilizados en la industria láctea) y actualizarlos en base a la normativa colombiana.
- 2.2.3** Revisar los procedimientos de análisis microbiológicos según la NTC 4433, 4939, 5698 y optimizar el manual de control de calidad actualmente usado en la planta en base a ellas.
- 2.2.4** Evaluar la efectividad de las concentraciones y tiempos de exposición de los desinfectantes empleados actualmente en el proceso de limpieza y desinfección en la planta Lácteos La Esmeralda para corroborar que sean los adecuados y cumplan con su función antibacteriana.

3. JUSTIFICACIÓN

En Colombia, la leche al ser un producto con alta demanda por su valor nutritivo se convierte en parte importante en la construcción de estrategias de seguridad alimentaria en lo referente a su producción y comercialización. Las empresas destinadas a la fabricación, procesamiento, envase y almacenamiento de productos alimenticios, deben implementar y desarrollar un plan de saneamiento con procedimientos requeridos para disminuir los riesgos de contaminación de los alimentos basados en el decreto 3075 del 1997, que rige en Colombia para el procesamiento de productos alimenticios desde la obtención de las materias primas hasta el consumo final.

El ministerio de la protección social en su decreto 616 de 2006 establece todos los parámetros de control para la leche con el objetivo de vigilar toda la cadena de producción láctea a nivel nacional, con la finalidad de incrementar las garantías ya que al ser un producto con una vida útil corta y por su alto consumo lo convierten en un riesgo para la seguridad alimentaria del país.

La higiene en las plantas procesadoras de alimentos es el arma más importante para controlar las fuentes de contaminación, si no se lleva a cabo una limpieza y desinfección continua, se están dando condiciones ideales a los microorganismos para que representen un problema de contaminación en los productos elaborados, lo que puede generar enfermedades en el consumidor. Las plantas destinadas al procesamiento de lácteos deben garantizar la inocuidad y calidad. Deben regirse estrictamente al cumplimiento de la normativa y desde el proceso de recepción de la leche cruda monitorear las condiciones en la que está su materia prima para no presentar inconvenientes con su producto terminado. Por esta razón es importante evaluar la calidad microbiológica en la que se encuentren los equipos y ambientes durante la cadena de producción y a partir de ahí revisar si los procesos de limpieza y desinfección empleados son los adecuados y desde nivel interno de la planta garantizar cada uno de los pasos de la elaboración del producto terminado, es importante verificar que los análisis microbiológicos sean los adecuados y que se evalúen claramente los indicadores de la calidad de los productos según las normativas establecidas a nivel nacional.

En lácteos La Esmeralda SAS actualmente se cuentan con procedimientos de análisis microbiológicos y de limpieza y desinfección, sin embargo se requiere que sean validados según la normativa vigente en Colombia y específica para cada proceso, por ello se debe realizar una revisión de los procedimientos establecidos en la planta y modificarlos basados en las normas para el mejoramiento interno de producción y por ende reducir los riesgos de obtener productos terminados con alteraciones que representen pérdidas económicas a la planta.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Sistema teórico

4.1.1 La leche

La leche cruda es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior (MinSalud, 2006).

4.1.2 Composición de la leche

Desde el punto de vista dietético la leche es el alimento puro más próximo a la perfección. Su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales y como fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina). Por otra parte, los lípidos y la lactosa constituyen un importante aporte energético.

El principal azúcar que contiene la leche es la lactosa la cual favorece la proliferación de bacterias formadoras de ácido en el intestino lo que en muchas ocasiones inhibe el crecimiento de bacterias indeseables, facilitando así la utilización de vitaminas especialmente vitamina B y la absorción del calcio (Beltrán, *et al.*, 2014).

Las proteínas de la leche de vaca proporcionan una fuente importante de aminoácidos, así como una variedad de funcionalidades que incluyen la actividad biológica in vivo. Las proteínas de la leche están conformadas por tres grupos: la caseína en un 3%, la lactoalbúmina en un 0.5% y la lactoglobulina en un 0.05%. En ellas se encuentran presentes más de veinte aminoácidos dentro de los cuales están todos los esenciales. La caseína a su vez está compuesta por tres tipos de caseína, la k-caseína, la b-caseína y la a-caseína (Duarte-Vázquez, *et al.*, 2017).

4.1.3 Factores alteradores de la leche

Al ser un alimento nutricionalmente rico es una fuente de crecimiento apta para gran cantidad de microorganismos. Las principales alteraciones de la leche son de tipo organoléptico como el sabor, olor y el aspecto. En ciertas ocasiones estas alteraciones son producto de sustancias extrañas que pasan a esta a través del animal como las aflatoxinas, pesticidas y antibióticos. Las condiciones del sabor varían principalmente por la acidez en la que se encuentre la leche si es producto de alteraciones microbianas o por cambios enzimáticos, no obstante, estos cambios no solo se deben a contaminaciones biológicas o químicas sino también por las condiciones de

alimentación del animal ya que si antes del ordeño ha consumido forraje la leche tomara este sabor.

4.1.3.1 Alteración microbiana: la leche contiene gran cantidad de microorganismos ya que es un buen sustrato de crecimiento para varias especies, naturalmente cuenta con una carga microbiana constituida principalmente por bacterias formadoras de ácido láctico. La actividad bacteriana de la leche puede ser producto de contaminaciones (patógenos, toxinas) que alteran su composición nutricional, o por inoculación consensuada cuando se quieren elaborar productos fermentados (Beltrán, *et al.*, 2014).

Las altas cargas microbianas reducen drásticamente su vida útil desmejora la calidad nutricional puesto que se coagulan las enzimas y se deterioran por proteólisis de las caseínas. La mayoría de estas alteraciones se pueden controlar desde el ordeño de la vaca, entre más controlado este el ambiente de ordeño, temperaturas y buenas prácticas higiénicas se reducirán las posibilidades de ingreso de microorganismos que canalicen el pezón (Vázquez-Ojeda, *et al.*, 2014).

4.1.3.1.1 Sabor: Acidificación y coagulación de la caseína por causa de *Streptococcus* y *Lactobacilos*. Sin acidificar la leche, pero con coagulación de la caseína por *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris*.

4.1.3.1.2 Aspecto: se aumenta la viscosidad por la presencia de *Bacillus spp* y *Micrococcus spp*.

4.1.3.1.3 Color: Coloraciones amarillas y azules a causa de diferentes especies de *Pseudomonas* y coloraciones rojas por la presencia de *Bacillus lactis erythrogenes*.

4.1.3.2 Alteración enzimática: la actividad lipolítica es la única actividad enzimática de relevancia; los triglicéridos por medio de las lipasas liberan todos los ácidos grasos favoreciendo alteraciones como el enranciamiento (Beltrán, *et al.*, 2014).

4.1.4 Tratamientos aplicados a la leche para su conservación

Los tratamientos principalmente empleados para la reducción de la carga microbiana de la leche son la pasteurización y la ultra-alta temperatura UAT (UHT), en la planta Lácteos La Esmeralda se elaboran principalmente leche larga vida entera y deslactosada (semidescremada).

4.1.4.1 Pasteurización:

La leche pasteurizada es el producto obtenido al someter la leche cruda a una adecuada relación de temperatura y tiempo para destruir su flora patógena y la casi totalidad de flora banal, sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas. Las condiciones mínimas de pasteurización son aquellas que tiene efectos bactericidas equivalentes al calentamiento de cada partícula a 72°C - 76°C por 15 segundos (pasteurización de flujo continuo) o 61°C a 63°C por 30 minutos (pasteurización discontinua) seguido de enfriamiento inmediato hasta temperatura de refrigeración (MinSalud, 2006).

Estos tratamientos térmicos aplicados en el proceso de pasteurización son relativamente suficientes para minimizar microorganismos patógenos y alterantes, la eficiencia depende del tiempo de exposición, del mantenimiento de la temperatura óptima de la carga inicial bacteriana y del porcentaje de microorganismos termófilos esporulados. Estos termodúricos son importantes ya que resisten estas temperaturas de pasteurización (Frazier & Westhoff, 1993).

La alteración de la leche pasteurizada depende principalmente de aquellos microorganismos que resisten estas temperaturas de pasteurización y de las que externamente pueden llegar ya sea por equipos mal lavados, sin desinfectar o por el agua mal tratada que se emplee para su elaboración (Early, 2000).

4.1.4.2 UHT (Ultra Alta Temperatura)

Según el decreto 616 del 2006, se define a la leche UHT como la obtenida mediante un flujo continuo que se aplica a aquella leche cruda o leche pasteurizada, empleando temperaturas entre 135 a 150°C por un lapso de tiempo entre 2 y 4 segundos con la finalidad de garantizar la destrucción por completo de las esporas bacterianas resistentes al calor, seguido por un enfriamiento inmediato a temperatura ambiente y por el envasado asépticamente en recipientes completamente estériles que tengan barreras a la luz, oxígeno y que sean cerrados herméticamente para posteriormente ser almacenada, con el objetivo de garantizar la esterilidad comercial del producto sin afectar esencialmente su valor nutritivo, sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual puede ser comercializada a temperatura ambiente (MinSalud, 2006).

El tratamiento UHT es un proceso continuo que se realiza en sistemas cerrados para prevenir que la leche se contamine por factores externos principalmente por microorganismos aerobios. En esta etapa, el producto después de su pasteurización, pasa a través de etapas sucesivas de calentamientos y enfriamiento. La garantía del proceso UHT es su empaque aséptico, ya que se realiza mediante maquinas que esterilizan el material de empaque con baños de peróxidos de hidrógeno.

La cantidad de microorganismos que llega a la leche por el contacto con equipos, ambientes o superficies contaminadas es muy variable pudiendo en ocasiones ser nulo su desarrollo debido a las buenas condiciones de limpieza y desinfección que se apliquen o recuentos incontables cuando no se siguen los protocolos de higienización adecuados (Bernier, *et al.*, 2012).

El encontrar microorganismos después de este proceso es un indicador de diferentes fuentes de falencias en el proceso ya sea por fallas en los controles de las temperaturas, por fugas presentes en las máquinas o por mal lavado y desinfección de los equipos. Este tratamiento debe garantizar la esterilidad de la leche incluso eliminando a los microorganismos esporulados termoresistentes (Bernier, *et al.*, 2012).

4.1.4.2.1 Bacterias Esporuladas: Los bacilos que forman esporas resistentes al calor están ampliamente distribuidos en la naturaleza y comúnmente se encuentran en la flora microbiana de la leche cruda y pasteurizada y productos lácteos. Las esporas que sobreviven al procesamiento (llenado, temperatura, esterilización del material de envasado, etc.) pueden germinar, crecer y proliferar en el producto. *Geobacillus stearothermophilus*, un microorganismo termofílico que produce esporas resistentes al calor, frecuentemente se aísla de la leche y de los productos lácteos y se asocia a la descomposición ácida de la leche evaporada. Debido a su resistencia al calor, este microorganismo se utiliza a menudo como un indicador biológico para probar la eficacia de los procesos de esterilización (Bernier, *et al.*, 2012).

4.1.5 Parámetros fisicoquímicos de la leche

En Colombia, el decreto 616 del 2006 establece los siguientes parámetros fisicoquímicos para las leches enteras, deslactosadas y semidescremadas:

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la leche entera

Parámetro/Unidad	Pasteurizada	Ultra pasteurizada	UAT (UHT)	Esterilizada
Grasa % m/v mínimo.	3,0	3,0	3,0	3,0
Extracto seco total % m/m mínimo	11,30	11,20	11,20	11,20
Extracto seco desengrasado % m/m mínimo	8,30	8,20	8,20	8,20
Peróxidasa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
Fosfatasa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Densidad 15/15°Cg/ml	1,0300	1,0330	1,0295	1,0330	1,0295	1,0330	1,0295	1,0330
Acidez expresada como ácido láctico %m/v	0,13	0,17	0,13	0,17	0,13	0,17	0,13	0,17
Índice °C	-0,530	-0,510	-0,540	-0,510	-0,540	-0,510	-0,530	-0,510
Crioscópico °H	-0,550	-0,530	-0,560	-0,530	-0,560	-0,530	-0,550	-0,530

Fuente: (MinSalud, 2006).

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la leche deslactosada

Parámetro/Unidad	Pasteurizada
Lactosa % m/m máximo	0,85
Índice Crioscópico °H máximo °C	0,685-0,661

Fuente: (MinSalud, 2006).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la leche semidescremada

Parámetro/Unidad	Pasteurizada		Ultra pasteurizada		UAT (UHT)		Esterilizada	
Grasa % m/v mínimo.	1,5-2,0		1,5-2,0		1,5-2,0		1,5-2,0	
Extracto seco total % m/m mínimo	9,75		9,70		9,70		9,70	
Extracto seco desengrasado % m/m mínimo	8,25		8,20		8,20		8,20	
Peróxidasa	Positiva		Negativa		Negativa		Negativa	
Fosfatasa	Negativa		Negativa		Negativa		Negativa	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Densidad 15/15°Cg/ml	1,0310	1,0335	1,0308	1,0335	1,0308	1,0335	1,0308	1,0335
Acidez expresada como ácido láctico %m/v	0,13	0,17	0,13	0,17	0,13	0,17	0,13	0,17
Índice °C	-0,530	-0,510	-0,540	-0,510	-0,540	-0,510	-0,530	-0,510
Crioscópico °H	-0,550	-0,530	-0,560	-0,530	-0,560	-0,530	-0,550	-0,530

Fuente: (MinSalud, 2006).

4.1.6 Parámetros microbiológicos de la leche UHT:

Para la leche UHT o larga vida el decreto exige que la Prueba de esterilidad comercial después de incubar durante 10 días no deba presentar crecimiento microbiano a 55°C y 35°C (MinSalud, 2006).

El cumplimiento de los requisitos microbiológicos depende principalmente de la calidad en la que se encuentre la materia y en la eficacia del programa de limpieza y desinfección que se emplee en los equipos.

4.2 Limpieza y Desinfección en plantas de lácteos

Los procesos de limpieza y desinfección son aplicados en todas las áreas de producción de la planta. Su objetivo principalmente es eliminar restos de suciedades (orgánicos, inorgánicos, microbiológicos). Estos procesos deben tener las ventajas suficientes para garantizar calidad a costos no muy altos y que sean sostenibles para la planta, además deben estar escritos y normalizados, especificando paso a paso en forma clara el área o el equipo a desinfectar, la frecuencia con la que se debe realizar, los implementos a usar y el personal que lo realizara. Es de suma importancia verificar constantemente que estos procedimientos se lleven a cabo según se especifique en el manual o en los protocolos establecidos por la planta (Beltran, *et al.*, 2014).

4.2.1 Limpieza: Proceso de remoción mecánico o físico de partículas de polvo, grasa, piedras de leche, etc.

4.2.2 Tipos de limpieza:

4.2.2.1 Limpieza en seco: se realiza mediante aspiración de los residuos removidos por cepillos.

4.2.2.2 Limpieza en húmedo: Se emplea una solución limpiadora que por lo general consiste en agua con detergente.

4.2.3 Métodos de limpieza:

Se conocen principalmente 2 métodos de limpieza, el método de limpieza manual y el método de limpieza CIP (Limpieza en el lugar). En cada método de limpieza influyen principalmente los tiempos de exposición o de limpieza, la acción química y mecánica (Rivas & Bernal, 2014).

4.2.3.1 Limpieza manual: Se emplea fuerza física (Frotis y agitación); se remueve la suciedad usando detergentes con agua, generando una presión ya sea con escobas, paños o cepillos.

4.2.3.2 Sistema de limpieza en el sitio (CIP): se integran los procesos de limpieza y desinfección y no se requiere la intervención directa del manipulador. No se requiere desarmar el equipo, se permite la recirculación de la solución de limpieza la cual al finalizar el proceso puede ser recuperada y reutilizada por tanto se convierte en un proceso económico. El circuito es simple, en acero inoxidable y de volúmenes reducidos. Las soluciones desinfectantes y detergentes deben ser compatibles con el equipo; estas soluciones deben tener un programa de rotación para evitar generar resistencia microbiana, igualmente se deben tener en cuenta los tiempos y las concentraciones de las soluciones para que no se afecte su espectro acción (Rivas & Bernal, 2014).

4.3 Desinfección: El término desinfección se define como aquel acto de reducir o en su defecto eliminar cargas microbianas de objetos, utensilios y ambientes, pero no solo de eliminar a estos microorganismos sino también las esporas de aquellos que tienen la capacidad de producirlas como mecanismo de resistencia. Cabe resaltar que la desinfección no tiene el mismo margen de seguridad de la esterilización ya que este proceso de desinfección puede verse afectado por diferentes factores que reducen su espectro de acción (Beltran, *et al.*, 2014).

4.3.1 Propiedades de los desinfectantes

Para elegir un buen desinfectante se debe tener en cuenta ciertas características físicas y químicas que se adapten más a las necesidades de la empresa.

Algunas de estas propiedades son:

- Tener amplio espectro germicida incluyendo las formas esporuladas.
- No corrosivos.
- No tóxicos.
- De fácil dosificación.
- Económicos.
- Mantener acción bactericida residual.
- Estables durante el almacenamiento.
- Solubles en agua.

4.3.2 Factores que condicionan la elección del desinfectante:

La elección del desinfectante es un aspecto a tener muy en cuenta, se debe conocer su espectro de acción, debe carecer de toxicidad y debe ser compatible con los materiales con los que estén elaborados los equipos y utensilios.

Entre los factores que condicionan están:

- Los propios del desinfectante: la concentración a la que se utilice, su estabilidad y su pH óptimo de acción.
- Los propios de la resistencia microbiana: la densidad de la población y los tiempos de exposición.
- Los propios del material a desinfectar: la naturaleza y constitución del material, la compatibilidad con el desinfectante, la cantidad y el tipo de suciedad que este adherida y la calidad del agua que se use en el proceso de desinfección.

Entre los desinfectantes mayormente usados se encuentra el cloro, cloramidas, fenol, detergentes, amonios, agentes alquilantes, que se aplican sobre superficies u objetos inertes. Los antisépticos son aquellos que se usan sobre tejidos vivos entre ellos están el merthiolate y el alcohol yodado. El objetivo fundamental de todos los desinfectantes y antisépticos es reducir las cargas microbianas de forma tal que aquellos que resistan como esporas, no influyan notablemente en la calidad microbiológica de los productos que entran en contacto con las superficies desinfectantes (Bustamante & Vélez, 2014).

La cantidad de desinfectantes disponible en el mercado es amplia, por ello su elección debe hacerse cuidadosamente verificando sus actividades germicidas principalmente y en qué condiciones son aptos de funcionamiento ya que algunas de estas sustancias químicas desinfectantes actúan más eficaz y rápidamente a temperaturas elevadas, pero si no se establece una temperatura óptima de funcionamiento estos se podrían evaporar y degradar.

4.3.3 Mecanismos de acción de los agentes desinfectantes:

Las acciones de destrucción de microorganismos por soluciones desinfectantes se basan principalmente en la coagulación proteica, la oxidación y el rompimiento de las paredes celulares.

4.3.3.1 Desintegración de la célula: Se desintegran lípidos y proteínas, se desestabiliza la membrana celular. Se generan poros en la membrana plasmática hasta el punto de que esta se rompe, se alteran los gradientes de iones, se pierden solutos celulares y todas aquellas moléculas no polares ingresan y disuelven la fase lipídica bacteriana (Beltran, *et al.*, 2014).

4.3.3.2 Interferencia con la energía: La acción de algunos desinfectantes es sobre la producción de ATP, algunas soluciones pueden desequilibrar la fosforilación oxidativa inhibiendo la síntesis de ATP de manera diferente al funcionamiento de inhibición de la ATPasa. Algunos de los desinfectantes que cumplen con esta función son DPN (2,4 dinitrofenol), TSC (tetraclorsalicilanilida). Estos desinfectante son solubles en lípidos por tanto se disuelven en las membranas biológicas generando una disociación de la oxidación por

fosforilación bloqueando el flujo de protones al interior de la célula colapsando así el sistema de metabolitos (LeChevallier, *et al.*, 2017).

4.3.3.3 Síntesis de proteínas (interferencia de crecimiento): inhiben la síntesis, no permiten que se formen ya que se unen al ribosoma. Su acción es bacteriostática, pero si se prolongan los tiempos de exposición se puede producir una muerte bacteriana (acción bactericida) (Rivas & Bernal, 2014).

4.3.4 Tipos de desinfectante:

4.3.4.1 Clorados: son compuestos que liberan cloro, son los desinfectantes que más utilidad tienen, el más conocido es el hipoclorito siendo único por su actividad bactericida y además es efectivo contra microorganismos que esporulan, cuando se agrega cloro o hipoclorito al agua, el cloro reacciona con el agua para formar ácido hipocloroso, el cual en soluciones neutras o ácidas es un agente oxidante fuerte y un desinfectante efectivo. La disociación del ácido hipocloroso depende del pH el cual es el que determina la eficiencia de la desinfección la actividad del cloro influida por la presencia de materia orgánica. Los hipocloritos son los compuestos clorados más útiles y se encuentran disponibles en forma líquida o en polvos como en sales de calcio, litio y sodio, se emplean en gran escala en las industrias lácteas (LeChevallier, *et al.*, 2017).

4.3.4.2 Compuestos de amonio cuaternario: conocidos como "QUATS", son principalmente sales de amonio, tensoactivos, en los que se unen 4 grupos orgánicos a un átomo de nitrógeno, cargados positivamente (catión) la carga negativa normalmente es cloro (anión). Son activos en un amplio rango de pH pero son más efectivos en medios alcalinos. A pH menores de 5 pierden su efectividad, además son corrosivos y no se inactivan en presencia de materia orgánica. Las biopelículas bacterianas que existen fuera del cuerpo en superficies abióticas tienen graves consecuencias, incluidas la biocorrosión y bioensuciamiento, en una amplia gama de industrias Estos procesos perjudiciales de biopelícula pueden contribuir a la contaminación del agua potable y los productos industriales, el aumento de los costos de mantenimiento y la destrucción de los equipos esenciales. Una clase destacada y crítica de antibacterianos son los compuestos de amonio cuaternario (QAC). Los QAC con cargas positivas permanentes se encuentran en productos naturales antimicrobianos como la berberina, mientras que los nitrógenos terciarios en poliaminas como la norspermidina proporcionan ejemplos de QAC dependientes del pH. Los QAC generalmente son más eficaces contra las bacterias Gram-positivas en comparación con las bacterias Gram negativas, que poseen una doble membrana celular (Minbiole, *et al.*, 2016).

4.3.4.3 Ácido Peracético: Germicidas fuertemente oxidantes, consisten en la combinación con peróxido de hidrógeno y ácido peroxiacético. Como ventaja principal tienen que no dejan ningún tipo de residuo indeseable cuando se descomponen. El ácido peroxiacético se degrada en ácido acético y el peróxido se degrada en agua y moléculas de oxígeno. Son los sanitizantes más efectivos contra las biopelículas, su efectividad es mayor que la de los amonios cuaternarios, los clorados y otros desinfectantes. Es corrosivo y su efectividad se pierde en condiciones de pH alcalinas (Beltran, *et al.*, 2014). Es un desinfectante eficaz contra una gran variedad de microorganismos como virus, hongos, células bacterianas vegetativas y endosporas bacterianas. De hecho, se ha demostrado que es un desinfectante eficaz contra las esporas de *B. anthracis*. Su principal mecanismo de acción involucra la generación de radicales hidroxilos y orgánicos, estos radicales conducen a la oxidación de los enlaces dobles que se encuentran en los carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (March, *et al.*, 2015).

4.4 Programas de limpieza y desinfección:

Estos programas tienen como objetivo fundamental la implementación de buenas prácticas de manufactura para la obtención de productos de calidad, aumentando su vida útil. Deben satisfacer las necesidades de las plantas y adaptarse plenamente a los procesos de producción. Las plantas tienen como obligación establecer sus propios programas y tenerlos por escrito, especificando paso a paso los procesos a seguir en la limpieza y desinfección de los equipos, áreas, las concentraciones y las cantidades necesarias para realizar las diluciones y específicamente como se deben hacer, la frecuencia a realizar estos procesos, los responsables de la realización de los procesos de limpieza y las personas a cargo de la verificación del cumplimiento de estos programas.

Para obtener buenos resultados es determinante realizar las limpiezas adecuadamente para evitar que residuos orgánicos interfieran en la acción de los desinfectantes. Es sumamente importante tener en cuenta que los desinfectantes deben cumplir con un cronograma de rotación para evitar resistencias bacterianas por usos inadecuados de estas soluciones.

4.4.1 Componentes del programa de limpieza y desinfección:

- Contar con toda la información necesaria sobre las características y condiciones los sitios de trabajo, las sustancias y equipos que se emplean en los procesos de producción.

- Normas de limpieza y desinfección de utensilios, equipos y áreas con el objetivo de que los operarios conozcan claramente lo que se debe limpiar, como se debe limpiar y la frecuencia con que se deben hacer.
- Manual o guía de procedimientos: es la base fundamental que se elabora con el fin de usar como pilar para estructuras las normas y procedimientos de limpieza dentro de la industria. Lineamientos establecidos por las plantas de procesamiento para evitar focos de contaminación biológica, química y física, garantizando así productos de buena calidad.
- Capacitar al personal que participara en el programa: retroalimentarlos constantemente sobre la importancia de aplicar de la forma correcta los procedimientos de limpieza y desinfección.
- Frecuencia y compromiso en la realización a cabalidad del programa en base a los cronogramas establecidos (Bustamante & Vélez, 2014).

4.5 Documentación del sistema de gestión de calidad (procedimientos microbiológicos)

La documentación es la base fundamental de las buenas prácticas de laboratorio, es una evidencia formal que permite establecer parámetros que luego pueden ser verificados.

La NTC-ISO 9000:200 exige que todos los sistemas de gestión de calidad deban estar documentados.

4.5.1 Manual de calidad: es una guía que proporciona una descripción del sistema de gestión de calidad, su implementación, las descripciones de los procesos y sus interacciones, procedimientos documentados o referencia de ellos la política y los objetivos de calidad (Hernández & León, 2008).

4.6 Legislación Colombiana vigente para la industria Láctea

En cuanto a la calidad de la leche la legislación colombiana expone las condiciones ideales en las que esta debe ser entregada a los consumidores. En la actualidad las compañías colombianas están regidas por decretos como el 3075 del 23 de diciembre de 1997. Cualquiera que sea la causa del incumplimiento de todos los principios básicos de higiene en producción, este decreto da todos los parámetros necesarios para normalizar los procesos de producción o para sancionar a aquellos que no se acojan a los parámetros ahí establecidos.

Este decreto 3075 se fundamenta en los principios higiénicos establecidos en el *Codex Alimentarius*, el cual busca estandarizar la higiene en la manipulación de los alimentos a nivel mundial para facilitar la comercialización de los alimentos.

Las resoluciones que rigen la industria láctea son:

4.6.1 Resolución 0127 del 7 de febrero 2001 de la secretaria de salud de Bogotá:

En el decreto 3015 de 1997 se exige principalmente que los manipuladores de alimentos tengan conocimiento en educación sanitaria específicamente en las prácticas higiénico-sanitarias que se deben tener a la hora de manipular alimentos, de igual forma deben tener la destreza de tomar las precauciones necesarias para evitar contaminaciones (Secretaría Distrital de Salud, 2001).

4.6.2 Del ministerio de protección social el Decreto 616 del 28 de febrero de

2006: el cual expide el reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se procese, envase, comercialice, expendi, se importe o se exporte en el país (MinSalud, 2006).

La OMS solicita el cumplimiento obligatorio de las normas a nivel mundial y en Colombia solo hasta el año 1995 se crea el INVIMA como entidad gubernamental reguladora para vigilar el estricto cumplimiento de las Buenas prácticas de manufactura (BPM).

5 METODOLOGIA

5.1 Revisión de la documentación normativa colombiana vigente para análisis microbiológicos de productos lácteos y para el programa de limpieza y desinfección de industrias lácteas.

Se realizó una revisión general del manual de control de calidad vigente en la planta Lácteos La Esmeralda SAS, con el fin de reconocer los procedimientos de análisis microbiológicos y la bibliografía correspondiente a cada protocolo. Se buscó diferencias entre los protocolos estandarizados y los implementados en la planta con el fin de modificarlos basados en la legislación colombiana vigente.

Para la corrección de errores, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica principalmente del Decreto 616 del 2006 que establece el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendi, importe o exporte en el país; y en base a los parámetros de calidad aquí expuestos se verificó si los procedimientos cumplían a cabalidad con los análisis exigidos.

Igualmente se realizó una revisión bibliográfica de las NTC 4433, 4939, 5698, para el total conocimiento de los parámetros y requisitos pertinentes en la documentación.

El programa de limpieza y desinfección fue evaluado en el sitio, es decir, se preguntó directamente a los operarios encargados de los lavados del CIP y de las máquinas y equipos del área UHT como llevaban a cabo estos procesos.

La revisión bibliográfica se realizó en base a la NTC 5245 (Limpieza y desinfección en industrias lácteas). En la norma se especifica el procedimiento de lavado del CIP, en base a esto se procedió a realizar los cambios pertinentes en el protocolo vigente de la planta. En cuanto a los equipos y máquinas UHT en la norma no habla de procesos específicamente y nos remite directamente a los manuales de operaciones de los proveedores.

Se repasaron los conceptos que en cada norma se especifican para tenerlos en cuenta en las mejoras del manual de técnicas de análisis microbiológicos y del programa de limpieza y desinfección.

5.2 Actualización del manual de técnicas de análisis microbiológicos y del programa de limpieza y desinfección.

Se procedió a la revisión detallada de cada uno de los protocolos de análisis en busca de errores presentes en el fundamento de las técnicas utilizadas, las condiciones de crecimiento empleadas para cada microorganismo evaluado como los nutrientes,

temperaturas, tiempos de incubación y medios de cultivo utilizados. De igual forma se tuvo en cuenta la redacción y los posibles errores ortográficos de cada procedimiento.

Se desarrolló un listado de las condiciones en las que se estaban realizando los procedimientos establecidos en la planta y de las condiciones establecidas por las normas y observar así con que se cuenta actualmente y lo que se requiere para estandarizar los procesos.

Para la actualización del programa de limpieza y desinfección se realizó un análisis detallado de las concentraciones y de los tiempos empleados usados en los procesos de lavados en la planta para verificar si se están utilizando correctamente o si se requiere hacer alguna modificación.

5.3 Evaluación de desinfectantes: Los análisis se realizaron una sola vez, no hubo duplicados, por tanto, no hay datos de medias ni desviaciones estándar en las gráficas.

5.3.1 Aislamiento de las cepas: Se usaron cepas aisladas de los diferentes controles microbiológicos que realice a la planta: análisis de silos de almacenamiento de la leche y análisis de ambientes (Laboratorio, Pasteurización, equipos, Maquinas y embalaje).

- Para Coliformes se tomaron 100 ml de leche del silo de leche entera larga vida y del silo de leche entera media vida, se siembra 1 ml de muestra en cajas Petri y se adiciona 15 ml de agar VRB (Violeta cristal-Rojo neutro-Bilis-Lactosa), se incuba a 37°C por 24 horas. Las colonias que pasado el tiempo de incubación sean de color rosadas son características de los coliformes.
- Se empleó medio YGC (extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol) para el crecimiento de mohos y levaduras, para su aislamiento se adicionaron 15 ml de agar YGC a placas Petri estériles y se expusieron en diferentes ambientes de la planta, el tiempo de exposición fue de 30 min y se incubaron a 25°C por 5 días.
- El aislamiento de bacterias esporuladas se obtuvo de analizar diferentes muestras de producto terminado de leche UHT sometidas a proceso de esterilidad comercial con incubación de 35°C y 55°C durante 10 días respectivamente; pasados los 10 días, de cada muestra se realizó siembra en profundidad tomando directamente de cada bolsa de leche 1 ml y se siembra en cajas Petri, posteriormente se adicionó agar SPC (Standard Plate Count) con TCC (2,3,5-Trifeniltetrazolio cloruro) como colorante para identificación de las colonias, se incubaron las placas a 37°C por 48 hrs.

- Las colonias obtenidas de coliformes y esporulados se siembran por aislamiento en medio SPC y se incuban a las temperaturas y tiempos óptimos. La levadura se mantuvo aislada en medio YGC.
- Se realizó tinción de Gram para las cepas de coliformes y bacterias esporuladas.
- Las colonias confirmadas por tinción se sembraron masivamente en cajas Petri con los medios correspondientes para cada microorganismo. Para coliformes y esporulados medio SPC con TCC y levaduras medio YGC.

5.3.2 Preparación de las diluciones de los microorganismos: Se preparó una dilución de 90 ml de caldo peptona al 1% estandarizado con la totalidad de las colonias obtenidas de una siembra masiva en caja Petri, se tomaron las colonias con un hisopo estéril y se homogenizó en la dilución. Se obtiene así la dilución 10^{-1} , a partir de esta se tomaron 10 ml y se adicionaron a 90 ml de agua peptona (dilución 10^{-2}), se repite este procedimiento hasta obtener la dilución 10^{-6} y 10^{-7} para Coliformes y Esporulados y 10^{-4} para levaduras.

5.3.3 Preparación de las diluciones de los desinfectantes: Se prepararon las diferentes concentraciones de los desinfectantes a evaluar de la siguiente manera:

Tabla 4: Concentración de los desinfectantes a evaluar

Desinfectante	Concentración		
Peróxido de hidrógeno (35%)	300 ppm	350 ppm	400 ppm
Hipoclorito (500 ppm)	200 ppm	250 ppm	300 ppm
Citrosan (1080 ppm)	950 ppm	1000 ppm	1050 ppm
Pentaquat	250 ppm	300 ppm	350 ppm
Titán (15%)	250 ppm	300 ppm	350 ppm

- Se tomaron 4 ml de las concentraciones de cada desinfectante y se añadieron a tubos tapa rosca, se tomaron 4 ml de inóculo de cada dilución y se adicionaron a cada tubo con desinfectante. Se contabilizó el tiempo y pasados 5 min se tomó muestra con la pipeta y se sembró 1 ml en las placas estériles, posteriormente se adiciono agar SPC con TCC para coliformes y esporulados. Para las levaduras se emplearon cajas de Petri con agar YGC y se realizó siembra en superficie (0,1 ml). Se repitió este proceso a los 10 y 15 min.
- Se incubaron las cajas a las temperaturas y tiempos óptimos de cada cepa:

Coliformes y Esporulados: 37°C por 24-48 horas, Agar SPC.

Levaduras: 25°C por 24-48 horas, Agar YGC.

- Pasado el tiempo de incubación se verificó la efectividad del desinfectante, las cajas en las cuales hubo crecimiento después del tratamiento con el desinfectante indicaron que la concentración y los tiempos de exposición no son aptos para la eliminación de los microorganismos.

Obtención de porcentajes de reducción: Se empleó la siguiente fórmula para hallar los % de reducción de cada microorganismo por la acción de cada desinfectante:

(Recuento en placa obtenido de cada cepa tras la posterior exposición al desinfectante) (100%)

(Recuento en placa obtenido de la dilución inicial)

* Al resultado se le restó 100 para obtener el porcentaje de reducción total.

6 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 5. Cronograma de actividades durante la ejecución del proyecto

Actividades	Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1
Asignación del trabajo																	
Revisión bibliográfica																	
Elaboración de manuales según normatividad colombiana vigente y evaluación del proceso de limpieza y desinfección en la planta.																	
Resultados, Entrega de manuales, análisis de resultados.																	
Sustentación del trabajo de grado																	
Actividades complementarias: Análisis de producto terminado, esterilidad comercial, análisis del agua, análisis de materias primas, Frotis de silos, análisis de manipuladores, control de ambientes, frotis de <i>Clostridium</i> spp.																	

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 MANUAL DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

El manual de limpieza y desinfección actualmente empleado en la planta presenta errores de redacción. Lo que se buscó con la revisión de la norma fue referencia cada uno de los conceptos que requiere este manual. Igualmente se tuvo en cuenta el proceso de lavado del CIP según se establece en la norma y lo que indica que se debe hacer para limpiar y desinfectar el área UHT (Ver Anexo 3).

Con en el ensayo de los desinfectantes, se deben reevaluar las concentraciones que actualmente se emplean y encontrar un equilibrio para que se emplee una misma concentración en lo posible que sea eficaz para diferentes microorganismos teniendo en cuenta un tiempo establecido de 10 min por la norma. Se debe modificar el manual con las nuevas condiciones y concentraciones.

7.2 MANUAL DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

En la revisión realizada al manual de control de calidad actualmente empleado en la planta se encontró que presenta errores de tipo ortográfico y de redacción. Además, que los procedimientos actualmente usados para los análisis microbiológicos no están referenciados ni basados en las normas actuales colombianas.

Se encontró que la esterilidad comercial se está evaluando erróneamente ya que no se está siguiendo el protocolo establecido por la norma. Además, para el análisis de las esporas anaerobias se está empleando un medio selectivo (TSC) para sulfito reductores, pero en este caso es un medio que no permite la recuperación de gran cantidad de microorganismos anaerobios que están presentes en la leche y que no son sulfito reductor (Ver anexo 2).

Para el análisis de agua el procedimiento no cumple con las concentraciones que se deben usar en los tubos de NMP. Se emplea doble concentración y solo se están usando 3 tubos de análisis se inoculan en todos los tubos 10 ml y no se cumple lo que se dice en la norma que es inocular 10 ml, 1,0 ml y 0,1 ml manejando media concentración, concentración normal y doble concentración (Ver anexo 1).

El análisis de Mohos y levaduras no sigue los procedimientos establecidos en las normas y no están referenciados. Así que se buscó esta norma y los procedimientos para este análisis se tuvieron en cuenta para el mejoramiento del manual. Se tomaron los procedimientos tal cual se encontraron en las referencias bibliográficas (Ver anexo 3). Los conceptos y definiciones para cada procedimiento igualmente fueron tomados de cada una de las normas con el fin de que el nuevo manual este referenciado y sea claro para el personal que requiera revisar cada procedimiento

7.3 Recuento en placa (UFC/ml), Coliformes:

En este ítem se presentan los resultados obtenidos a los diferentes análisis realizados a los desinfectantes usados en el proceso de limpieza y desinfección frente a los diferentes microorganismos aislados de la planta.

Tabla 6. Recuento en placa de Coliformes, tiempo de exposición y concentraciones evaluadas de cada desinfectante.

Concentración desinfectantes	Tiempos de exposición							
	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	5 min		10 min		15 min	
			10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml
Pentaquat (ppm)								
250	230	28	<1	<1	<1	<1	<1	<1
300			<1	<1	<1	<1	<1	<1
350			<1	<1	<1	<1	<1	<1
Citrosan (ppm)								
950	230	28	74	<1	52	<1	24	<1
1000			27	<1	14	<1	8	<1
1050			20	<1	13	<1	4	<1
Peróxido (ppm)								
300	230	28	64	8	78	19	45	18
350			52	18	54	15	36	13
400			35	15	37	8	54	6
Titán (ppm)								
250	230	28	<1	<1	<1	<1	<1	<1
300			<1	<1	<1	<1	<1	<1
350			<1	<1	<1	<1	<1	<1
Hipoclorito (ppm)								
150	230	28	<1	<1	<1	<1	<1	<1
200			<1	<1	<1	<1	<1	<1
250			<1	<1	<1	<1	<1	<1

7.3.1 Porcentaje de reducción de Coliformes

Tabla 7. Porcentajes de reducción, tiempos de exposición y concentraciones evaluadas frente Coliformes.

Concentración desinfectantes	Tiempos de exposición					
	5 min		10 min		15 min	
Pentaquat (ppm)	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}
	250	100%	100%	100%	100%	100%
300	100%	100%	100%	100%	100%	100%
350	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Citrosan (ppm)	5 min		10 min		15 min	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}
950	67,82%	100%	76,52%	100%	89,56%	100%
1000	88,26%	100%	93,91%	100%	96,52%	100%
1050	91,30%	100%	94,34%	100%	98,26%	100%
Peróxido (ppm)	5 min		10 min		15 min	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}
300	72,17%	35,71%	66,08%	32,14%	80,43%	35,71%
350	77,39%	46,42%	76,52%	46,42%	84,34%	53,57%
400	84,78%	71,42%	83,91%	71,42%	89,56%	78,57%
Titán (ppm)	5 min		10 min		15 min	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}
250	100%	100%	100%	100%	100%	100%
300	100%	100%	100%	100%	100%	100%
350	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Hipoclorito (ppm)	5 min		10 min		15 min	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}
150	100%	100%	100%	100%	100%	100%
200	100%	100%	100%	100%	100%	100%
250	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Las concentraciones evaluadas del pentaquat, titán e hipoclorito mostraron resultados favorables en la reducción de la carga de coliformes (100%), igualmente los tiempos de exposición empleados son los adecuados, cabe resaltar que la acción de estos desinfectantes fue óptima puesto que a tan solo 5 min de contacto con el desinfectante

y a la mínima concentración evaluada de la que se emplea normalmente en el proceso de limpieza y desinfección de la planta, fueron inactivados los coliformes en todas las concentraciones, lo que indica que el compuesto activo de estos desinfectantes contra esta cepa es muy efectivo y no se han generado resistencias.

En cuanto al peróxido de hidrógeno y el citrosan, se puede observar que, aunque hay una reducción significativa no hay una eliminación completa de estos microorganismos. Se observa que en todos los tiempos de exposición y concentraciones evaluadas hubo recuento, lo que conlleva a buscar un ajuste de estos parámetros.

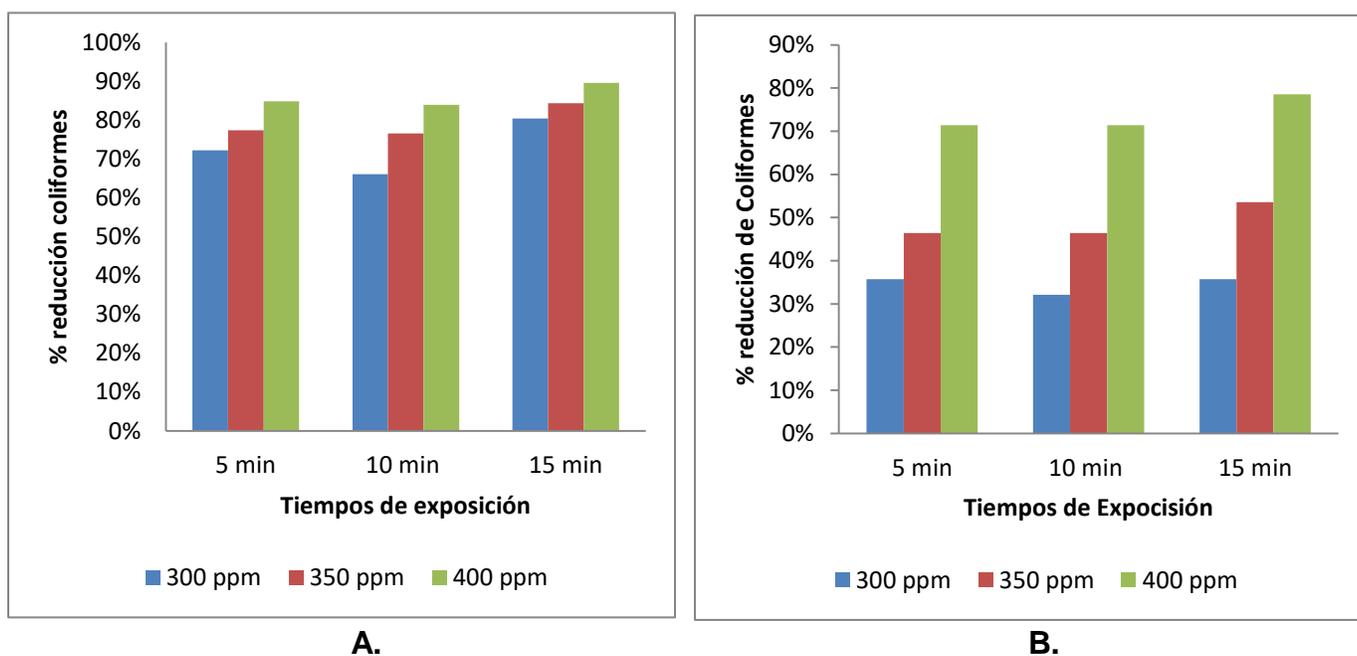
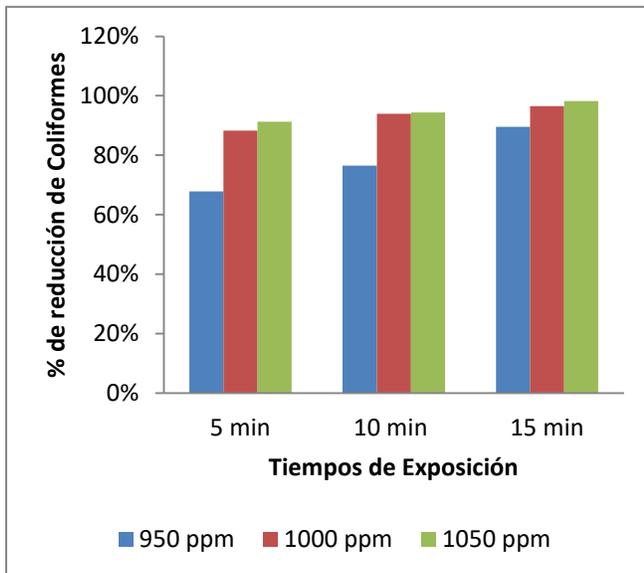
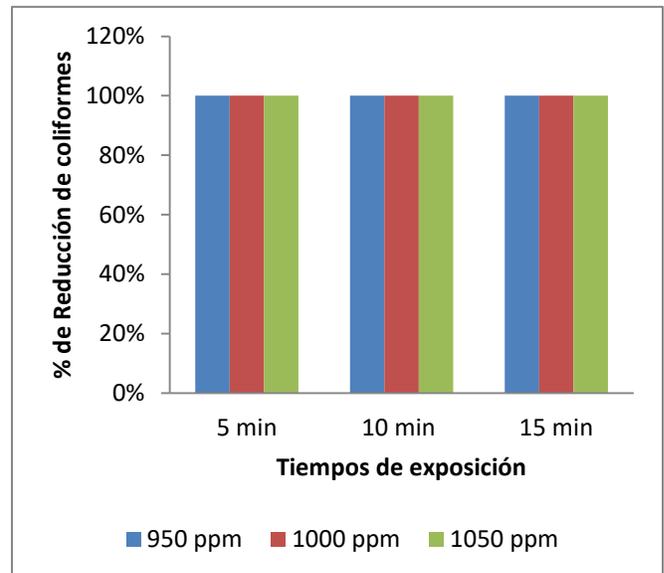


Figura 1. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Peróxido de hidrógeno y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

En la figura 1 se puede observar el comportamiento del desinfectante transcurridos los tiempos de exposición, el peróxido de hidrógeno mostro mejores porcentajes de reducción por encima del 50%) a los 15 min de exposición y a 400 ppm de concentración, lo que indica que se debe realizar un ajuste de estos parámetros ya sea aumentando la concentración a un tiempo de exposición de 10 min que es el tiempo ideal en estos procesos.



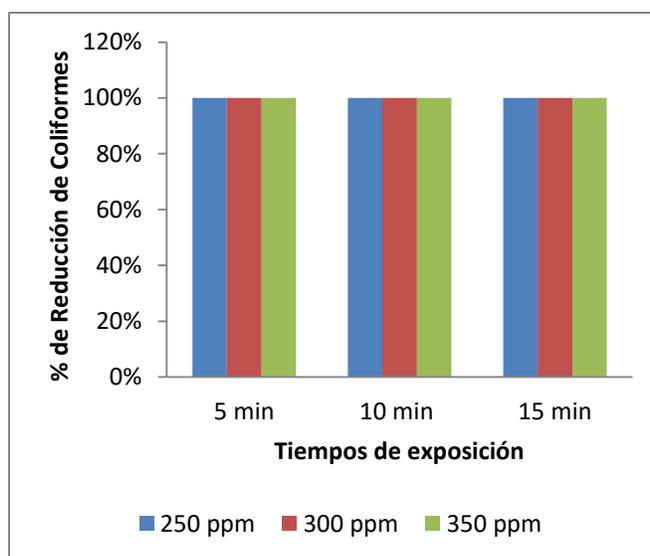
A.



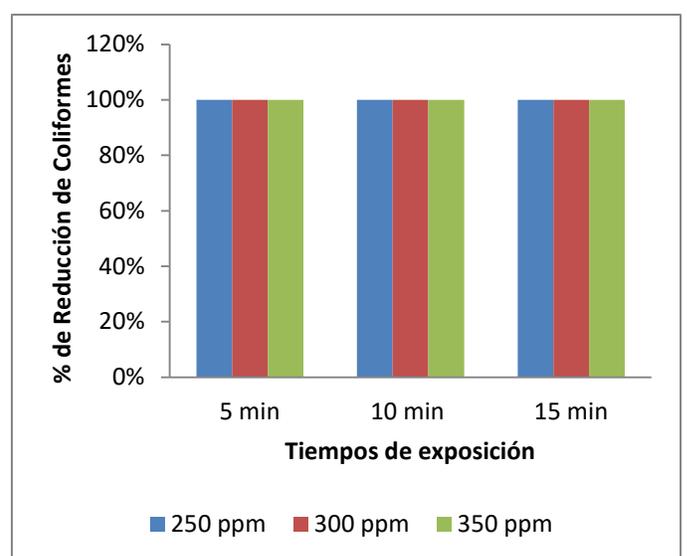
B.

Figura 2. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Citrosan y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

En la figura 2 se puede observar que el citrosan tuvo un comportamiento bueno frente a la reducción de los Coliformes, aunque en la dilución 10^{-6} no redujo totalmente a la población si se puede evidenciar que su efectividad se encuentra cerca al 100%. Recientemente el uso del Citrosan no ha sido muy evaluado en la industria láctea, pero se ha evidenciado que el uso de concentraciones superiores a los 1000 ppm han sido efectivas contra Coliformes y patógenos como *Salmonella* spp, en lechuga fresca y productos carnicos (Gomez, *et al.*, 2011).



A.



B.

Figura 3. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones y sus respectivos tiempos de exposición. A. Titán, Dilución 10^{-6} y 10^{-7} ; B. Pentaquat, Dilución 10^{-6} y 10^{-7} . El porcentaje de reducción en todos los tiempos y en todas las concentraciones a las 2 diluciones evaluadas fue del 100%.

El titán (ácido peracético) tiene un amplio espectro de acción en industrias alimenticias. Se ha usado principalmente para la eliminación bacterias y hongos en frutas y hortalizas, pero es también comúnmente usado en la planta de envasado de alimentos. El porcentaje de reducción frente a coliformes fue del 100%, como se observa en la figura 3 (A), su compuesto activo fue eficiente en la eliminación de estos microorganismos contaminantes (Piedrahita, *et al.*, 2009).

El mecanismo de acción de los "QUATS" principalmente va dirigido a las superficies celulares incrementando la permeabilidad membranal ocasionando así la pérdida de compuestos citoplasmáticos vitales. Es por ello que la acción del Pentaquat fue del 100% como se observa en la figura 3 (B), la reducción total de Coliformes (Bustamante & Vélez, 2014).

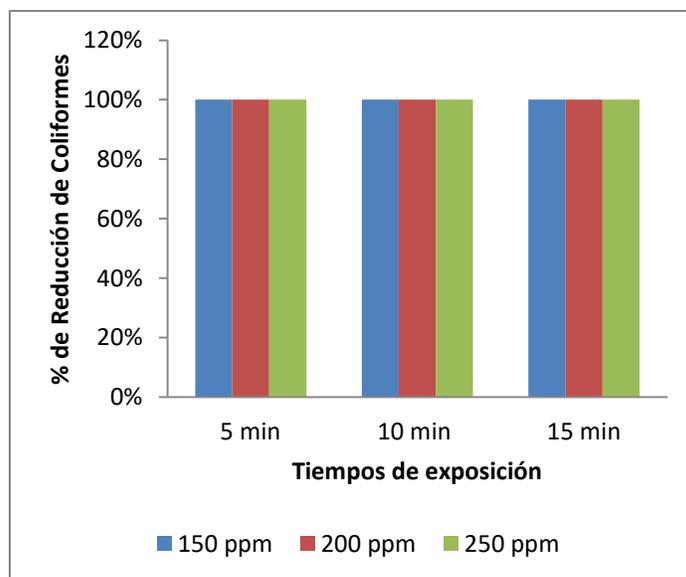


Figura 4. Porcentajes de reducción de Coliformes frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Hipoclorito y sus respectivos tiempos de exposición. La Reducción en las dos diluciones evaluadas (10^{-6} y 10^{-7}) fue igual, del 100%.

El cloro o Hipoclorito, tuvo un comportamiento efectivo contra Coliformes, redujo en su totalidad las cargas microbiológicas evaluadas. Se pudo evidenciar que en cualquiera

de las concentraciones evaluadas su espectro de acción es alto y que aún no se han generado resistencias a este desinfectante. El tiempo que se usa en planta para cada lavado es de 10 min, por tanto, la concentración estandarizada de 200 ppm por 10 min de exposición es la correcta para la eliminación de estos microorganismos en equipos, utensilios y superficies. En la eliminación de microorganismos el mecanismo de acción del cloro tiene efecto principalmente en las proteínas y en los ácidos nucleicos ya que inhibe las reacciones enzimáticas, desnaturaliza proteínas e inactiva los ácidos nucleicos, por ello su comportamiento frente a los coliformes fue óptimo.

7.4 Recuento en placa (UFC/ml), bacterias esporuladas:

Tabla 8. Recuento en placa de bacterias esporuladas, tiempo de exposición y concentraciones evaluadas de cada desinfectante.

Concentración desinfectantes	Diluciones		Tiempos de exposición								
			5 min		10 min		15 min				
			10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml			
Pentaquat (ppm)	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	5 min		10 min		15 min				
			10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml			
			250	324	45	<1	<1	<1	<1	<1	<1
			300	<1	<1	<1	<1	<1	<1		
350	<1	<1	<1	<1	<1	<1					
Citrosan (ppm)	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	5 min		10 min		15 min				
			10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml			
			950	324	45	98	12	64	8	46	28
			1000	74	7	71	11	70	13		
1050	62	9	82	13	96	7					
Peróxido (ppm)	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	5 min		10 min		15 min				
			10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml			
			300	324	45	234	32	90	28	84	36
			350	193	18	78	17	69	13		
400	76	12	57	6	61	10					
Titán (ppm)	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	5 min		10 min		15 min				
			10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml			
			250	324	45	92	28	95	36	80	34
			300	79	17	73	21	77	18		
350	65	9	51	10	67	6					
Hipoclorito (ppm)	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	5 min		10 min		15 min				
			10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml	10 ⁻⁶ UFC/ml	10 ⁻⁷ UFC/ml			
150			231	8	46	14	69	7			

200	324	45	145	5	53	10	62	7
250			72	3	20	7	50	6

7.4.1 Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas.

Tabla 9. Porcentajes de reducción, tiempos de exposición y concentraciones evaluadas frente bacterias esporuladas.

Concentración desinfectantes	Tiempos de exposición					
	5 min		10 min		15 min	
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}
Pentaquat (ppm)						
250	100%	100%	100%	100%	100%	100%
300	100%	100%	100%	100%	100%	100%
350	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Citrosan (ppm)						
950	73,33%	69,24%	71,11%	74,69%	37,77%	70,37%
1000	84,44%	77,16%	75,55%	78,08%	71,11%	78,39%
1050	80%	80,86%	82,22%	80,24%	84,44%	85,80%
Peróxido (ppm)						
300	28,88%	27,77%	37,77%	72,22%	20%	74,07%
350	60%	40,43%	62,22%	75,92%	71,11%	78,70%
400	73,33%	76,54%	86,66%	82,40%	77,77%	81,17%
Titán (ppm)						
250	37,77%	71,60%	20%	70,67%	24,44%	75,30%
300	62,22%	75,61%	53,33%	77,46%	60%	76,23%
350	80%	79,93%	77,77%	84,25%	86,66%	79,32%
Hipoclorito (ppm)						
150	82,22%	28,70%	68,88%	85,80%	84,44%	78,70%
200	88,88%	55,24%	77,77%	83,64%	84,44%	80,86%
250	93,33%	77,77%	84,44%	93,82%	86,66%	84,56%

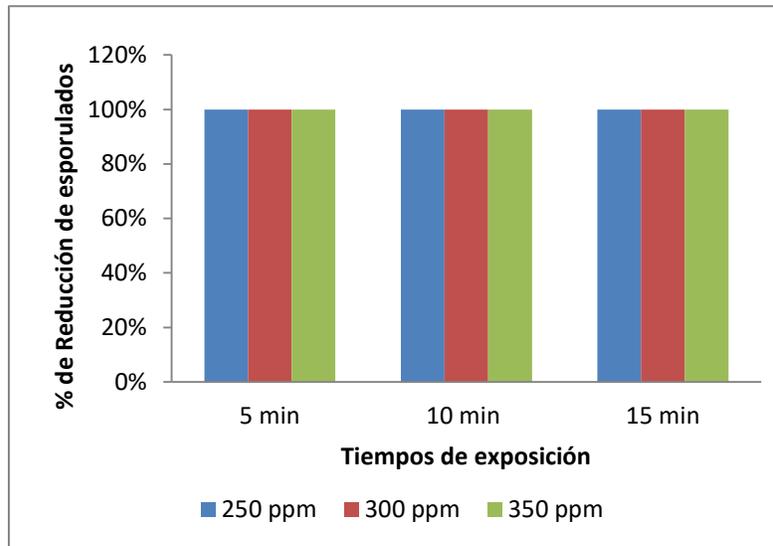
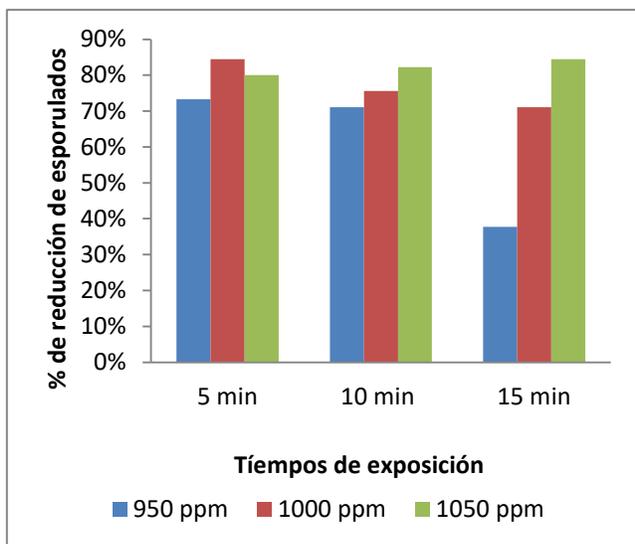
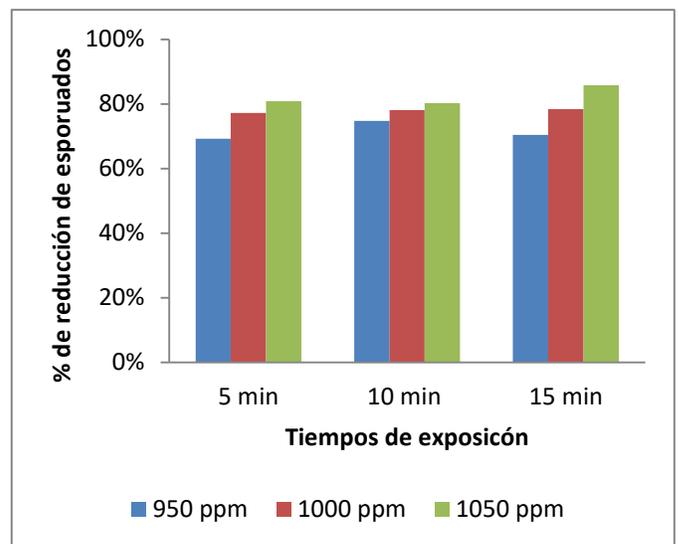


Figura 5. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Pentaquat y sus respectivos tiempos de exposición. La Reducción en las dos diluciones evaluadas (10^{-6} y 10^{-7}) fue igual, del 100%.



A.

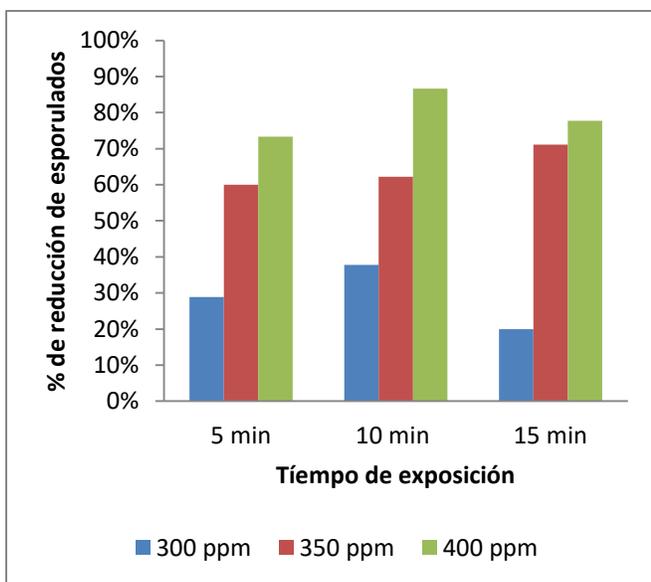


B.

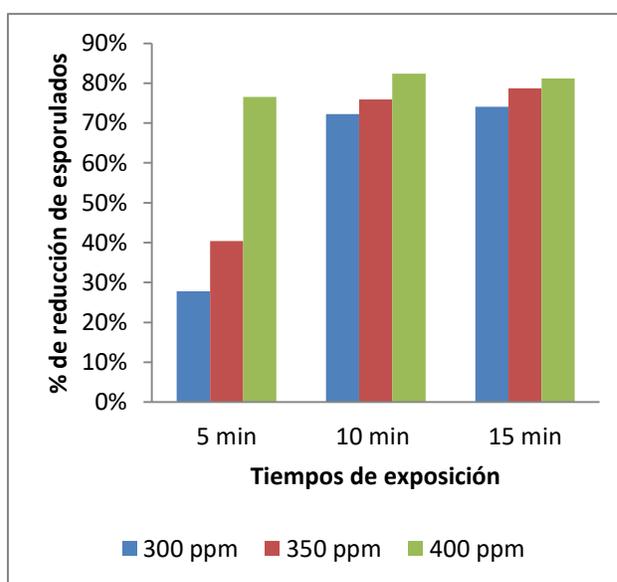
Figura 6. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Citrosan y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

Las bacterias esporuladas se caracterizan por su resistencia a condiciones extremas. En las plantas productoras de Leches UHT, los microorganismos esporulados son los que mayor problema representan puesto que resisten estas altas temperaturas de esterilización. En estas industrias la reducción de estos microorganismos desde el proceso de recepción de la leche es vital, por ello se deben implementar los lavados y desinfecciones de equipos aptos que reduzcan la probabilidad de supervivencia de estas bacterias que, aunque no son patógenas, no son permitidas según el decreto 616 del 2006. En las pruebas realizadas de esterilidad comercial, se encuentra que los recuentos actualmente de la planta son altos, lo que indica que hay una proliferación alta de la población. Se evaluó cada desinfectante con el fin de encontrar cuál de todos era el más efectivo contra estos microorganismos. En la figura 5 se puede observar que la efectividad del Pentaquat frente a estos microorganismos es del 100%, se redujo completamente la población de esporulados en todos los tiempos y concentraciones evaluados.

En la figura 6 se evidencia el comportamiento del citrosan frente a los esporulados, la reducción no fue del 100% pero si hubo una disminución considerable de la población bacteriana. El Citrosan tiene como ingrediente activo una mezcla balanceada de sanitizantes de origen natural como extracto de semillas de cítricos, y ácidos orgánicos lo que lo hace un desinfectante fungicida y bactericida., el cual se puede emplear directamente sobre los alimentos sin necesidad de enjuague; su mecanismo de acción sobre estos microorganismos esporulados es altamente oxidante, trabaja sobre el dióxido de carbono de la membrana celular dañando el citoplasma y la pared celular, impidiendo así la multiplicación bacteriana (Gómez, *et al.*, 2011). Por su alto espectro germicida reportado en la literatura se esperaban mejores resultados, un porcentaje de reducción del 100% pero se puede evidenciar que ya en estos microorganismos se están generando resistencias a este desinfectante.



A.

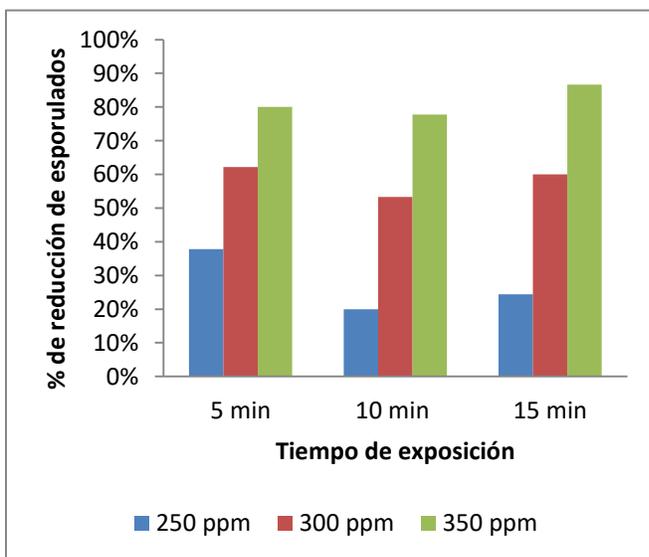


B.

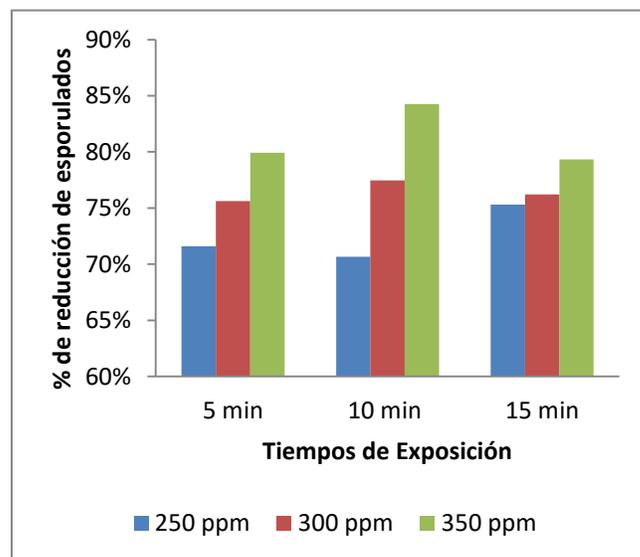
Figura 7. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Peróxido de hidrógeno y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

El peróxido de hidrógeno al ser un desinfectante versátil y de gran alcance es ampliamente usado en la industria de alimentos. En el ensayo los resultados obtenidos no fueron favorables, ya que la actividad frente a coliformes (Figura 1) y esporulados (Figura 7) no fue del 100%, si hubo una disminución de las poblaciones bacterianas, pero no una eliminación completa como se requiere en los procesos de limpieza y desinfección. Se evidencia que para las dos cepas evaluadas el aumento de la concentración a 400 ppm con un tiempo de exposición de 15 min nos permite eliminar la población por encima a un 70%, lo que indica que el proceso de desinfección actualmente empleado en la planta (350 ppm por 10 min) no es el adecuado y que se requiere evaluar una concentración mayor que cumpla con una reducción del 100% a los 10 min de exposición que es lo que exige la norma (NTC 5245) por tiempos de recirculación de desinfectantes (Shamila-Syuhada, *et al.*, 2015).

Según la FDA, el límite máximo permitido de peróxido de hidrógeno en los procesos de limpieza y desinfección es de 0,05% que equivale a 500 ppm (FDA, 2014). El peróxido de hidrógeno es considerado un desinfectante de nivel alto (III) ya que tiene más actividad esporicida que bactericida, pero en este caso su rendimiento no fue el ideal, así que se debe reevaluar el proceso de limpieza con peróxido y detectar el punto crítico que está afectando sus principios activos (Medina, *et al.*, 2008).



A.



B.

Figura 8. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Titán y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

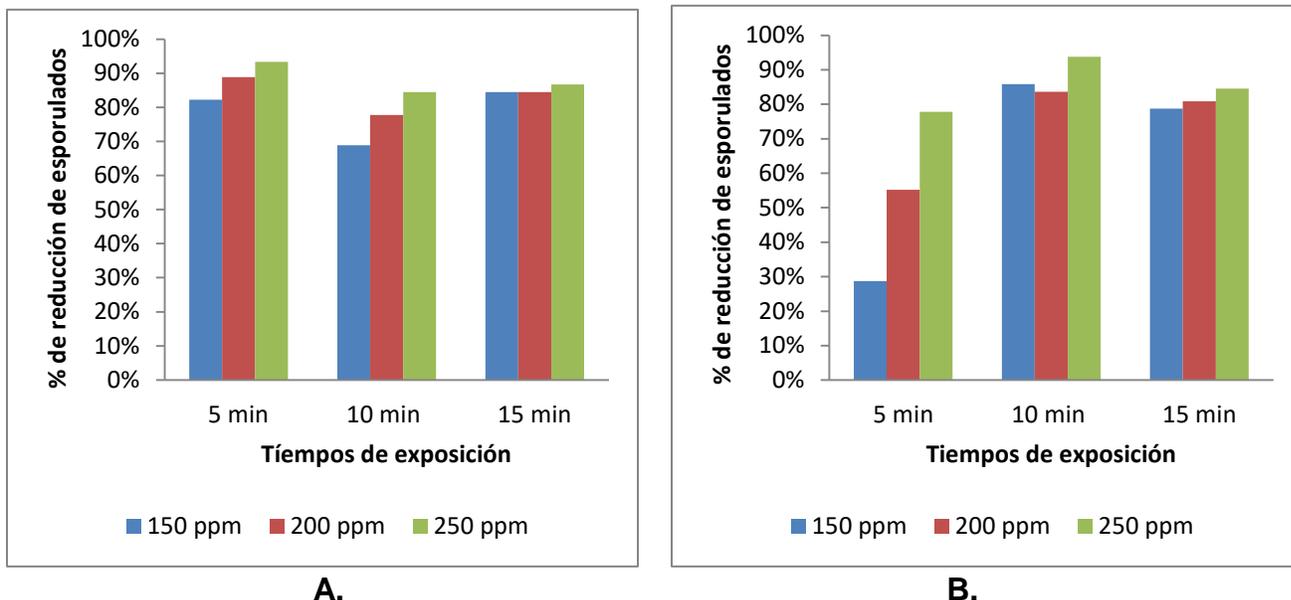


Figura 9. Porcentajes de reducción de bacterias esporuladas frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Hipoclorito y sus respectivos tiempos de exposición. A. Dilución 10^{-6} ; B. Dilución 10^{-7} .

El Titán (ácido Peracético) ha sido reportado como uno de los desinfectantes más efectivos contra esporas y endoporas bacterianas (Lowe, *et al.*, 2015). La reducción de esporulados arrojó mejores resultados cuando se empleó una concentración de 350 ppm a los 15 min de exposición, pero no hubo una reducción del 100% en la población (Figura 8) que era lo que se esperaba. El Titán o ácido Peracético es el desinfectante usado en los equipos UHT, por ende su importancia en el proceso de desinfección de la planta ya que estos equipos son los encargados de dar la garantía de esterilización de la leche lo cual podría ser una causa en el incremento de la población de esporulados a la hora de evaluar la esterilidad comercial del producto, por ello se hace indispensable reevaluar las concentraciones y los tiempos y encontrar un equilibrio en donde se reduzca totalmente esta población de esporulados (Leggett, *et al.*, 2016).

La reducción de la población de esporulados por causa de la exposición al hipoclorito mostró resultados no favorables pues no se alcanzó el 100% de reducción (Figura 9). Las esporas bacterianas son más resistentes, por ello se requieren tiempos de exposición más altos, aproximadamente de 20 min empleando concentraciones 10 a 100 veces mayores (Bustamante & Vélez, 2014).

7.5 Recuento en placa (UFC/gr) de la levadura:

Tabla 10. Recuento en placa de levaduras, tiempo de exposición y concentraciones evaluadas de cada desinfectante.

Concentración desinfectantes	Dilución	Tiempos de exposición		
		5 min	10 min	15 min
Pentaquat (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr
		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
250				
300				
350				
Citrosan (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr
		5904	2240	1396
		4215	2112	1187
		3512	1792	879
950				
1000				
1050				
Peróxido (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr
		8968	7589	6757
		7754	6998	6487
		7678	6809	5093
300				
350				
400				
Titán (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr
		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
250				
300				
350				
Hipoclorito (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr
		4234	<1	<1
		2897	<1	<1
		930	<1	<1
150				
200				
250				

7.5.1 Porcentajes de reducción de levaduras:

Tabla 11. Porcentajes de reducción, tiempos de exposición y concentraciones evaluadas frente a levaduras.

Concentracion desinfectantes	Dilución	Tiempos de exposición			
		5 min	10 min	15 min	
Pentaquat (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min	
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	
		250	100%	100%	100%
		300	100%	100%	100%
350	100%	100%	100%		
Citrosan (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min	
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	
		950	42,43%	78,15%	86,38%
		1000	58,90%	79,40%	88,42%
		1050	65,75%	82,52%	91,42%
Peróxido (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min	
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	
		300	12,55%	26%	34,11%
		350	24,39%	31,76%	36,74%
		400	25,13%	33,60%	50,34%
Titán (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min	
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	
		250	100%	100%	100%
		300	100%	100%	100%
		350	100%	100%	100%
Hipoclorito (ppm)	10⁻⁴ UFC/gr	5 min	10 min	15 min	
	10256	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	10⁻⁴ UFC/gr	
		150	58,71%	100%	100%
		200	71,75%	100%	100%
		250	90,93%	100%	100%

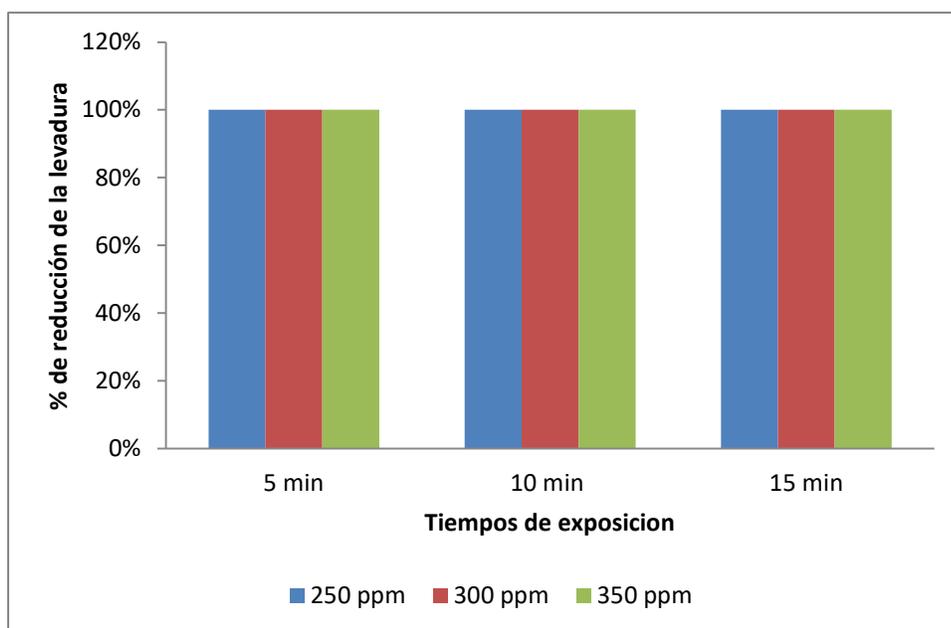


Figura 10. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Pentaquat y Titán y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

En 2014, Diana Cabrera en su trabajo sobre la investigación y control de levaduras en una línea de producción de bebidas obtuvo como resultados empleando el ácido Peracético como desinfectante en el sistema CIP, una reducción total de levaduras en concentraciones de 100 y 200 ppm empleando 10 min de exposición que es lo recomendable por el proveedor (Cabrera & Rosales, 2014), lo cual concuerda con los resultados obtenidos ya que hubo una reducción del 100% de la levadura en las 3 concentraciones y tiempos evaluados como se observa en la figura 10, lo que indica que el compuesto activo del desinfectante es óptimo para la eliminación total de estos contaminantes y que aun el rango de concentración del desinfectante utilizado actualmente en la planta permite tener la certeza de que no se generaran resistencias si se emplea adecuadamente.

En cuanto a la reducción de la levadura empleando pentaquat se obtuvo una reducción del 100% como se observa en la figura 10. Luna *et al.*, en 2012 reportaron en su estudio que la efectividad del Pentaquat para mohos y levaduras fue del 89.47% (Luna, *et al.*, 2012). En este trabajo el porcentaje de reducción fue del 100%, el comportamiento del Pentaquat frente a la levadura fue mucho mejor que el estudio antes mencionado.

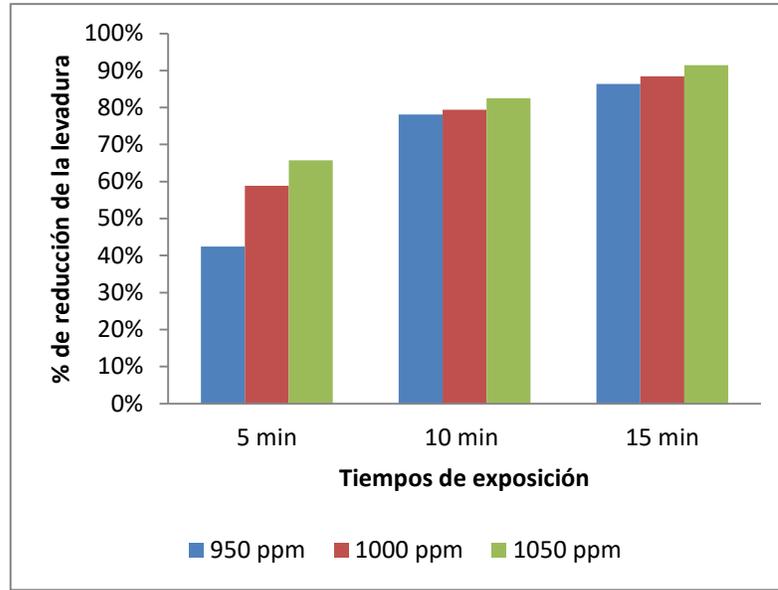


Figura 11. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Citrosan y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

Como se observa en la figura 11 el comportamiento del citrosan en la reducción de las levaduras no fue efectivo, no se redujo en un 100% la población. La concentración y el tiempo actualmente utilizado en la planta de 1000 ppm por 10 min debe ser reevaluado, y cabe tener en cuenta que para lograr una eficacia total se debería usar una concentración por encima de las 1050 ppm que se usó en este ensayo hasta lograr eliminar la población totalmente a los 10 min como se ve en el comportamiento con el Pentaquat o el Titán.

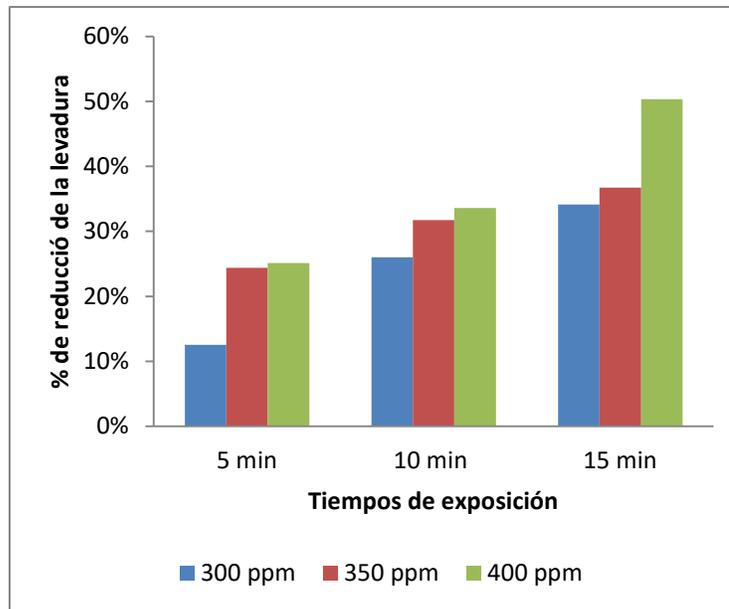


Figura 12. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Peróxido de hidrógeno y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

Las concentraciones usadas de peróxido no fueron efectivas contra la levadura, en la figura 12 se observa que el mayor porcentaje de reducción se logró a 400 ppm por 15 min de exposición y fue tan solo del 50%. En la mayoría de industrias alimentarias emplear el peróxido en concentraciones mayores a las que aquí se evaluaron y a la que se usa en la planta. El peróxido de hidrógeno normalmente se aplica a concentraciones del 2% (p/p), por contacto o baño, por pulverización o nebulización, en sistemas de limpieza y desinfección química in situ (CIP) instaladas en envasadoras asépticas de alimentos. Price *et al.*, en 2007 evaluaron procesos convencionales de desinfección frente a una desinfección con peróxido de hidrógeno al 10% en una planta de producción de vegetales frescos y obtuvieron resultados de reducciones del 100% para coliformes, aerobios mesófilos y levaduras (Price, *et al.*, 2007).

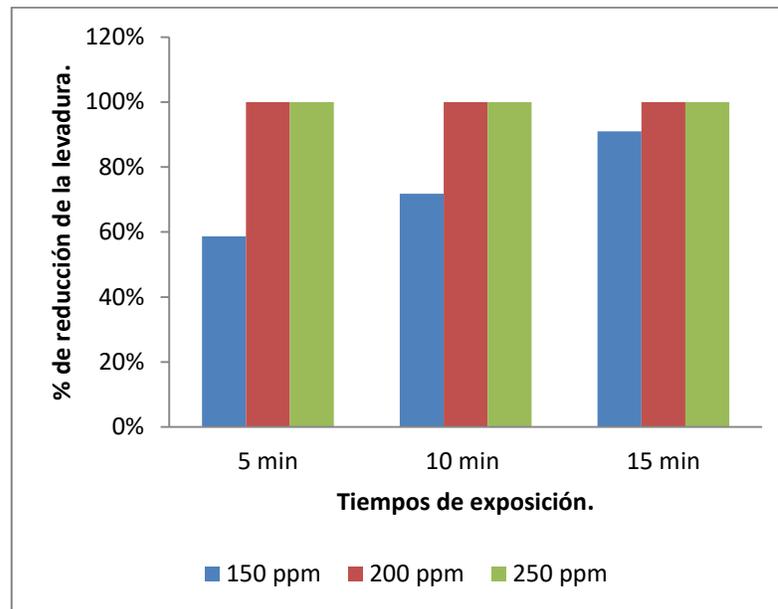


Figura 13. Porcentajes de reducción de levaduras frente a las diferentes concentraciones evaluadas de Hipoclorito y sus respectivos tiempos de exposición (Dilución 10^{-4}).

Para el tratamiento de las levaduras, la concentración y el tiempo empleado actualmente en la planta de hipoclorito es el adecuado ya que se redujo 100% la población como se observa en la figura 13, una reducción a partir de los 10 min en las concentraciones de 200 y 250 ppm. El hipoclorito empleado en la planta no se está preparando a la concentración que se debe manejar, no se tiene un control de concentraciones iniciales de las soluciones lo que ha llevado a usarlo de la manera errónea, lo cual pudo ser una causa de la resistencia que se vio reflejada en las cepas de esporulados.

8. CONCLUSIONES

En la planta actualmente se evalúan en su totalidad todos los parámetros exigidos por el decreto 616 de 2006.

El plan de limpieza y desinfección actualmente usado en la planta cuenta con algunos de los procedimientos exigidos por la norma, pero no se llevan a cabo todas las recomendaciones que esta exige para estos planes de saneamiento.

Los procedimientos de análisis microbiológicos establecidos en la planta no son los correctos, no se están llevando a cabo los protocolos exigidos por la normativa colombiana.

En la evaluación de los desinfectantes el Pentaquat fue el que mejor rendimiento tuvo ya que inhibió completamente a los Coliformes, esporulados y a la levadura en todas las concentraciones y tiempos evaluados. Su espectro de acción es amplio, y se vio reflejado en efectividad ya que desde la mínima concentración evaluada al mínimo tiempo de exposición mostro reducciones del 100% de las poblaciones.

El peróxido de hidrógeno no tuvo rendimientos del 100% con ninguna de las cepas evaluadas, es necesario reevaluar concentraciones mayores.

El Titán, al ser el desinfectante con mayor acción esporicida se esperaba que tuviera resultados de reducción del 100%, pero al no lograrse este porcentaje se debe tener en cuenta que ya existen resistencias por parte de las bacterias esporuladas presentes en la leche UHT.

Al evaluar la concentración del hipoclorito de uso diario en la planta (concentración normal 200 ppm), se encontró que estaba más concentrada, aproximadamente 500 ppm, lo cual ha conllevado a la pérdida de la efectividad antibacteriana de este desinfectante.

9. RECOMENDACIONES

Implementar las mejoras de los procedimientos de los manuales de análisis microbiológicos y de limpieza y desinfección.

Reevaluar las concentraciones de los desinfectantes que permitan reducir a los 10 min de exposición la población bacteriana en un 100% o al menos por encima del 90%. Si es posible buscar otras alternativas de desinfectantes que reemplacen aquellos que ya no tengan efectividad en el proceso de limpieza y desinfección de la planta.

Para el uso del peróxido de hidrógeno es recomendable evaluar concentraciones del 1% y 2% que es lo que se reporta en la literatura para industrias de alimentos (Shamila-Syuhada, *et al.*, 2015).

Es recomendable verificar la concentración inicial en la que se reciba el hipoclorito por parte del proveedor y reformular la preparación de las diluciones cuando sea necesario ya que esto es un agente causal de resistencias microbianas.

Respetar los ciclos de lavado y no continuar producción sin haber llevado a cabo el cronograma de limpieza y desinfección cada vez que sea necesario. De igual forma el mantener las líneas de proceso diferenciadas para cada tipo de leche es necesario, y establecerla para aquellas leches larga vida (entera y deslactosada 80 días) una línea de proceso y para la leche media vida preferiblemente establecer otra línea de proceso para evitar el aumento de esporulados por recontaminaciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Beltran, C. A., Valenzuela, A. A., Marin, Y. I., Holguin, M. & Sanabria, N. (2014). *Evaluación del sistema de limpieza y desinfección de la empresa productos de Antaño S.A.* Bogota D.C.
- Benesh, D-A., (2012). *International Dairy Journal*, 25, 147-149.
- Bernier, I., Cárdena, E. & Piñeros, O. A. (2012). *Bacillus sporothermodurans anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia.* Alimentos hoy, 21(27), 126-138.
- Bravo, F. (2004). *El manejo higienico de los alimentos / Hygiene Handling of Food.* Mexico: Editorial Limusa.
- Bustamante, M. S. & Vélez, L. M. (2014). *Avances en los sistemas de limpieza y desinfección aplicados en la industria alimentaria.* Universidad Pontificia Bolivariana, 11-21.
- Cabrera, D. & Rosales, M. F. (2014). *Investigación y control de levaduras en una línea de producción de bebidas.* Ecuador.
- Duarte-Vázquez, M. Á., García-Ugalde, C., Villegas-Gutiérrez, L. M., García-Almendárez, B. E. & Rosado, J. L. (2017). *Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition.* Foods, 6(50), 1-15.
- Early, R. (2000). *Tecnología de los productos lacteos.* 11-40.
- FDA. (2014). *Code of Federal Regulations Title 21, Part 184, and Section 184.1366: Hydrogen peroxide (21 CFR 184.1366).* FDS.
- Frazier, W. C. & Westhoff, D. C. (1993). *Microbiología de los alimentos.* Acribia S.A, 4, 680.
- Gómez Álvarez, L. M., Jaimes Suárez, S. & Montes Álvarez, J. (2011). *Evaluación de un producto a base de ácidos orgánicos frente a E.coli y Salmonella spp, en la desinfección de lechuga fresca.* INTAL, 20-21.

- Guerrero, J. A., Folleco Villarreal, A. E., Acosta Amador, N. M. & Montaña, L. A. (2016). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Agua*. Instituto Nacional de Salud.
- Hernandez, V. & Leon, L.(2008). *Elaboracion y actualizacion de los procedimientos operativos estandar no certificados por el ICA del laboratorio de microbiologia ambiental y de suelos de la pontifica universidad Javeriana*. Pontificia Universidad Javeriana, 1-69.
- Lácteos La Esmeralda. (30 de 06 de 2017). Recuperado el 31 de 08 de 2017, de <http://lacteoslaesmeralda.com/laesmeralda/>
- LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D. & Lee, R. G. (2017). *Inactivation of Biofilm Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2492-2499.
- Leggett, M. J., Schwarz, J. S., Burkec, P. A., McDonnell, G., Denyer, S. P., & Maillard, J-Y. (2016). *Mechanism of Sporicidal Activity for the Synergistic Combination of Peracetic Acid and Hydrogen Peroxide*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1035-1039.
- Luna, M., Valero, J. C. & Martínez, K. (2012). *Evaluación de la efectividad del pentaquad y triclohand comercializados por tecnas en el control de la carga microbiana presente en los manipuladores y superficies de los restaurantes*. *Orugas*, 1-12.
- March, J. K., Pratt M. D., Lowe, C. W., Cohen, M. N., Satterfield, B. A., Schaalje, B., O'Neill, K. L. & Robison, R. A. (2015). *The differential effects of heat-shocking on the viability of spores from Bacillus anthracis, Bacillus subtilis, and Clostridium sporogenes after treatment with peracetic acid- and glutaraldehyde-based disinfectants*. *Microbiology Open*, 4(5), 764–773.
- Medina, L. K., Valencia, L. L., Tarazona, G. P., Palacios, J. A. & Pinzon Bello, M. (2008). *Evaluacion de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peroxido de hidrógeno empleado, en la esterilizacion de dispositivos e instrumentos hospitalarios*. Pontificia Universidad Javeriana, 1-88.
- Mejía Jijón, R. P. & Tapia Hinojosa, M. P. (2004). *Desarrollo del sistema HACCP en el proceso de ordeño y recolección de fincas proveedoras de leche exclusivamente para elaboración de leche UHT en la planta de lácteos Parmalat-Lecocem*. Escuela Politécnica del ejército, 25-35.

- Mercado, M., González, V., Rodríguez, D. & Carrascal, A. K. (05 de 2014). *Perfil sanitario nacional de leche cruda para consumo humano directo*. Recuperado el 29 de 08 de 2017, de Ministerio de Salud y protección para social: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/Perfil-sanitario-nacional-leche-cruda.pdf>
- Minbiole, K., Jennings, M., Ator, L., Black, J., Grenier, M., LaDow, J., Caran, K., Seifert, K. & Wuest, W. (2016). *From antimicrobial activity to mechanism of resistance: the multifaceted role of simple quaternary ammonium compounds in bacterial eradication*. *Tetrahedron*, 72, 3559e3566.
- MinSalud. (28 de 02 de 2006). *DECRETO 616*. Recuperado el 27 de 08 de 2017, de Ministerio de salud y protección social: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=21980>
- NTC 4433. (18 de 02 de 2015). *Norma Técnica Colombiana 4433 (Método para evaluar la esterilidad comercial)*. Obtenido de Icontec: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC4433.pdf>
- NTC 4939. (30 de 05 de 2001). *Norma Técnica Colombiana 4939 (Enumeración de coliformes y Escherichia coli. Técnica con tubos de fermentación y técnica de sustrato enzimático)*. Obtenido de Icontec: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC4939.pdf>
- NTC 5245. (25 de 02 de 2004). *Norma Técnica Colombiana 5245 (Prácticas de limpieza y desinfección para plantas y equipos utilizados en la industria láctea)*. Obtenido de Icontec: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC5245.pdf>
- NTC 5698. (19 de 08 de 2009). *Norma Técnica Colombiana 5698 (Metodo horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (Aw) superior a 0,95)*. Obtenido de Icontec: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC5698-1.pdf>
- OMS. (Diciembre de 2015). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Inocuidad de los alimentos : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- Piedrahita, J. H., Suárez, D. E. & Ortega, A. F. (2009). *Diseño conceptual de una planta de producción de ácido peracético a partir de peróxido de hidrógeno y ácido acético*. EAFIT, 20-25.

- Price, A.V., Ferrandini, E., López, M.B, Garrido, M.D. & Laencina, J. (2007). *Utilización de peróxido de hidrógeno en la higiene de instalaciones y equipos de Tratamiento de Vegetales Frescos*. V Congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones, 959-963.
- Rivas E., J. L. & Bernal E., J. C. (2014). *Procedimiento para el seguimiento y control del proceso de limpieza y desinfección de la planta Alival S.A*. Universidad de San Buenaventura, 1-83.
- Secretaría Distrital de Salud. (07 de 02 de 2001). Resolución 0127 de 2001. Alcaldía de Bogotá, D.C. Obtenido de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=12945>
- Serrano, G. (2005). *Fortaleza de la cadena lactea Colombiana*. Linea y Media LTDA, 1, 7.
- Shamila-Syuhada, A. K., Chuah, L.-O., Wan-Nadiah, W.A., Cheng, L.H., Alkarkhi, A.F.M., Effarizah, M.E. & Rusul, G. (2015). *Inactivation of microbiota and selected spoilage and pathogenic bacteria in milk by combinations of ultrasound, hydrogen peroxide, and active lactoperoxidase system*. International Dairy Journal, 1-27.
- Simpson, R., Jiménez P., M., Vega F., M., Romero M., A. & Costa, M. (2000). *Evaluación de leches UHT comerciales y optimización del proceso industrial*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 50(4), 353-360.
- Vázquez-Ojeda, E., Pérez-Morales, E., Hurtado-Ayala, L. & Alcántara-Jurado, L. (2014). *Evaluación de la calidad microbiológica de la leche*. Revista Iberoamericana de Ciencias, 1(3), 91-99.

Anexo 1

11. ANEXOS

	LACTEOS LA ESMERALDA S.A.S.		CÓDIGO T-LM-004	
	TECNICAS DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO		Página 58 de 88	Versión: 1.0
	ENUMERACIÓN DE COLIFORMES Y <i>Escherichia coli</i> . TÉCNICA CON TUBOS DE FERMENTACIÓN Y TÉCNICA DE SUSTRATO ENZIMÁTICO (NTC 4939).		Fecha: 02/11/2017	
Naturaleza del cambio	Realizado por: Control de Calidad	Revisado por: Ruth Montañez	Aprobado por: Gerencia	

1. FUNDAMENTO

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa.

1. OBJETIVO

Establecer el proceso para el análisis de la presencia de coliformes fecales.

2. ALCANCE

Para recuento de coliformes fecales en producto terminado, insumos, materia prima o cualquier otro producto.

3. DEFINICIÓN

Para los propósitos de este método se aplican las siguientes definiciones:

- **Coliformes:** bacterias Gram negativas que a temperaturas específicas entre $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, causan la fermentación de la lactosa.
- **Dilución:** Resultado de diluir una muestra en determinada sustancia.
- **Siembra microbiológica:** Es la acción de colocar una alícuota del alimento a analizar, por medio de una pipeta o asa estéril en un medio de cultivo (Agar) específico para que un microorganismo pueda multiplicarse, luego se dan las condiciones de temperatura y tiempo indicados para obtener un resultado de presencia o ausencia de éste en dicho alimento.

- **Medio de Cultivo:** Producto que contiene nutrientes específicos preparados artificialmente con control pH, temperatura, humedad, valores fisiológicos y osmóticos óptimo; Para permitir el crecimiento de un microorganismo específico.
- **Muestra Aséptica:** Producto libre de contaminación biológica.
- **Suspensión:** Cantidad de alimento disuelto en agua peptona para formar una solución uniforme entre estos dos componentes.
- **Validez:** El resultado de una siembra microbiológica que comprueba la inocuidad de un alimento y la efectividad del proceso térmico, de envasado y aplicación de buenas prácticas higiénicas durante todas las etapas del proceso que garantizan la comercialización de dicho producto.

4. ROLES Y RESPONSABILIDADES

Jefe de Calidad: Definir y efectuar los procedimientos para aplicar las diferentes pruebas microbiológicas a la materia prima, insumos, material de empaque y producto terminado. También revisar y analizar los resultados de las siembras microbiológicas que le permita tomar medidas correctivas y/o preventivas.

Analista de Control de Calidad: Realizar la siembra microbiológica para la materia prima, insumos, materiales de empaque y producto terminado de acuerdo al Plan de Muestreo establecido, con una adecuada preparación previa de área, equipos, materiales y ambientes que aseguren los resultados obtenidos.

5. MATERIALES

- Caldo Brillante a concentración sencilla estéril.
- Caldo Brillante a concentración doble estéril.
- Muestra a analizar.
- Pipetas estériles.
- Frasco shot estéril.
- Mechero

7. PRINCIPIO

7.1 Identifique el área de la cual se tomará la muestra y en un frasco shot previamente esterilizado "*Ver técnica T-LM-001*" tome la muestra de agua, teniendo en cuenta:

- Esterilizar con alcohol y un mechero la boquilla de la llave y superficies cercanas a esta.
- Dejar salir el agua durante aproximadamente 1 minuto.

- Flamear la boca del frasco en cuanto se destape e inmediatamente antes de cerrarlo.

7.2 Asperje sus manos con alcohol y agítelas hasta que este se evapore, realice el mismo proceso en el ambiente del área.

NOTA: A medida que agregue la muestra a cada uno de los tubos flamee la boca y la tapa del mismo al destapar y antes de tapar cada tubo.

7.3 PRUEBA PRESUNTIVA

Inoculación de quince tubos con medio selectivo líquido, con serie de cinco tubos con 10 ml, 1,0 ml y 0,1 ml de muestra de ensayo respectivamente o diez tubos con medio selectivo líquido con 10 ml de la muestra de ensayo o inoculación de 5 tubos con medio selectivo líquido con 20 ml de la muestra de ensayo.

- Incubación a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ de los tubos inoculados durante 24 h a 48 h y análisis de estos tubos.

7.4 PRUEBA CONFIRMATIVA

Aislamiento de la serie de tubos en los cuales se haya observado formación de gas y acidez en medio líquido para confirmación.

7.4.1 Incubación a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ durante 24 h.

7.4.2 Cálculo del número más probable de coliformes por 100 ml de muestra (es decir el NMP), a partir del número de tubos que muestren formación de gas, usando una tabla para determinación de números más probables.

7.4.3 Para establecer la presencia de coliformes y establecer una carta de control de calidad, se utiliza el ensayo completo sobre al menos el 10 % de los tubos confirmados.

7.4.4 Simultáneamente se inoculan en Caldo bilis verde brillante lactosa para coliformes totales y caldo EC para coliformes fecales o EC+MUG para E. coli a $44,5\text{ °C}$. Los resultados de la prueba indican un ensayo completo.

7.4.5 Asépticamente una placa de agar Endo o agar MacConkey por cada tubo de media verde brillante lactosa bilis que ha producido gas; se realiza la operación lo antes posible tras la detección del gas.

7.4.6 Se incuban las cajas invertidas a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

7.4.7 Las colonias que se desarrollan en el agar Endo pueden definirse como típicas

(rosas a rojo oscuras con un brillo verde metálico superficial) o atípicas (rosas, rojas, blancas o incoloras sin brillo) a las 24 h de incubación.

- 7.4.8** Las colonias típicas de la fermentación de la lactosa desarrolladas sobre el agar MacConkey son rojas y pueden estar rodeadas por una zona opaca de precipitado biliar.
- 7.4.9** Se toma de cada caja una o más colonias típicas bien definidas o, si no existen, dos o más entre las que se consideren como probablemente formadas por microorganismos del grupo de coliformes y se las pasa a un tubo de fermentación con medio de Lauril Triptosa y agar nutritivo.
- 7.4.10** Se incuban los tubos con el medio (medio líquido de lauril triptosa con campanas Durham de fermentación invertidos) a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$; si no se produce gas en este período se prolonga la incubación hasta $48\text{ h} \pm 3\text{ h}$.
- 7.4.11** Se estudian microscópicamente las preparaciones teñidas con Gram y obtenidas en los cultivos de agar nutritivo a las 24 h, correspondientes a los tubos secundarios que muestren gas.

8. SIEMBRA EN TUBO N.M.P PARA PRODUCTO TERMINADO

8.1 MATERIALES

- 9 tubos con caldo brilla a concentración sencilla estéril.
- 2 tubos con agua peptona al 1% estéril.
- Muestra a analizar.
- Pipetas estériles.
- Frasco shot estéril.
- Mechero.

8.2 TECNICA

- 8.2.1** Diríjase a la cámara de siembra y asperje el área con alcohol al igual que sus manos.
- 8.2.2** Prepare la muestra "*Ver Técnica T-LM-002*"
- 8.2.3** Con una pipeta estéril adicione 1ml de muestra a uno de los tubos que contiene agua peptona estéril y homogenícela, obteniendo así una **dilución de 10^{-1}** .
- 8.2.4** Con una segunda pipeta estéril tome 1ml de la dilución de 10^{-1} y adiciónelo en el segundo tubo dispuesto con agua peptona, obteniendo así una **dilución de 10^{-2}** .

- 8.2.5** Posteriormente tome tres tubos contenidos de caldo brilla estéril y adicione a cada tubo 1ml de la muestra.
- 8.2.6** Seguidamente tome los tres tubos siguientes contenidos de caldo brilla y adicione cada uno 1ml de la **dilución de 10^{-1}** .
- 8.2.7** Finalmente tome los últimos tres tubos contenidos de caldo brilla y adicione a cada uno 1ml de la **dilución 10^{-2}** .

NOTA: Flamee la boca y la tapa de los tubos luego de destaparlos y antes de cerrarlos.

- 8.2.8** Deseche las diluciones realizadas y ubique los tubos contenidos con caldo brilla en una gradilla o un beaker e incúbelos a 36°C durante 24 horas.
- 8.2.9** Transcurrido el periodo de incubación saque los tubos y observe la producción de gas.

9. PRUEBA DE MAC-KENZIE

- 9.1** A partir de los tubos positivos, con producción de gas, transferir de cada tubo una asada de cultivo en:
- a.** Caldo lactosado bilis verde brillante al 2% conteniendo un tubo de fermentación de Durham.
 - b.** Caldo Triptófano.
- 9.2** Mezclar suavemente los tubos e incubarlos a 44.5°C \pm 0.5°C por 48 horas, en baño de agua con rotación, teniendo cuidado de que el nivel de agua del baño sobrepase el nivel del medio de cultivo.
- 9.2.1** Leer la prueba de Mac-Kenzie de la siguiente manera:
- a.** Observar la producción de gas en el caldo lactosado bilis verde brillante al 2%.
 - b.** Revelar el caldo triptófano, de los tubos de gas positivo, adicionando 0.2ml del reactivo de Kovac's, agitar suavemente y observar la presencia de un anillo rojo cereza en la superficie de la capa del alcohol amílico indicando la presencia de Indol cuando la prueba es positiva o el color original del medio cuando la prueba es negativa.

9.2.2 Considerar como coliformes de origen fecal los que demuestren positividad en ambas pruebas: gas positivo e Indol positivo.

10. INTERPRETACIÓN

La presencia de tubos positivos en caldo bilis verde brillante pero negativos en caldo EC o EC+MUG indican la presencia de coliformes no fecales.

Expresión de resultados

Combinación de positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de confianza del 95 % (aproximados)	
		Superior	Inferior
0-0-0	<2	-	-
0-0-1	2	1,0	10
0-1-0	2	1,0	10
0-2-0	4	1,0	13
1-0-0	2	1,0	11
1-0-1	4	1,0	15
1-1-0	4	1,0	15
1-1-1	6	2,0	18
1-2-0	6	2,0	18
2-0-0	4	1,0	17
2-0-1	7	2,0	20
2-1-0	7	2,0	21
2-1-1	9	3,0	24
2-2-0	9	3,0	25
2-3-0	12	5,0	29
3-0-0	8	3,0	24
3-0-1	11	4,0	29
3-1-0	11	4,0	29
3-1-1	14	6,0	35
3-2-0	14	6,0	35
3-2-1	17	7,0	40
4-0-0	13	5,0	38
4-0-1	17	7,0	45
4-1-0	17	7,0	46
4-1-1	21	9,0	55
4-1-2	26	12	63
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80

Combinación de positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de confianza del 95 % (aproximados)	
		Superior	Inferior
5-0-0-	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	580
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	>1600	-	-

Nota: En dado caso de presentar producción de gas en alguno de los tubos avisar a su jefe inmediato.

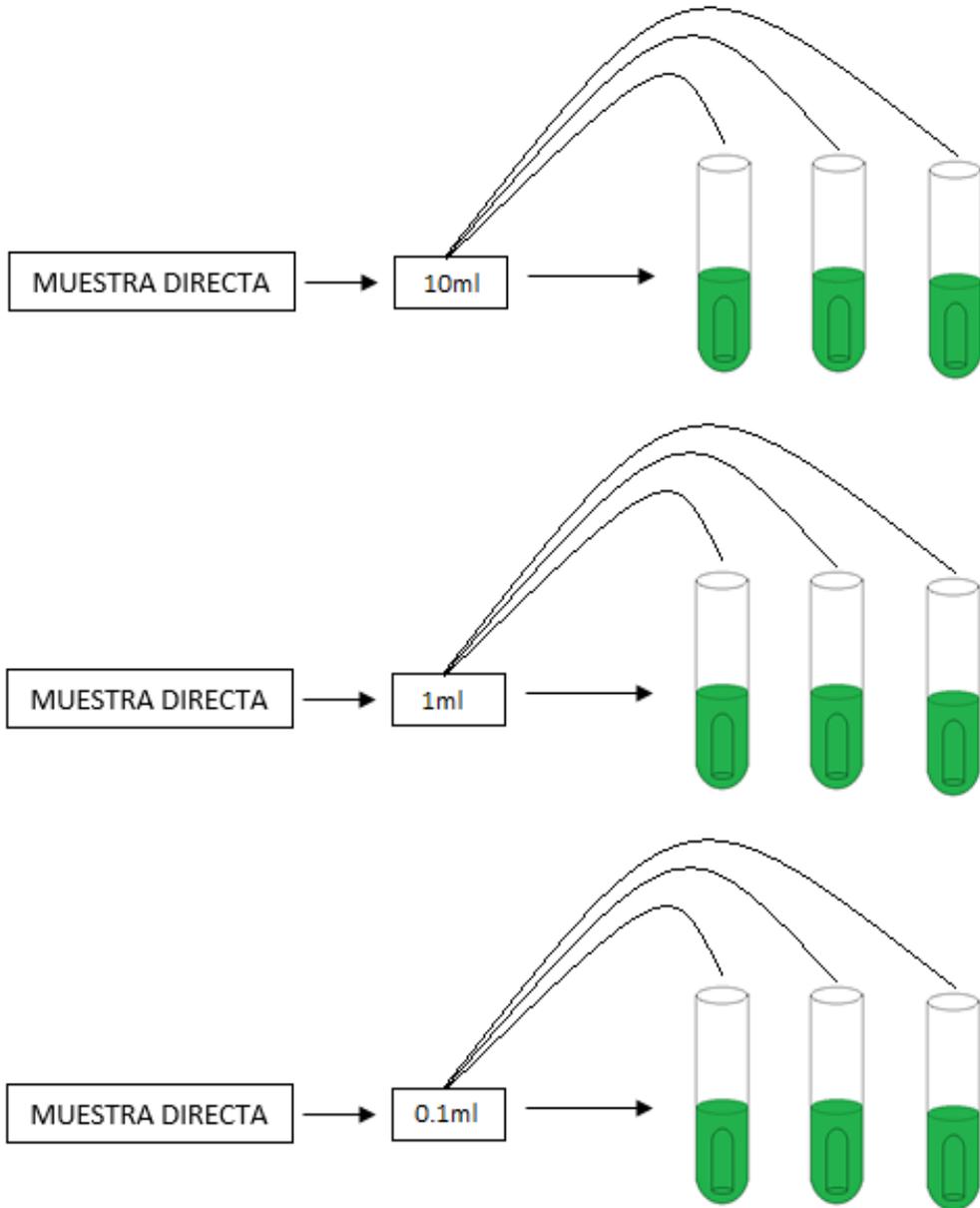
11. REGISTRO

Reporte resultados análisis microbiológicos "Código del formato"

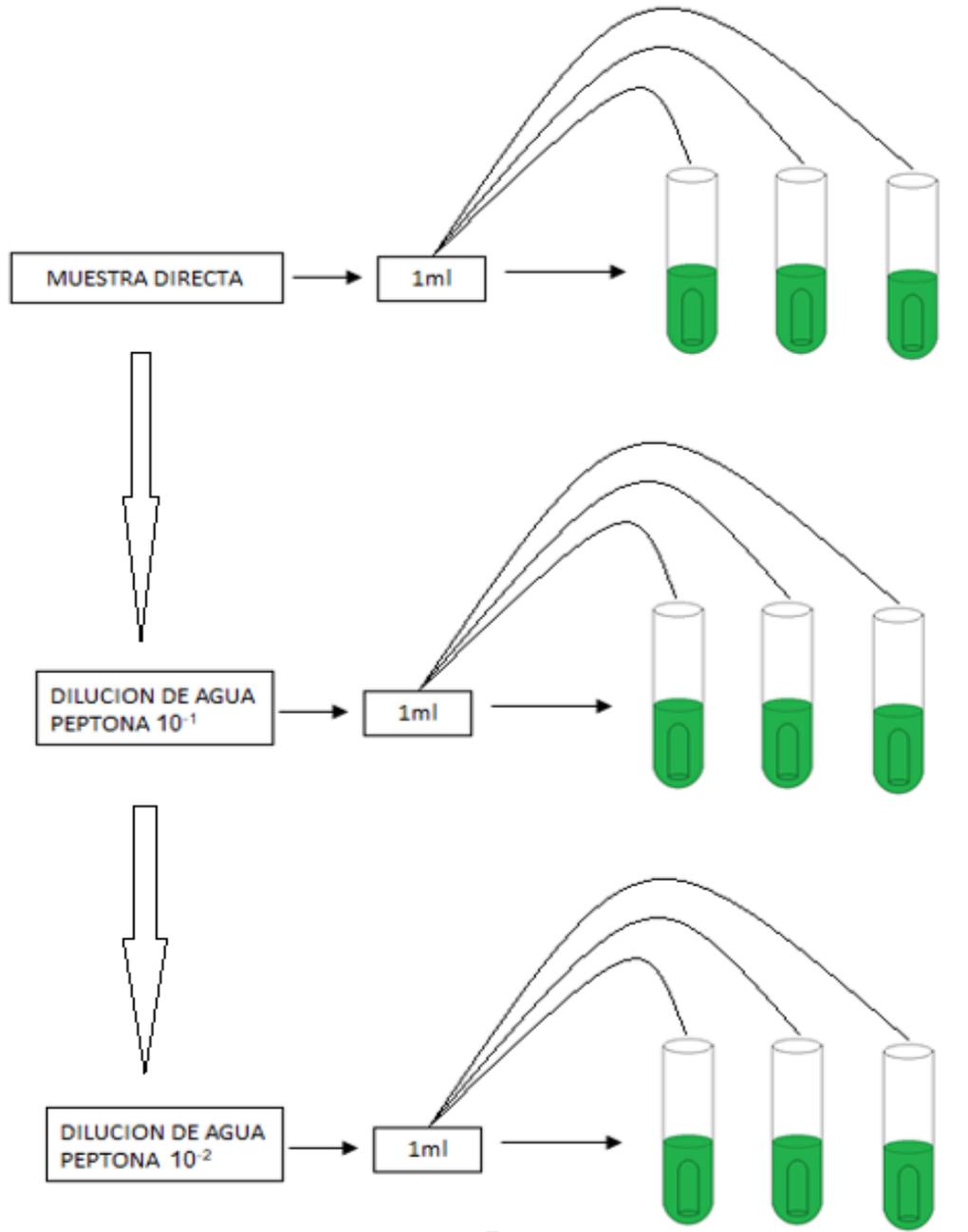
12. FRECUENCIA

Siempre que se requiera el análisis microbiológico de coliformes fecales por N.M.P para agua y/o producto terminado.

ESQUEMA GRAFICO DE SIEMBRA EN TUBO N.M.P PARA AGUA



ESQUEMA GRAFICO DE SIEMBRA EN TUBO N.M.P PARA PRODUCTO TERMINADO



Anexo 2

	LACTEOS LA ESMERALDA S.A.S.		CÓDIGO T-LM-004	
	TECNICAS DE ANALISIS MICROBIOLOGICO		Página 68 de 88	Versión: 1.0
	DETERMINACIÓN DE LA ESTERILIDAD COMERCIAL Y LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS VIABLES EN ALIMENTOS ESTERILES (NTC 5750).		Fecha: 02/11/2017	
Naturaleza del cambio	Realizado por: Control de Calidad	Revisado por: Ruth Montañez	Aprobado por: Gerencia	

- La esterilidad comercial establece el procedimiento para determinar si los alimentos envasados en envases o bolsas, herméticamente cerrados, cumplen con los requisitos de esterilización comercial a los que se sometieron y se aplica a todos aquellos alimentos catalogados como comercialmente estériles, cuando se desee comprobar esta condición o cuando los datos del proceso no estén disponibles o no sean satisfactorios.
- La esterilidad comercial de un alimento tratado térmicamente, es el estado que se consigue aplicando calor suficiente, solo en combinación con otros tratamientos apropiados, con el objeto de liberar el alimento de microorganismos patógenos capaces de reproducirse en el en condiciones normales, no refrigerados, en las que se mantendrá durante su distribución y almacenamiento.

1. Fundamento

Este método se aplica a la detección de microorganismos viables en alimentos comercialmente estériles empacados en recipientes sellados herméticamente o envasado aséptico o ambos, para determinar su conformidad con los requisitos establecidos en la norma de producto de alimentos estériles y de la legislación vigente.

2. Principio

Este método utiliza el muestreo aséptico del contenido de alimentos comercialmente estériles y la inoculación posterior en medios adecuados para determinar la presencia o ausencia de microorganismos viables.

Una porción del producto se mezcla con el medio especificado y se incuba en condiciones específicas de tiempo y temperatura. Se asume que cada microorganismo viable se multiplicará en estas condiciones y dará origen a una colonia visible en el medio sólido o turbidez en el medio líquido.

3. OBJETIVO

Establecer la técnica para llevar a cabo la siembra de esporas aerobias y anaerobias.

4. DEFINICIONES

- **Esterilidad comercial:** condición que se logra mediante la aplicación de calor, solo o en combinación con otros tratamientos, para obtener un alimento libre de formas viables de microorganismos, incluyendo esporas, capaces de crecer en el alimento a temperaturas para las cuales normalmente se diseña el alimento para la conservación

durante la distribución y el almacenamiento. Si la temperatura normal de almacenamiento o manipulación del producto es superior a 40°C, entonces se analiza para determinar la presencia de termófilas. De lo contrario, se analiza únicamente la presencia de mesófilos.

- **Recipientes sellados herméticamente:** recipientes diseñados a ser seguros contra el ingreso de microorganismos, incluyendo esporas. Empaques flexibles (bolsa película coextruída de alta barrera de polietileno de baja densidad grado alimenticio).
- **Aerobio:** Ambiente con presencia de oxígeno por tanto en este tipo de ambiente se desarrollan todos aquellos microorganismos capaces de sobrevivir en presencia de O₂.
- **Anaerobio:** Ambiente carente de oxígeno, por tanto, todo aquel microorganismo que vive en este ambiente es capaz de sobrevivir con ausencia de oxígeno.
- **Dilución:** Resultado de diluir una muestra en determinada sustancia.
- **Siembra microbiológica:** Es la acción de colocar una alícuota del alimento a analizar, por medio de una pipeta o asa estéril en un medio de cultivo (Agar) específico para que un microorganismo pueda multiplicarse, luego se dan las condiciones de temperatura y tiempo indicados para obtener un resultado de presencia o ausencia de éste en dicho alimento.
- **Medio de Cultivo:** Producto que contiene nutrientes específicos preparados artificialmente con control pH, temperatura, humedad, valores fisiológicos y osmóticos óptimo; Para permitir el crecimiento de un microorganismo específico.
- **Muestra Aséptica:** Producto libre de contaminación biológica.
- **Suspensión:** Cantidad de alimento disuelto en agua peptona para formar una solución uniforme entre estos dos componentes.
- **Validez:** El resultado de una siembra microbiológica que comprueba la inocuidad de un alimento y la efectividad del proceso térmico, de envase y aplicación de buenas prácticas higiénicas durante todas las etapas del proceso que garantizan la comercialización de dicho producto.

5. ROLES Y RESPONSABILIDADES

Jefe de Calidad: Definir y efectuar los procedimientos para aplicar las diferentes pruebas microbiológicas a la materia prima, insumos, material de empaque y producto

terminado. También revisar y analizar los resultados de las siembras microbiológicas que le permita tomar medidas correctivas y/o preventivas.

Analista de Control de Calidad: Realizar la siembra microbiológica para la materia primas, insumos, materiales de empaque y producto terminado de acuerdo al Plan de Muestreo establecido, con una adecuada preparación previa de área, equipos, materiales y ambientes que aseguren los resultados obtenidos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 MUESTREO

Se deben tomar de un mismo lote cuatro muestras para inspección del mismo lote, evaluación de los envases e incubación.

6.2 INSPECCIÓN, EVALUACIÓN DE LOS ENVASES E INCUBACIÓN

Inicialmente se debe realizar una inspección previa de los envases correspondientes de la muestra que se desea evaluar antes de proceder con la prueba de esterilidad comercial.

Se debe examinar visualmente cada envase de la muestra, si posee rótulos removibles estos deben retirarse. Se anotan cuidadosa y exactamente todas las marcas de identificación y manchas o señales de maltrato que se observen en los envases.

El examen visual debe realizarse con buena iluminación, de ser posible con lentes de aumento.

6.3 INCUBACIÓN

Los envases hinchados o perforados no deben someterse a incubación.

Se toman dos envases, uno de ellos se incuba a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el otro se incuba a una temperatura de $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 días.

Se examinan los envases diariamente para observar abombamiento del envase.

En el caso anterior, se procede inmediatamente a abrir y a examinar el contenido de los envases.

6.4 MATERIALES

- Caldo BHI (Infusión cerebro corazón)
- Muestras a analizar.
- Pipetas estériles
- Tubos tapa rosca estériles.
- Mechero.

6.5 MUESTRA ANALÍTICA E INOCULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO: PRODUCTOS LÍQUIDOS

6.5.1 Antes de iniciar asegúrese de que todo el material a utilizar este debidamente esterilizado ***“Vea instructivo T-LM-001”***

6.5.1.1 Encienda los mecheros, flamee sus manos con alcohol y agítelas alejado del mechero hasta que el alcohol se evapore.

6.5.1.2 Tome la muestra a analizar y prepárela asépticamente ***“Vea instructivo T-LM-002”***

6.5.1.3 Verifique que la codificación dada a la muestra corresponda con la de los tubos.

6.5.1.4 Ubique los tubos de ensayo lo más cerca posible al mechero.

6.5.1.5 Se toman muestras utilizando pipetas apropiadas, taponadas, estériles con extremos de diámetro ancho.

NOTA: Siempre debe tomarse la muestra con el pipeteador o pipetas de precisión.

6.5.1.6 Se recomienda inocular cada tubo de medio líquido con al menos 1 ml ó 2 ml de la muestra tomada del contenido del envase.

NOTA: Tenga precaución de flamear la boca del tubo en cuanto sea destapado y antes de cerrarlo.

7. Análisis microscópico directo: Se puede realizar con coloración Gram, o teñido con azul de metileno.

8. INTERPRETACIÓN

8.1 Si ninguno de los 8 tubos aerobios da positivo y ninguno de los 8 tubos anaerobios muestra crecimiento, se reportará en el informe: “Prueba de esterilidad comercial satisfactoria”.

8.2 Si no se cumple la condición anterior se reportará: “Prueba de esterilidad comercial no satisfactoria”

8.3 Si hay producción de gas en cualquiera de los tubos a 35 °C, se debe sospechar que la contaminación es ambiental, por lo cual el microorganismo que ha crecido debe ser inoculado en la muestra e incubada 14 d a 35 °C. La ausencia de abombamiento en la muestra indica que el microorganismo no se encontraba en la muestra original y que la contaminación corresponde al laboratorio y se reportará “Prueba de esterilidad comercial satisfactoria”.

8.4 Si hay crecimiento aeróbico en el medio incubado a 35 °C para bolsas normales, indica esterilidad no satisfactoria o contaminación en el laboratorio.

8.5 Para descartar problemas de contaminación ambiental, debe verificar los resultados obtenidos de los controles ambientales y observar los tubos incubados a 55 °C, si no hay crecimiento el problema es de esterilidad, se debe verificar las características de la muestra en cuanto a olor y apariencia anormal, pH o presencia de bacterias en el examen microscópico de la muestra original lo cual corrobora el concepto de “Prueba de esterilidad no satisfactoria”.

8.6 Si hay crecimiento a 35 °C y ausencia de crecimiento a 55 °C confirman el concepto de esterilidad no satisfactoria. Para estos casos se debe sembrar en condiciones aeróbicas en agar nutritivo a 55 °C y confirmar la presencia de esporas después de 72 h causantes de una descomposición agria.

8.7 Un histórico de resultados de crecimiento anaeróbico a 55 °C con producción de gas pone en evidencia presencia de esporas incapaces de crecer en temperaturas normales de almacenamiento y distribución.

9. Expresión de resultados

El siguiente cuadro ilustra los límites permitidos para el reporte de los resultados:

Requisitos	Límite permitido
Crecimiento en anaerobiosis a 37 °C	negativo
Crecimiento en anaerobiosis a 55 °C	negativo
Control en anaerobiosis a 37 °C	negativo
Control en anaerobiosis a 55 °C	negativo
Crecimiento en aerobiosis a 37 °C	negativo
Crecimiento en aerobiosis a 55 °C	negativo
Control en aerobiosis a 37 °C	negativo
Control en aerobiosis a 55 °C	negativo
Olor	normal
Aspecto	Característico
pH	Característico
Control ambiental	negativo

10. RECOMENDACIONES

- Mientras dura el proceso de siembra asegúrese que los mecheros siempre estén encendidos y realice las actividades lo más cercano posible a este.
- Sea ágil al momento de adicionar el medio en los tubos de lo contrario se tendrá una contaminación antes de tiempo.
- Use una pipeta diferente para cada muestra.
- No adicione medio de cultivo a temperaturas superiores de 45°C.

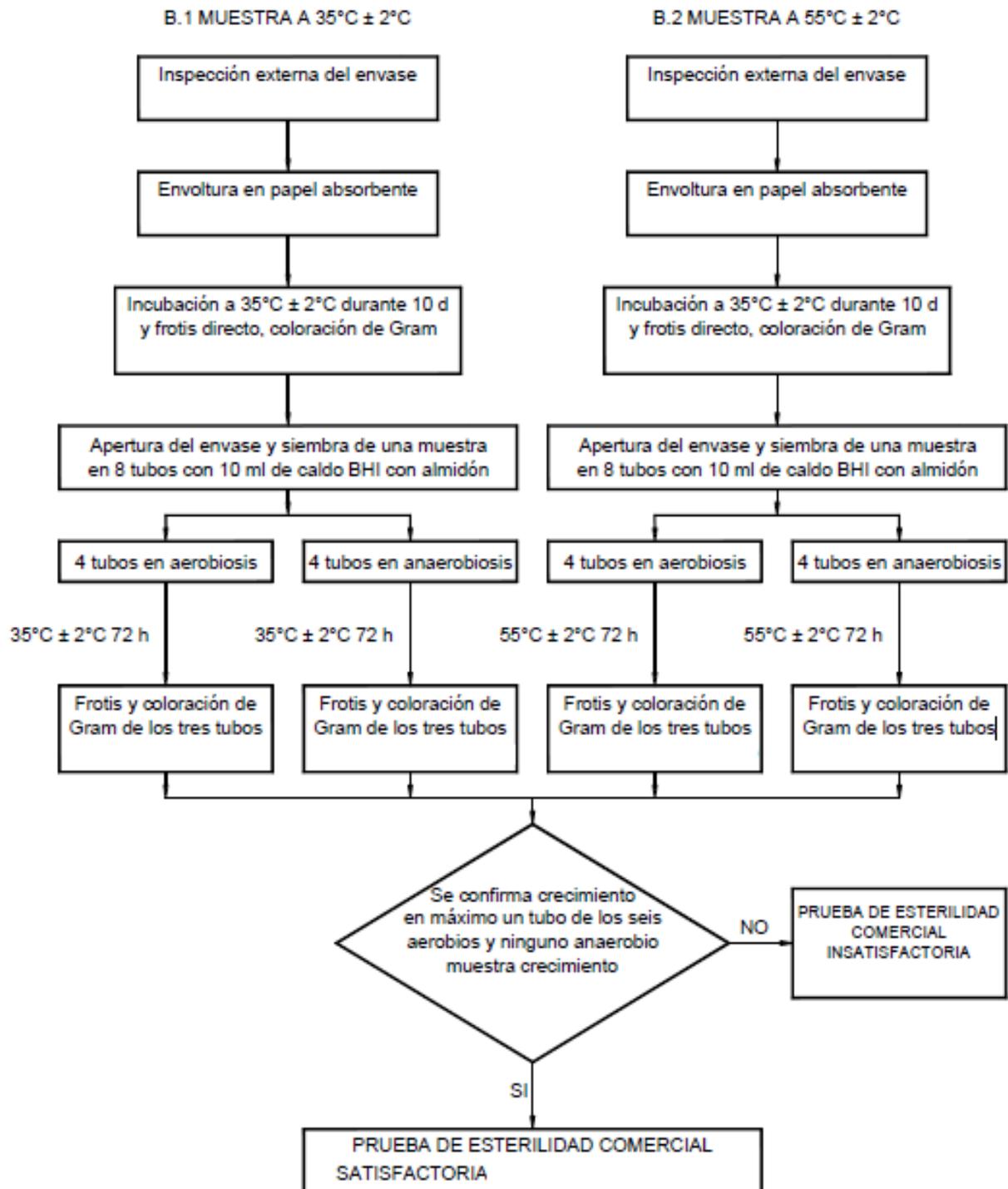
11. REGISTRO

Reporte resultados análisis microbiológicos “Código del formato”

12. FRECUENCIA

Siempre que se requiera el análisis microbiológico de esporas aerobias y anaerobias.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL RECUENTO MICROBIOLÓGICO



Anexo 3

	LACTEOS LA ESMERALDA S.A.S.		CÓDIGO T-LM-004	
	TECNICAS DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO		Página 76 de 88	Versión: 1.0
	METODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACION DE MOHOS Y LEVADURAS. PARTE 1: TECNICA DE RECUENTO DE COLONIAS EN PRODUCTOS CON ACTIVIDAD ACUOSA (Aw) SUPERIOR A 0.95 (NTC 5698)		Fecha: 02/11/2017	
Naturaleza del cambio	Realizado por: Control de Calidad	Revisado por: Ruth Montañez	Aprobado por: Gerencia	

1. Fundamento

Método horizontal para la enumeración de levaduras y mohos viables en productos destinados para consumo humano o alimentación de animales, que tienen una actividad de agua superior a 0.95 (huevos, carne, productos lácteos a excepción de la leche en polvo, frutas verduras, pastas frescas, etc.) por medio de la técnica de recuento de colonia a una temperatura de 25°C, no se aplica a productos con actividad acuosa inferior o igual a 0.60.

2. OBJETIVO

Establecer la técnica para la siembra y recuento de mohos y levaduras.

3. ALCANCE

Esta técnica aplica para el análisis de la presencia de mohos y levaduras, en producto terminado, materia prima, insumos, agua o cualquier otro tipo de producto e incluso al ambiente.

4. DEFINICIONES

- **Levadura:** microorganismos aeróbico mesofílico que a 25°C desarrolla colonias redondas brillantes o mate sobre la superficie del medio que usualmente tienen un contorno regular y una superficie más o menos convexa.
- **Moho:** microorganismo filamentosos aeróbico mesofílico que sobre la superficie de un medio de agar micológico usualmente desarrolla gérmenes/propágulas de proliferación planas o esponjosas o colonias con estructuras con color fructíferas o que forman esporas.
- **Propágula. Germen:** entidad viable capaz de crecer en un medio nutritivo.
- **Colonia:** Acumulación visible localizada de masa microbiana, desarrollada sobre o dentro

de un medio nutritivo solido a partir de una partícula viable.

- **Medio de Cultivo:** Producto que contiene nutrientes específicos preparados artificialmente con control pH, temperatura, humedad, valores fisiológicos y osmóticos optimo; Para permitir el crecimiento de un microorganismo específico.
- **Siembra microbiológica:** Es la acción de colocar una alícuota del alimento a analizar, por medio de una pipeta o asa estéril en un medio de cultivo (Agar) específico para que un microorganismo pueda multiplicarse, luego se dan las condiciones de temperatura y tiempo indicados para obtener un resultado de presencia o ausencia de éste en dicho alimento.

5. ROLES Y RESPONSABILIDAD

Jefe de Calidad: Definir y efectuar los procedimientos para aplicar las diferentes pruebas microbiológicas a la materia prima, insumos, material de empaque y producto terminado. También revisar y analizar los resultados de las siembras microbiológicas que le permita tomar medidas correctivas y/o preventivas.

Analista de Control de Calidad: Realizar la siembra microbiológica para la materia primas, insumos, materiales de empaque y producto terminado de acuerdo al Plan de Muestreo establecido, con una adecuada preparación previa de área, equipos, materiales y ambientes que aseguren los resultados obtenidos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 EQUIPOS Y MATERIALES

- Cajas de Petri estériles.
- Pipeta de 1 y 10 ml estéril.
- Agar (Agar OGY o YGC).
- Mechero
- Encendedor y marcador.
- Área preparada asépticamente para siembra.

6.2 TÉCNICA

6.2.1 Preparación de la muestra en una suspensión inicial (agua peptona al 0.1%) y homogenizar.

6.2.2 Agite la suspensión inicial y las diluciones con el fin de evitar la sedimentación de

partículas que contenga microorganismos.

- 6.2.3** Sobre una placa de agar DRBC (agar de dicloran rosa de bengala y cloranfenicol) para muestras con Aw mayor a 0.95 y sobre una placa de agar DG18 (agar dicloran al 18% y glicerol) para muestras con Aw menor a 0.95, utilizando una micropipeta estéril transfiera 0.1ml de la muestra si es líquida, o 0.1ml de la suspensión inicial, en el caso de otros productos.
- 6.2.4** Disperse el líquido sobre la superficie de la placa de agar con un asa estéril.
- 6.2.5** Repita estas operaciones con diluciones posteriores utilizando una micropipeta estéril para cada dilución decimal.
- 6.2.6** Incube aeróbicamente en posición invertida las placas preparadas a 25°C durante 5 a 7 días.

7. INTERPRETACIÓN

Después del periodo de incubación, seleccionar las cajas que contengan <150 colonias y cuente estas colonias.

Si los mohos de crecimiento rápido son un problema, cuente las colonias después de 2 días y nuevamente después de 5 días de incubación.

8. Expresión de resultados

Registre las colonias de levaduras y las colonias de mohos.

9. INTERPRETACIÓN

Los mohos y levaduras se caracterizan por crecer en ambientes húmedos, no se tiene una interpretación única de ellos ya que los hay de un gran número de formas, estos se pueden presentar de diferentes colores (blanco, negro, verde, etc.), adicionalmente a ello su textura también suele variar, ya puede ser de forma algodonosa, aterciopelada etc.

10. FRECUENCIA

Siempre que se requiera el análisis de mohos y levadura.

11. REGISTRO

Reporte resultados microbiológicos en el ambiente.

Anexo 4

	LACTEOS LA ESMERALDA S.A.S.		CÓDIGO T-LM-004		
	MANUAL DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN		Página 79 de 88	Versión: 1.0	
	LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN INDUSTRIAS LÁCTEAS (NTC 5245).		Fecha: 02/11/2017		
Naturaleza del cambio	Realizado por: Control de Calidad	Revisado por: Ruth Montañez	Aprobado por: Gerencia		

1. DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma, se aplican las siguientes definiciones:

Agentes químicos aprobados: productos desinfectantes o detergentes-desinfectantes aprobados para uso en la industria láctea. La lista de agentes químicos aprobados se revisa periódicamente.

Cloro disponible: cantidad de cloro equivalente al oxígeno liberado cuando el agente desinfectante clorado, está completamente descompuesto en cloruro y oxígeno.

NOTA El uso del término cloro disponible está limitado en la práctica a los hipocloritos líquidos y a los agentes sólidos que liberan cloro, en los cuales la acción desinfectante es posterior a una hidrólisis sencilla a ácido hipocloroso y su posterior descomposición en cloruro y oxígeno.

Tamponar: estabilizar el valor del pH de una solución.

Agua helada: agua potable a una temperatura inferior a 5 °C.

Limpieza: proceso de eliminar la suciedad.

Higienización: como se establece en diversas legislaciones sobre leche y productos lácteos, combinación de los procesos de limpieza y desinfección.

Agua potable Agua que en el momento de utilizarse posee una calidad suficiente para cumplir con la clasificación establecida en el Decreto 4751.

Inhibidores de corrosión: sustancias capaces de minimizar la corrosión de algunos metales, en casos específicos.

Detergentes: sustancias capaces de ayudar a la limpieza, cuando se agregan al agua. Incluyen jabones, agentes tensioactivos orgánicos, por ejemplo: detergentes sintéticos, compuestos alcalinos y en algunos casos compuestos ácidos.

Desinfección: proceso que reduce el número de microorganismos en una planta de productos lácteos y en los utensilios, para dar un nivel compatible con estándares aceptables de higiene y calidad.

Dispersar: proceso que consiste en retirar y mantener en suspensión la suciedad no disuelta.

Emulsionar: proceso que consiste en mantener en forma dispersa aceites y grasas del residuo de la leche.

Nebulización: aplicación de un agente desinfectante en forma de una nube densa de gotas diminutas.

Fumigación: aplicación de sustancias en forma de humo o vapores que al volatilizarse son capaces de destruir insectos, bacterias, mohos y levaduras.

Piedra de leche: depósito que contiene caseinato de calcio y fosfato de calcio.

Agentes secuestrantes: productos químicos que se combinan con sales de calcio y magnesio, como los que se encuentran en el agua dura, para formar compuestos solubles en agua, que generalmente mejoran la operación de los detergentes.

Suciedad: residuo de la leche, incrustaciones y otros depósitos que se deben retirar de la línea de producción y de la planta en general durante el proceso de limpieza.

Esterilización: proceso destinado a destruir o eliminar todas las formas de vida microbiana (GTC 85).

Agentes tensioactivos: sustancias capaces de modificar las fuerzas físicas existentes en las superficies, como las que existen entre líquidos y sólidos, permitiendo un contacto más estrecho y facilitando su mezcla.

Fregado manual: aplicación de un líquido a una superficie por medio de un paño u otro material.

2. PASOS BÁSICOS

En todos los procesos de limpieza en la industria láctea, cuando deba realizarse una tarea es conveniente tratar de ejecutar cada uno de los siguientes pasos. Normalmente, todos son necesarios para una limpieza exitosa y para cualquier proceso de desinfección posterior o combinado.

- a) Enjuague preliminar con agua, para retirar la suciedad no adherida.
- c) Uno o más enjuagues de las superficies limpias, con agua potable de manera que queden libres de contaminantes y solución detergente.

2.1 ÁCIDOS

Los ácidos más comúnmente usados son:

a) Ácidos inorgánicos, por ejemplo:

1) Ácido nítrico.

2) Ácido ortofosfórico (ácido fosfórico).

b) Ácidos orgánicos, por ejemplo:

1) Ácido glicólico (ácido hidroxiacético).

2) Ácido glucónico.

3) Ácido sulfámico (ácido sulfamídico).

Estas materias primas se usan en formulaciones diseñadas para la remoción de suciedad muy adherida, como la de la piedra de leche, que se encuentra con frecuencia en la industria láctea. Es conveniente manejar estos materiales con cuidado, ya que pueden causar quemaduras severas en la piel. Además, son corrosivos y por esta razón es posible que tengan que usarse con inhibidores de corrosión.

2.2 AGENTES SECUESTRANTES

Ejemplos típicos de agentes secuestrantes son:

a) Polifosfatos de sodio.

b) Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus sales.

c) Ácido glucónico y sus sales.

Se incluyen en los detergentes para prevenir el desarrollo de incrustaciones del agua dura, o para impedir la formación o remover la piedra de leche.

Su inclusión en una formulación también puede mejorar las propiedades de enjuague y el poder detergente total de las soluciones que contienen agentes tensioactivos.

2.3 AGENTES QUÍMICOS DESINFECTANTES

Los agentes químicos desinfectantes se pueden incorporar a los detergentes para obtener productos balanceados tanto para limpieza como para desinfección. Como alternativas al agua hirviente o al vapor de agua para la desinfección de equipos en la industria láctea, sólo se permiten aquellas marcas de desinfectantes y agentes químicos aprobados por las autoridades competentes, de acuerdo con la legislación pertinente sobre leche y productos lácteos.

Tabla 2 Agentes químicos desinfectantes

Agente químico desinfectante	Agente activo
Ortofosfato trisódico clorado	Cloro
1,3-dicloro-5,5-dimetilhidantoína	Cloro
Dicloroisocianurato sódico	Cloro
Hipoclorito de sodio	Cloro
Ácido peracético	Oxígeno
Bromuro n- hexadecil trimetilamonio	Compuestos de amonio cuaternarios
Cloruro de benzalconio	Compuestos de amonio cuaternarios
Yodóforos	Yodo

En la industria láctea, la suciedad que queda en los equipos después de su utilización está contaminada con microorganismos y es un medio en el cual estos se pueden multiplicar fácilmente.

Si un equipo limpiado en forma inadecuada se somete a un proceso de desinfección, entonces:

3.3 NECESIDAD DE TENER SUPERFICIES LIMPIAS

En la industria láctea, la suciedad que queda en los equipos después de su utilización está contaminada con microorganismos y es un medio en el cual estos se pueden multiplicar fácilmente.

Si un equipo limpiado en forma inadecuada se somete a un proceso de desinfección, entonces:

- a) Los microorganismos presentes en los residuos de suciedad estarán protegidos del contacto con los desinfectantes químicos y también, en alguna medida, de los efectos del calor.
- b) La fuerza de cualquier solución química desinfectante, y en consecuencia su eficacia, se pueden ver reducidas por cantidades excesivas de suciedad.
- c) La desinfección por calor hará que la suciedad residual sea más resistente a los procesos de limpieza posteriores.
- d) Los microorganismos que sobrevivan, ya sea al calor o a los agentes químicos, se pueden multiplicar en residuos húmedos de suciedad, y si transcurre suficiente tiempo antes de su uso, el equipo se puede llegar a contaminar seriamente. La acumulación de suciedad como resultado de una limpieza inadecuada continuada acentuará estos efectos.

3.4 TIEMPO PARA DESINFECCIÓN

Considerando que todos los equipos de las plantas lecheras se deben limpiar lo más pronto posible después de su uso, la desinfección de la planta de procesamiento y fabricación debe hacerse inmediatamente antes de la siguiente producción.

Un equipo que no haya sido usado a las pocas horas de su desinfección, debe ser redesinfectado inmediatamente antes de su uso.

3.5 QUÉ OCURRE EN LOS PROCESOS

Durante el tratamiento de limpieza con la solución detergente ocurren los siguientes procesos:

a) Humectación de la superficie sucia.

b) Retiro de la suciedad de la superficie mediante la acción de una solución, emulsificación, acción química y/o mecánica.

c) Dispersión y suspensión de la suciedad no disuelta, dentro de la solución. Durante el proceso de enjuague posterior es esencial que el detergente tenga una buena capacidad de enjuague, es decir, que la solución detergente tenga la capacidad de mantener la suciedad en suspensión mientras la solución es diluida durante la operación de enjuague, de manera que no haya una nueva deposición. Esto también significa que la solución detergente no debe dejar una película residual de detergente en la superficie enjuagada.

3.6 EFECTOS DE LOS AGENTES DESINFECTANTES

Los procedimientos de desinfección que emplean agua caliente o hirviendo, vapor o agentes desinfectantes químicos aprobados son eficaces contra la mayoría de bacterias que no son formadoras de esporas. Sin embargo, las bacterias no formadoras de esporas más resistentes al calor, presentes algunas veces en el equipo de ordeño, pueden sobrevivir al tratamiento de agua hirviendo recomendado para este tipo de equipo.

No se puede contar con que la aplicación prolongada de vapor a 100 °C, ni un tratamiento especial con agentes químicos desinfectantes, como por ejemplo el remojo prolongado usando agentes no corrosivos, sean eficaces contra las esporas bacterianas; sin embargo, en algunas especies su número se puede reducir.

Si la contaminación con esporas bacterianas se convierte en un problema, el tratamiento para remover la piedra de leche, o el desarme y limpieza profunda, pueden ayudar a la eliminación física de las esporas.

4. PLANTAS Y EQUIPOS POR HIGIENIZAR

Los materiales de construcción de las plantas lecheras abarcan una gran variedad de metales y no metales, por lo que es conveniente que los detergentes y agentes desinfectantes se escojan para adecuarse al material en cuestión.

Todas las superficies que entran en contacto con la leche o los productos lácteos deben ser lisas. Las superficies deterioradas e irregulares son más difíciles de limpiar, ya que los depósitos se adhieren con mayor firmeza y las bacterias se resguardan más fácilmente.

4.1 EJEMPLOS DE EQUIPOS QUE REQUIEREN TRATAMIENTO ESPECIAL

Los siguientes son algunos ejemplos de equipos que requieren tratamiento especial:

a) Se recomienda usar agua caliente presurizada, a una temperatura de 140 °C a 150 °C para la esterilización en plantas UHT, donde es necesaria la destrucción completa de todos los microorganismos.

b) Si ocurre acumulación de flora particular, por ejemplo: bacterias coliformes, psicrotóficas o termodúricas, en el equipo tratado con un agente químico desinfectante, el cambio a otro tipo diferente de agente no garantiza completamente su efectividad. El desmonte, inspección, limpieza profunda, remoción de piedra de leche y reemplazo de los componentes defectuosos son pasos preliminares frecuentemente necesarios para obtener una desinfección exitosa con agentes químicos. Si es viable la desinfección por calor, se puede usar periódicamente para evitar la acumulación de flora bacteriana resistente a los agentes químicos.

5. OPERACIONES DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN LAS PLANTAS DE PROCESAMIENTO DE LÁCTEOS

5.1 GENERALIDADES

Las operaciones de limpieza deben seguir una rutina estricta. Al final del proceso lácteo se pasa agua fría por toda la línea para eliminar los residuos de leche.

Se debe tener en cuenta, que no se dispone de un detergente multipropósito para todas las limpiezas en sitio; al seleccionar un detergente se debe prestar atención al hecho de que la suciedad que se va a retirar de una superficie caliente es de naturaleza diferente y más adherida que la de una superficie no caliente.

Algunos elementos en que está construida la instalación están propensos a la corrosión, por ejemplo, hendiduras por corrosión, y mientras que en tanques y tuberías se pueden usar con relativa seguridad agentes desinfectantes aprobados, a su concentración recomendada, puede presentarse corrosión en algunos elementos tales como intercambiadores de calor de tipo placa, evaporadores y válvulas; para

elementos aplica la desinfección con vapor o agua caliente.

Los agentes químicos desinfectantes son usados, normalmente, a baja concentración y las incrustaciones o los residuos de proteínas que quedan en los equipos pueden inactivar el agente desinfectante y perjudicar seriamente la eficiencia de la desinfección. Cuando hay presencia de residuos o incrustaciones, un agente desinfectante es eficaz solamente cuando ocurre penetración. Las condiciones de remojo o circulación normales no son eficaces cuando hay presencia de incrustaciones y los residuos pueden, por tanto, actuar como una fuente de reinfeción microbiana. En consecuencia, es esencial una limpieza adecuada previa a la desinfección.

5.2 PLANTAS UHT

5.2.1 Generalidades

Las plantas para UHT siempre se suministran con sistemas de limpieza completamente automática, y las concentraciones detergente/ácido, temperaturas y tiempos de limpieza habrán sido establecidos durante la orden de pedido del equipo. En forma similar, el tiempo y la temperatura de tratamiento se deberán establecer y registrar en el programa automático.

Sin embargo, de acuerdo con la fabricación, algunos elementos del equipo pueden necesitar limpieza manual además de la limpieza en el sitio rutinaria, especialmente durante la puesta en servicio, y hasta que se establezca que la limpieza de rutina en el sitio es adecuada.

5.2.2 Limpieza de plantas UHT calentadas indirectamente

Se usan diferentes métodos de limpieza para plantas de UHT calentadas indirectamente. El método que proporcionará una limpieza satisfactoria se deberá establecer por experimentación, y dependerá del diseño de la planta, las condiciones del sitio, y la longitud del ciclo.

La planta debe ser limpiada al final de cada ciclo de leche, con el siguiente procedimiento:

a) Al finalizar el ciclo de la leche, se apagan todos los servicios no requeridos. Se hace correr agua fría dentro del tanque de balance al menos durante 15 min, y se bombea esta agua a través del intercambiador de calor, para que fluyan los residuos de leche.

b) Se limpia la instalación mediante un procedimiento apropiado y de acuerdo a lo establecido por el fabricante del equipo. Es conveniente consultar las instrucciones del fabricante, con relación a la frecuencia a la cual se deberían inspeccionar los intercambiadores de calor.

5.2.3 Limpieza de plantas UHT de calentamiento directo

La gran variación en el diseño de las plantas UHT de calentamiento directo hace imposible describir un solo procedimiento de limpieza. En todos los casos es conveniente seguir las recomendaciones del fabricante y desarrollar un procedimiento satisfactorio. Se recomienda prestar atención especial a los elementos de la planta que son difíciles de limpiar en el sitio, tales como el tanque y la boquilla de expansión.

5.2.4 Limpieza intermedia o limpieza sobre la marcha

La limpieza intermedia se practica en algunas instalaciones. Se realiza para incrementar el período del ciclo de proceso antes de que la limpieza comience a ser esencial, y a las temperaturas del proceso manteniendo así la instalación estéril. En todos los casos es conveniente seguir las recomendaciones del fabricante y desarrollar un procedimiento satisfactorio

5.2.5 Esterilización

Las plantas UHT se esterilizan mediante métodos de limpieza automática programada. La esterilización se realiza normalmente antes del ciclo de proceso.

NOTA 1 Asegúrese de que todas las secciones de la instalación estén dentro del rango de temperatura de 140 °C a 150 °C.

NOTA 2 Una temperatura superior a 150 °C puede causar el deterioro rápido de las juntas de caucho.

NOTA 3 No son adecuados los agentes químicos desinfectantes.

5.2.6 Limpieza y desinfección en el sitio CIP (LES)

La rutina adoptada dependerá de la construcción de la máquina, pero se recomienda el siguiente procedimiento básico.

- a) Drenar los equipos, usualmente por unos 10 min.
- b) Recuperar el producto procesado con agua potable.
- c) Enjuagar con agua a la misma temperatura que se usó para el último proceso. La regla para enjuagar es simple: hasta que el agua salga clara y tenga un pH cercano al agua de entrada.

- d) Efectuar un lavado alcalino con un buen detergente a una temperatura más alta que la del proceso de preparación del alimento o la bebida.
- e) Enjuagar hasta un pH cercano al del agua de entrada.
- f) Aplicar un detergente ácido apropiado.
- g) Enjuagar hasta que el agua salga a un pH cercano al agua de entrada.

5.2.7 Condiciones básicas para la ejecución de un CIP

En un sistema de limpieza y desinfección CIP se deben asegurar los siguientes aspectos:

a) Evitar contaminación de las soluciones. Prevenir el riesgo de que el producto llegue a contaminarse con las sustancias utilizadas en el proceso CIP. Esto se debe prever mediante la instalación adecuada de válvulas.

b) Condiciones técnicas de tuberías. Conviene tener un buen sistema de drenaje para el producto y/o soluciones de limpieza, para evacuar las soluciones con rapidez y prevenir contaminaciones con las soluciones o mezclas de las mismas. Un buen diseño de planta es esencial; el trazado de tuberías debe tener las siguientes características:

- 1) Buena capacidad de drenaje (los puntos en que el agua residual no pueda ser drenada son sitios ideales para la rápida multiplicación de microorganismos).
- 2) Flujos concentrados: el flujo de detergente debe estar en la dirección opuesta a la del producto en proceso.
- 3) Eliminación de puntos muertos.
- 4) Uniformidad de los materiales: los materiales de tuberías deben permitir un drenado completo de todos los circuitos.
- 5) La disposición de la planta y tuberías debe permitir un drenado completo de todos los circuitos.
- 6) Se debe asegurar un alto grado de turbulencia de los fluidos de limpieza, en los circuitos por limpiar.

7) Para controlar las condiciones de operación, se pueden instalar instrumentos adecuados y hacer muestreo en los puntos críticos de control del circuito de limpieza.

8) Las placas de unión y válvulas de doble asiento que conectan las líneas de producción y las tuberías de CIP deben asegurar una operación sin fallas del ciclo de limpieza, sin posibilidades de contaminación cruzada entre los productos químicos y los productos alimenticios.

9) Para garantizar que los productos de limpieza o productos lácteos entren en contacto durante los ciclos de producción, se recomienda instalar una descarga al drenaje, entre las líneas de producción y CIP.

10) Se deben instalar accesos a las partes críticas de las líneas, para su inspección visual y limpieza manual, si es necesario. Las instrucciones completas de limpieza para cada circuito CIP deben estar claramente escritas, y su ejecución sólo se debe confiar a personal bien entrenado.

12) La efectividad de la limpieza CIP debe ser verificada a través de un programa de pruebas químicas, físicas, microbiológicas y visuales.

c) Drenaje. Aumentar la eficiencia de la limpieza usando un sistema de purga con aire. Una inyección de aire comprimido libre de aceites es forzada a entrar en tanques y tuberías como el método conveniente para evacuar producto residual. El resultado es el aumento en la recuperación de producto, la minimización de la materia residual por remover, la disminución del agua requerida para enjuagar y el mejoramiento en la utilización del detergente a las concentraciones efectivas para un número de aplicaciones establecidas.

d) Limpieza de tanques del CIP. Los sistemas CIP necesitan ser limpiados ocasionalmente debido a que se contaminan con los precipitados de la suciedad que están removiendo.

NOTA 1 El equipo se debería usar inmediatamente después de desinfección; si esto no es posible, se debe redesinfectar inmediatamente antes de su uso.

NOTA 2 La desinfección usando agua caliente o vapor no es adecuada para todas las máquinas; por tanto, antes de usar cualquiera de estos métodos se debe consultar al fabricante de la máquina