

**INFORME DE PASANTÍA DESARROLLADO EN LA COMPAÑÍA
PASTEURIZADORA SANTO DOMINGO S.A
SIMIJACA-CUNDINAMARCA.**

**YULIETH PAOLA PADILLA CENTENO
COD: 1050065757
INFORME DE PASANTIA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

PAMPLONA

2018

**INFORME DE PASANTÍA DESARROLLADO EN LA COMPAÑÍA
PASTEURIZADORA SANTO DOMINGO S.A
SIMIJACA-CUNDINAMARCA.**

**YULIETH PAOLA PADILLA CENTENO
COD: 1050065757
INFORME DE PASANTÍA PARA OPTAR EL TÍTULO DE MICROBIÓLOGA.**

**TUTOR ACADÉMICO:
LADY YESENIA SUAREZ SUAREZ**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

JURADO

JURADO

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	9
1. OBJETIVOS	10
1.1. OBJETIVO GENERAL	10
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. MARCO REFERENCIAL	12
3.1 Marco legal	12
3.2. Antecedentes.....	13
3.3. MARCO TEÓRICO	14
3.3.1. La leche.....	14
3.3.2. Los derivados lácteos, de acuerdo a la Resolución 2310 de 1986 del ministerio de salud, se definen como:	15
3.3.3. Parámetros microbiológicos de acuerdo a la normativa vigente para la leche y sus derivados.	16
3.3.4. Análisis microbiológico de alimentos	17
3.3.5. Técnicas empleadas para el análisis microbiológico	19
4. METODOLGÍA	21
4.1. Control de ambiente en el área de siembra.	21
4.2. Control de esterilidad de los medios de cultivos	21
4.3. Técnicas empleadas para el análisis microbiológico	21
4.3.1. Técnica recuento en placa	21
4.3.2. Técnica Petrifilm.....	22
4.4. Análisis a materia prima.....	23
4.4.1. Leche cruda	23
4.4.2. Choque térmico.....	24
4.4.3. Insumos y material de empaque.	24
4.5. Control de ambiente dentro de la compañía.	24
4.6. Control a manipuladores.....	24
4.7. Superficies	25
4.8. Análisis microbiológico del Agua por filtración por membrana para la detección de coliformes totales, coliformes fecales y <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	26

4.9.	Análisis microbiológico para productos UHT	27
4.10.	Análisis microbiológico para derivados lácteos	28
4.11.	Verificación de la técnica tradicional recuento en placa y rápida petrifilm para la detección de mohos y levaduras.	28
4.11.1.	Preparación del inóculo de <i>Candida albicans</i>	29
4.11.2.	Preparación del inóculo de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	30
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
5.1.	Control de ambiente en el área de siembra	31
5.2.	Control de esterilidad de los medios de cultivos	32
5.3.	Técnicas empleadas para el análisis microbiológico	32
5.4.	Análisis a Materia prima.....	32
5.5.	Control de ambiente dentro de la compañía.	33
5.6.	Control de manipuladores.....	33
5.7.	Control de Superficies.....	34
5.8.	Análisis microbiológico de aguas	35
5.9.	Análisis microbiológico para productos UHT	35
5.10.	Análisis microbiológico para derivados lácteos	36
5.11.	Verificación de técnica tradicional recuento en placa y rápida petrifilm para el recuento de mohos y levaduras.....	37
6.	CONCLUSIONES.....	46
7.	RECOMENDACION	47
8.	GLOSARIO.....	48
9.	BIBLIOGRAFÍA	49
10.	ANEXOS.....	52

LISTA DE TABLA

Tabla 1: Características microbiológicas de la leche pasteurizada según Decreto 616 de 2006.....	16
Tabla 2 Características microbiológicas de la leche Ultrapasteurizada según NTC 616 de 2006.....	16
Tabla 3. Parámetros microbiológicos estipulados por la Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud para Yogur y Kumis, entero semidescremado y descremado.	17
Tabla 4 Parámetros microbiológicos estipulados por la Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud para crema de leche pasteurizada.....	17
Tabla 5. Análisis fisicoquímicos realizados a los insumos y material de empaque	24
Tabla 6: Resultados obtenidos a partir del primer ensayo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 para la estandarización del inóculo en recuento en placa y placas de petrifilm.	39
Tabla 7: Resultados obtenidos a partir del primer ensayo de <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 para la estandarización del inóculo en recuento en placa y placas de petrifilm.....	39
Tabla 8: Ensayos de repetibilidad y reproducibilidad con las técnicas: recuento en placa y placas de petrifilm para <i>Candida albicans</i>	40
Tabla 9: Resultados obtenidos de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad llevados a cabo para <i>Aspergillus brasiliensis</i>	43
Tabla 10: Porcentajes de recuperación de <i>Candida albicans</i> en pruebas de repetibilidad y reproducibilidad.....	43
Tabla 11: Porcentaje de recuperación de <i>A. brasiliensis</i> en pruebas de repetibilidad y reproducibilidad.....	44

LISTA DE GRÁFICAS

Figura 1: Diseño y composición de una placa de petrifilm	20
Figura 2: siembra por vertido en placa: A) La muestra se pipetea en una placa estéril, B) se añade medio estéril y se mezcla con el inóculo, C) incubación, D) Recuento típico de la siembra.....	21
Figura 3: Diagrama de flujo para el recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras.....	22
Figura 4: Técnica de petrifilm. A) Inoculación, B) incubación, C) interpretación, D) tinción.....	23
Figura 5: Procedimiento de la toma de muestra por luminometría.....	25
Figura 6: Diagrama de flujo para filtración por membrana	27
Figura 7: Estandarización de la concentración de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. A) Control caldo BHI, B) Patrón McFarland 0.5 C) inóculo <i>Candida albicans</i> preparado a partir de la comparación visual del patrón McFarland 0.5.	29
Figura 8: Preparación del inóculo de <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	30
Figura 9: Control de ambiente en el área de siembra.	32
Figura 10: Análisis fisicoquímico al material de empaque.....	33
Figura 11: Realización de frotis a los manipuladores.....	34
Figura 12: Muestreo de superficie: A) Frotis de cestillo con hisopo estéril B) Luminometría.....	34
Figura 13: Análisis microbiológicos para productos UHT por la técnica recuento en placa y placas de petrifilm.....	36
Figura 14: Morfología macroscópica - anverso y reverso de A) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, B) <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 en agar YGC.....	37
Figura 15: Morfología microscópica: A) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, B) <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 en agar YGC.....	38
Figura 16: Repetibilidad para <i>Candida albicans</i> con las técnicas: recuento en placa y petrifilm.....	40
Figura 17: Ensayo de reproducibilidad para <i>Candida albicans</i> con las técnicas: recuento en placa y petrifilm.....	41
Figura 18: Desviación estándar del ensayo de repetibilidad y reproducibilidad para <i>Candida albicans</i>	42
Figura 19: Porcentajes de recuperación por las técnicas: Recuento en placa y petrifilm para <i>Candida albicans</i> en pruebas de repetibilidad y reproducibilidad	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Cronograma de actividades	52
Anexo 2: Clasificación de la leche según contenido de grasa	53
Anexo 3: Clasificación del yogurt según contenido de grasa	53
Anexo 4: Clasificación del Kumis según contenido de grasa	54
Anexo 5: Resultados obtenidos a partir de la estandarización del inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 de la validación.	54
Anexo 6: Resultados obtenidos a partir de la estandarización del inóculo de <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	54
Anexo 7: Reactivación de las cepas liofilizadas.	55
Anexo 8: Puntos de muestreos para los análisis microbiológicos asignados por el laboratorio de control de calidad.	56
Anexo 9: Análisis microbiológicos realizados a los Puntos de muestreo	57
Anexo 10: Análisis microbiológico realizado a la leche cruda, procesada y sus derivados	58

INTRODUCCION

Pasteurizadora Santo Domingo S.A, es una empresa colombiana productora y distribuidora de lácteos, con más de treinta años en el mercado, ubicada en el municipio de Simijaca – Cundinamarca.

La compañía elabora leche UHT: Entera, deslactosada y semidescremada en diferentes presentaciones (1000mL, 450mL y 150mL) y derivados lácteos como yogurt, kumis y avena.

En los últimos años la empresa ha brindado la oportunidad a formadores en el área de microbiología, poner en práctica los conocimientos adquiridos durante su formación académica en la modalidad de pasantía, en el área de control de calidad permitiéndole aprender y adquirir experiencias en el ámbito laboral y social.

Durante este tiempo (6 meses) se dio la oportunidad de aprender nuevas técnicas y procedimientos realizados en el área de control de calidad, realizando entre ellos los análisis microbiológicos como aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras, recomendados por la normativa vigente Colombiana para evaluar la inocuidad de los productos elaborados.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar los análisis microbiológicos asignados por el área de control de calidad, para determinar la calidad microbiológica de los productos elaborados por la compañía Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar la inocuidad de la materia prima y producto terminado mediante los análisis microbiológicos: Aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras
- Evaluar la condición higiénico sanitaria de los manipuladores y superficies.
- Aplicar las técnicas existentes en la compañía para los análisis microbiológicos: Aerobios mesófilos, Coliformes totales, Coliformes fecales, mohos y levaduras.
- Realizar la verificación de la técnica tradicional recuento en placa y rápida petrifilm para el recuento de mohos y levaduras.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a las propiedades nutricionales y fisicoquímicas que tiene la leche, se convierte en un medio propicio para el desarrollo de microorganismos patógenos y puede convertirse en un vehículo para la transmisión de enfermedades al ser humano ⁽¹⁾. Por tal razón se hace necesario verificar la calidad de los productos elaborados por la compañía para garantizar la inocuidad de los mismos, mediante el análisis microbiológico de aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras ya que este tipo de microorganismos permite predeterminar algún posible patógeno, verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección, determinar si las temperaturas aplicadas en los procesos fueron las adecuadas, como también las deficiencias sanitarias.⁽¹⁾

La presencia de estos microorganismos se convierte potencialmente peligrosos solo después que se han violado los principios de higiene, limpieza y desinfección, por lo que es vital mantener estos tres aspectos para el control en todo el proceso de fabricación, permitiendo asegurar la inocuidad de los productos para que puedan cumplir con la normativa nacional vigente, como también con las normas internas establecidas en el área de calidad y sobre todo para el consumidor.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Marco legal

- **ISO 17025:2005, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.** Dentro de los requisitos técnicos de la ISO 17025:2005, se describen factores que determinan exactitud y confiabilidad de los ensayos o de las calibraciones realizadas en un laboratorio. Dentro de los factores se encuentran: el personal, las instalaciones y condiciones ambientales, los métodos de ensayo y de calibración, los equipos, la trazabilidad de las mediciones, el muestreo y la manipulación de los ítems de ensayo y de calibración.⁽²⁾
- **Decreto 3075 de 1997 del Ministerio de Salud:** Por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones. Regula las actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de alimentos en el territorio nacional.⁽³⁾
- **Decreto 616 de 2006 del Ministerio de la Protección Social:** Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país.⁽⁴⁾
- **Resolución 017 de 2012 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural:** Por la cual se establece el sistema de pago de la leche cruda al proveedor.⁽⁵⁾
- **Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud:** Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos.⁽⁶⁾
- **Resolución 333 de 2011 del Ministerio de la Protección Social:** Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano.⁽⁷⁾
- **Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de la Protección Social:** Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.⁽⁸⁾
- **Norma Técnica Colombiana. NTC 4092 de 2009.** Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos.⁽⁹⁾

- **AOAC Official Method 997.02 Yeast and Mold Counts in Food.** ⁽¹⁰⁾

3.2. Antecedentes

Garedew, Berhanu, et ál, (2012), realizaron un estudio para determinar la presencia de bacterias Gram-negativas en la leche cruda destinada a la alimentación humana en la ciudad de Gondar (Etiopía). Los puntos de muestreo de la leche incluyeron productores de leche, cooperativas de productos lácteos, una planta de procesamiento de leche y supermercados. Se evaluaron los procedimientos de higiene aplicados durante el ordeño, la recolección de leche, el transporte, la pasteurización y las condiciones de almacenamiento posteriores a la pasteurización. ⁽¹¹⁾

Como resultado obtuvieron 54 especies bacterianas diferentes, identificando entre ellas las bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, siendo los contenedores de transporte en los centros de recolección de leche y las plantas de procesamiento las más contaminadas con las especies bacterianas, esto se debió a las malas prácticas de higiene en la preparación previa al ordeño, a la higiene deficiente de los manipuladores de la leche y a las prácticas sanitarias deficientes asociadas al uso de los equipos de ordeño y almacenamientos transitorios. ⁽¹¹⁾

Hill, Smythe, et ál, en Nueva Zelanda recolectaron 297 muestras. Cinco tinajas de diferentes granjas fueron seleccionadas al azar en cada región para su análisis para la detección de bacterias patógenas no esporuladas. Utilizando métodos de enriquecimiento en combinación con un método de detección de número más probable modificado para monitorear la presencia de *E. coli* O157: H7, *Listeria* spp, *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp y la técnica de recuento en placa para la enumeración de *S. aureus* y *E. coli*. ⁽¹²⁾

Los resultados de este estudio demuestran la aparición de los patógenos mencionados anteriormente excepto *Salmonella* spp y *E. coli* O157: H7 indicando que la leche cruda contiene, inevitablemente, patógenos reconocidos y, por tanto, el control de la pasteurización o un tratamiento equivalente de la leche cruda sigue siendo primordial. ⁽¹²⁾

En Estados Unidos un brote de ETAS fue atribuido por los pacientes afectados, al consumo de leche cruda provocando infecciones entéricas esporádicas durante su período de exposición. Los pacientes fueron identificados a través de la vigilancia rutinaria de la enfermedad realizada por el departamento de Salud de Minnesota reportando infecciones por *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp y *E. coli*. ⁽¹³⁾

Un estudio realizado por Guerrero (2015), en el Valle del Cauca Colombia, tuvo como objetivo identificar los agentes microbianos asociados a la calidad

higiénica de la leche en los tanques de leche fría. Para dicho estudio se seleccionaron 30 hatos, donde se efectuaron 4 muestreos entre junio y diciembre. Obteniendo como resultado la identificación de 14 bacterias, que fueron agrupadas en: 1. Ambientales, con una prevalencia del 86% representados por: Bacilos Gram-negativos (96,7%), *Streptococcus* spp. (76,7%), *Staphylococcus* spp coagulasa negativos (62,5%), *Citrobacter* spp. (50,8%), *Enterobacter* spp. (26,7%), *Streptococcus uberis* (23,3%), bacilos Gram-positivos (16,7%), *Proteus* spp. (14,2%), *Pseudomonas* spp. (14,2%), *Klebsiella* spp. (5%), *Streptococcus dysgalactiae* (2,5%), *E. coli* (1,7%) y 2. Patógenos infecciosos con una prevalencia del 14% representados por: *Staphylococcus aureus* (38,3%) y *Streptococcus agalactiae* (15%). La alta prevalencia de bacterias ambientales que fueron identificados deja en evidencia las falencias que se tienen en los hatos en la higiene durante la rutina de ordeño, siendo altamente probable que esos microorganismos sean de contaminación externa y no de la glándula mamaria. ⁽¹⁴⁾

3.3. MARCO TEÓRICO

3.3.1. La leche

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.

3.3.1.1. Clasificación de la leche según Decreto 616 de 2006 del ministerio de la protección social

- De acuerdo a su contenido de grasa (ver anexo 2):
 - a. Entera
 - b. Semidescremada
 - c. Descremada

- De acuerdo con su proceso de fabricación:

a. LECHE PASTEURIZADA: Es el producto obtenido al someter la leche cruda, termizada o recombinada 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 órgano lépticas. 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. ⁽⁴⁾

b. LECHE ULTRAPASTEURIZADA: Es el producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche cruda o termizada en una combinación de temperatura entre 135°C a 150°C durante un tiempo de 2 a 4 segundos, seguido inmediatamente de enfriamiento hasta la temperatura de refrigeración y envasado en condiciones de alta higiene, en recipientes previamente higienizados y cerrados herméticamente, de tal manera que se asegure la inocuidad microbiológica del producto sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual deberá ser comercializada bajo condiciones de refrigeración.⁽⁴⁾

c. LECHE ULTRA-ALTATEMPERATURA UAT (UHT) LECHE LARGA VIDA

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

De la leche se pueden obtener diferentes derivados, denominados derivados lácteos dentro de los cuales se encuentra el yogurt, kumis, leche descremada, etc.

3.3.2. Los derivados lácteos, de acuerdo a la Resolución 2310 de 1986 del ministerio de salud, se definen como:

3.3.2.1. Yogurt

Producto obtenido a partir de la leche higienizada, coagulada por la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Los cuales deben ser abundantes y viables en el producto final.⁽⁶⁾

- **Clase de yogurt según su contenido de grasa láctea (ver anexo 3):**
 - a. Entero
 - b. Semidescremado
 - c. descremado

3.3.2.2. Kumis

Producto obtenido a partir de la leche higienizada, coagulada por la acción de *Streptococcus lactis* o *S. cremoris*, los cuales deben ser abundantes y viables en el producto final.⁽⁶⁾

- **Clase de kumis según su contenido de grasa láctea (ver anexo 4):**
 - a. Entero
 - b. Semidescremado

c. descremado

3.3.2.3. Leche líquida saborizada UAT (UHT) ultra alta temperatura larga vida.

Este derivado lácteo es elaborado bajo las mismas condiciones de la leche UHT, agregándole ingredientes y aditivos permitidos de acuerdo a esta resolución.⁽⁶⁾

3.3.2.4. Crema de leche.

La crema de leche debe denominarse según la clase a que corresponde seguido del proceso de higienización utilizado. Por ejemplo Crema de Leche Entera, Pasteurizada.⁽⁶⁾

3.3.2.5. Bebida láctea a base de leche fermentada.

Producto lácteo de consistencia fluida obtenido a partir de la leche fermentada mezclada con otros derivados lácteos e ingredientes higienizados.⁽⁶⁾

3.3.3. Parámetros microbiológicos de acuerdo a la normativa vigente para la leche y sus derivados.

Tabla 1: Características microbiológicas de la leche Pasteurizada según Decreto 616 de 2006

Análisis	n	m	M	c
Microorganismos mesófilos UFC /mL	3	40.000	80.000	1
Coliformes UFC /mL	3	Menor de 1	10	1
Coliformes fecales UFC /mL	3	Menor de 1	-	0

Fuente: Decreto 616 del Ministerio de protección social.⁽⁴⁾

Tabla 2 Características microbiológicas de la leche Ultrapasteurizada según NTC 616 de 2006.

Análisis	n	m	M	c
Microorganismos mesófilos UFC /mL	3	1.000	10.000	1
Coliformes UFC /mL	3	Menor de 1	-	0
Coliformes fecales UFC /mL	3	Menor de 1	-	0
Esporas anaerobias UFC /mL	3	Menor de 1	-	0
Esporas aeróbicas UFC /mL	3	Menor de 1	-	0

Fuente: Decreto 616 del Ministerio de protección social.⁽⁴⁾

Tabla 3. Parámetros microbiológicos estipulados por la Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud para Yogur y Kumis, entero semidescremado y descremado.

Análisis	n	M	M	c
NMP Coliformes totales/g	3	20	93	1
NMP Coliformes fecales/g	3	<3	-	0
Mohos y levaduras/g	3	200	500	1

Fuente: Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud. ⁽⁶⁾

Tabla 4 Parámetros microbiológicos estipulados por la Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud para crema de leche pasteurizada.

Análisis	n	M	M	c
NMP Coliformes totales/g	3	75	150	1
NMP Coliformes fecales/g	3	<3	-	0
Mohos y levaduras/g	3	100	200	1

Fuente: Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud. ⁽⁶⁾

Nota

- m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad
- M = índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable
- C = número de muestras permitidas

3.3.4. Análisis microbiológico de alimentos

El análisis microbiológico en la industria de alimentos se constituye en una herramienta básica para el control de materias primas, proceso, productos y manipuladores, ya que permite establecer el grado de contaminación biológica de estos. ⁽¹⁵⁾

Los principales objetivos del análisis microbiológico son:

- Asegurar que el alimento cumpla con las normas estatutaria
- Que se ajuste a normas internas establecidas por la empresa que los procesa y a las que exija el comprador.
- Que las materias primas que llegan a la planta para ser procesadas cumplan las normas exigidas y pactadas con el productor
- Que se mantenga el control del proceso y la higiene de la línea de fabricación.

Dentro del grupo de microorganismos utilizados para evaluar la inocuidad de un producto se encuentran: los aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras.

3.3.4.1. Aerobios mesófilos

Los microorganismos mesófilos aerobios son el grupo mas grande de los indicadores de los alimentos. Se definen como un grupo heterogeneo de bacterias capaces de crecer en un rango de temperatura entre 15 – 45°C, con un optimo de 35°C. ⁽¹⁶⁾

En productos terminados son empleados como indicadores de vida útil. El recuento de la microbiota aerobia mésofila tiene un valor limitado a la hora de juzgar la seguridad de los alimentos. Esta determinacion permite obtener informacion sobre la alteracion incipiente de los alimentos. ⁽¹⁶⁾

El recuento de mesófilos aerobios permite: Verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección, determinar si las temperaturas aplicadas en los procesos fueron las adecuadas, determinar el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración de los alimentos, verificar condiciones óptimas de almacenamiento y transporte. ⁽¹⁶⁾

3.3.4.2. Coliformes

Este grupo de microorganismos comprende varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, capaces de fermentar la lactosa, están ampliamente distribuíos en la naturaleza, agua y suelo. También son habitantes normales del tracto intestinal del hombre y animales. ⁽¹⁷⁾

Dentro de los coliformes se pueden distinguir los coliformes totales y los coliformes fecales capaces de fermentar la lactosa a 35°C, estos últimos siendo los mejores indicadores de riesgo de infecciones humanas. ⁽¹⁷⁾

Su presencia en alimentos representa mala calidad higiénica en el proceso, falta de higiene de los manipuladores o recontaminación después de proceso. Estos microorganismos no son generalmente patógenos, pero si son indicadores de presencia de microorganismos potencialmente patógenos y por lo tanto son un índice de deficiencias sanitarias. ⁽¹⁷⁾

3.3.4.3 Hongos y levaduras

Los hongos y levaduras son microorganismos eucariotas, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las levaduras son hongos con forma oval (5 – 20 µm) inmóviles, que se dividen por diversos mecanismos, especialmente por gemación. ⁽¹⁶⁾

Los hongos y las levaduras son en su mayoría saprofitos, hallándose libres en la naturaleza. Estos microorganismos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad y por ello pocas veces

determinan problemas en tales alimentos. Sin embargo, en los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando por ello importantes pérdidas por alteración de los productos alimenticios cuyo almacenamiento se realiza en condiciones inadecuadas. Además existe el peligro potencial de producción de micotoxinas por parte de los hongos. Las condiciones necesarias para que un hongo crezca en superficie son: existencia de esporas, nutrientes, humedad y temperatura entre 4°C y 38°C. ⁽¹⁶⁾

3.3.5. Técnicas empleadas para el análisis microbiológico

3.3.5.1. Métodos tradicionales

Son métodos de referencia considerados como Gold Standard para la validación y verificación de métodos alternativos. Sin embargo, estos métodos generalmente se realizan en etapas que consideran varios días, requieren de la preparación de un alto número de materiales asociados a cada etapa del análisis, y deben ser realizados por personal altamente calificado. ⁽¹⁸⁾

- **Recuento en placa**

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” (UFC) presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra. ⁽¹⁹⁾

3.3.5.2. Métodos alternativos

Se caracterizan por ser rápidos y fáciles de usar. Mediante estos métodos, se pueden analizar un gran número de muestras por unidad de tiempo, además, poseen una especificidad y sensibilidad similar al método tradicional, pueden ser automatizados y, en general, más rentables para el operador. Sin embargo, estos métodos deben ser validados por organismos especializados, bajo normas internacionalmente reconocidas como la norma ISO 16140, teniendo como referencia al método tradicional. ⁽¹⁸⁾

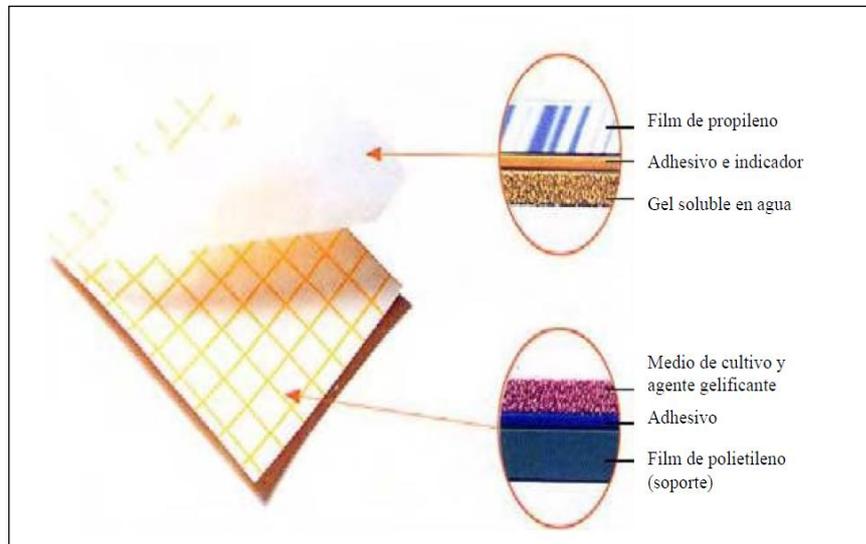
Dentro de estos métodos rápidos se encuentran las placas de petrifilm.

- **Placas Petrifilm**

Método microbiológico que consiste en una familia de placas listas para usarse diseñadas para ofrecer ahorro de tiempo, incremento de productividad, fiabilidad y eficiencia. Su diseño tiene una película rehidratable cubierta con nutrientes y

agentes gelificantes. Proporciona resultados en tres pasos: inoculación, incubación y recuento. Las placas Petrifilm están disponibles para la mayoría de las necesidades de pruebas microbiológicas incluyendo: recuento de aerobios, coliformes totales, *E. coli*, mohos y levaduras.⁽¹⁵⁾

Figura 1: Diseño y composición de una placa de Petrifilm



Fuente: (Rios Ccolque & Riquez Alvaro, 2007)

4. METODOLGÍA

Durante este tiempo se realizaron una serie de actividades bajo los lineamientos y frecuencias estipulados por el laboratorio de control de calidad como se muestra en el anexo 8 (Puntos de muestreos para los análisis microbiológicos asignados por el laboratorio de control de calidad), 9 (Análisis microbiológicos realizados a los Puntos de muestreo) y 9 (Análisis microbiológico realizado a la leche cruda, procesada y sus derivados).

Para la realización de los análisis microbiológicos diariamente se realizó: control de ambientes, control de esterilidad de los medios de cultivos, los cuales se realizaron de la siguiente manera.

4.1. Control de ambiente en el área de siembra.

Empleando la técnica de sedimentación, se colocaban cajas de petris abiertas que contenían medios de cultivos: Plate Count para microorganismos mesófilos y OGY para hongos y levaduras dentro del lugar de siembra durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se incubaron las cajas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas para las bacterias mesófilos y a temperatura ambiente durante 4 días para mohos y levaduras. ⁽²¹⁾

Para mantener la higiene y asepsia del área de trabajo y evitar la contaminación, se realizó todos los días la limpieza de las superficies con detergente al 3% y desinfección del ambiente con productos de quinta generación, a base de amonio cuaternario por aspersion y radiación con UV por 20 minutos.

4.2. Control de esterilidad de los medios de cultivos

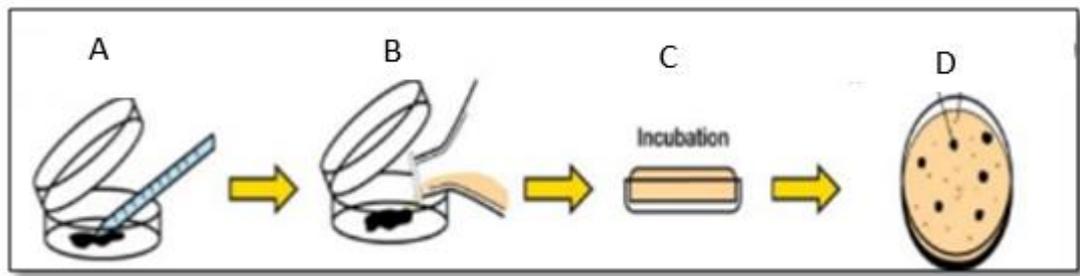
De cada medio de cultivo utilizado para realizar los análisis microbiológicos, preparados de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial, se tomó una caja sin inocular y se incubaron a 35°C para bacterias mesófilas y para mohos y levaduras a temperatura ambiente durante 4 días. ⁽²¹⁾

4.3. Técnicas empleadas para el análisis microbiológico

4.3.1. Técnica recuento en placa

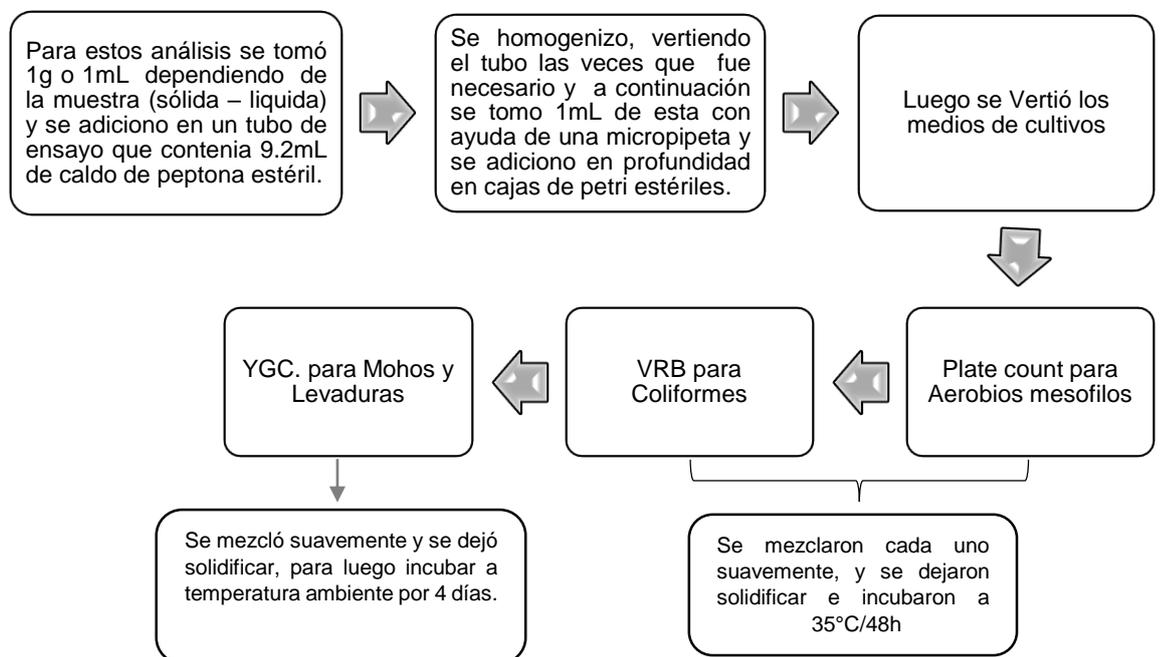
Esta técnica es utilizada para el recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y Levaduras. La figura 2 y 3 muestra gráficamente el procedimiento de la técnica de cómo se ejecutó para cada análisis.

Figura 2: siembra por vertido en placa: A) La muestra se pipetea en una placa estéril, B) se añade medio estéril y se mezcla con el inóculo, C) incubación, D) Recuento típico de la siembra.



Fuente: (Camacho, 2009)

Figura 3: Diálogo de flujo para el recuento de Aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, Mohos y Levaduras.



Fuente: Autor

NOTA

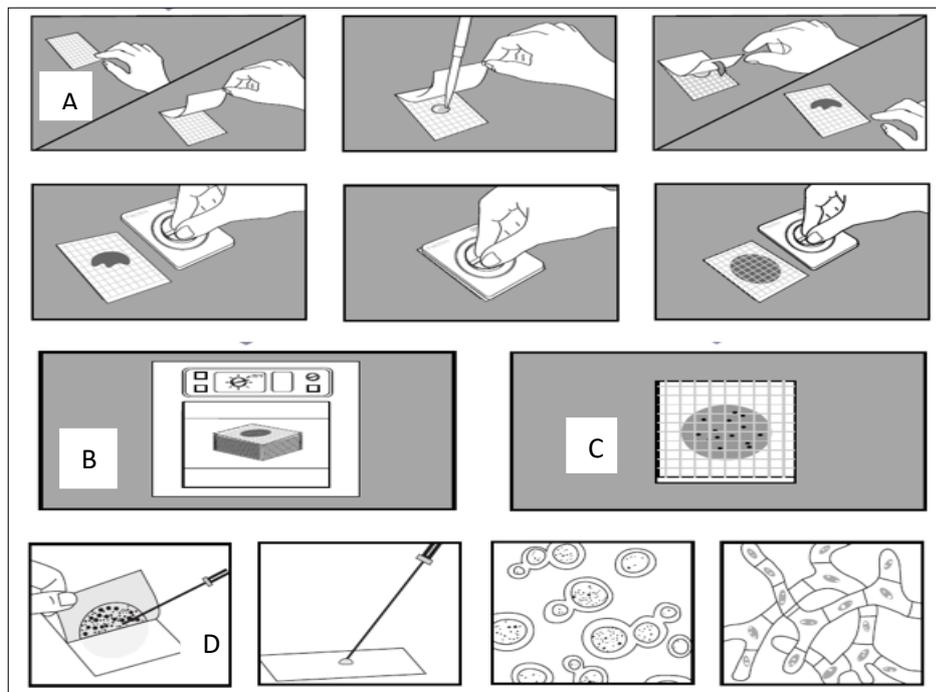
- Los medios de cultivos utilizados fueron preparados bajo las indicaciones de la casa comercial.

4.3.2. Técnica Petrifilm

Consistió en colocar las placas de Petrifilm para el recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales – coliformes fecales, mohos y levaduras en una superficie plana, donde se levantó la película superior y se inoculo 1mL de la muestra en el centro de la placa con ayuda de la micropipeta. Seguidamente con un esparcidor de plástico, se distribuyó la suspensión de manera uniforme utilizando una suave presión hacia abajo en el centro del esparcidor.

Una vez inoculadas las placas estas se dejaron solidificar por 1 minuto y se llevaron a incubar en posición horizontal, con el lado despejado hacia arriba, en pilas que no excedían las 20 unidades a 34°C/48h para aerobios mesófilos y 4 días a temperatura ambiente para mohos y levaduras.⁽¹⁰⁾

Figura 4: Técnica de Petrifilm. A) Inoculación, B) incubación, C) interpretación, D) tinción



Fuente: (Petrifilm, 2000)

4.4. Análisis a materia prima

A la materia prima se les realizó los análisis microbiológicos de acuerdo al cronograma plasmado en el anexo 8, especificados en el anexo 9.

Dentro de las materias primas se encuentran: La leche cruda de los diferentes proveedores (rutas) y material de empaque e insumos.

4.4.1. Leche cruda

Para el muestreo de la leche cruda se tomó una muestra representativa del proveedor en un recipiente estéril, a partir de esta se tomó 1mL y se adicionó en un tubo de ensayo que contenía 9.2mL de caldo peptona estéril y se realizó diluciones hasta 10^{-4} a continuación se sembró en Petrifilm como se indica en la figura 4.

Aparte del análisis de aerobios mesófilos, a la leche cruda se les realizó choque térmico, para realizar recuento de esporas termo resistente.

La leche de los proveedores con los que ya se tiene un contrato se les realiza cada mes y a la leche que llega para ingreso se les realiza el mismo día en que llega al laboratorio.

4.4.2. Choque térmico.

Consistió en adicionar 1mL de Tripolifosfato al 0.6% en un tubo de ensayo estéril para estabilizar la leche, y adicionarle la muestra hasta casi llenar el tubo; el tubo de ensayo fue llevado a la autoclave hasta alcanzar una temperatura de 111°C y se incubo por 4 días a 35°C, transcurrido estas horas se realizó una siembra masiva en el medio de cultivo BHI y se volvió a incubar por dos días a la misma temperatura, para luego realizar el recuento.

4.4.3. Insumos y material de empaque.

A los insumos y al material de empaque se les realizo los análisis microbiológicos especificados en el anexo 9.

Para los insumos se hizo el muestreo de forma aséptica tomando 1g o 1mL dependiendo de la muestra, sembrándolos de forma directa y otros con diluciones (10^{-1} , 10^{-2} hasta 10^{-3})

Para el muestreo del material de empaque se hizo un frotis con un hisopo estéril humedecido en agua de peptona para realizar la siembra en profundidad de forma directa, bajo condiciones de esterilidad.

Adicionalmente a estas materias primas se les hacía análisis fisicoquímicos.

Tabla 5. Análisis fisicoquímicos realizados a los insumos y material de empaque

Insumos	Empaques
<ul style="list-style-type: none">• pH• Acidez• Densidad	<ul style="list-style-type: none">• Dimensiones de ancho• Dimensiones de largo• Altura• Textos

Fuente: Autor

4.5. Control de ambiente dentro de la compañía.

Los controles de ambientes se realizaban en las áreas donde se procesaban y almacenaban los productos. Para ello se colocaban dos cajas de petris rotuladas con el medio de cultivo OGY y Plate Count con el punto a muestrear; estas se dejaban abiertas en una superficie plana durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se incubaron las placas a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas para las bacterias mesófilos y a temperatura ambiente durante 4 días para mohos y levaduras.

4.6. Control a manipuladores

Este se llevaba a cabo a cada uno de los trabajadores que se encontraban en contacto directo con el producto procesado. Tomando dos hisopos estériles humedecidos en 9.2mL de caldo peptona estéril, frotando la palma de la mano, uñas y el espacio entre los dedos, una vez realizado el frotis, el hisopo fue sumergido dentro del mismo tubo de ensayo para proceder a la siembra en petrifilm para aerobios mesófilos y en placas para coliformes totales y coliformes fecales.

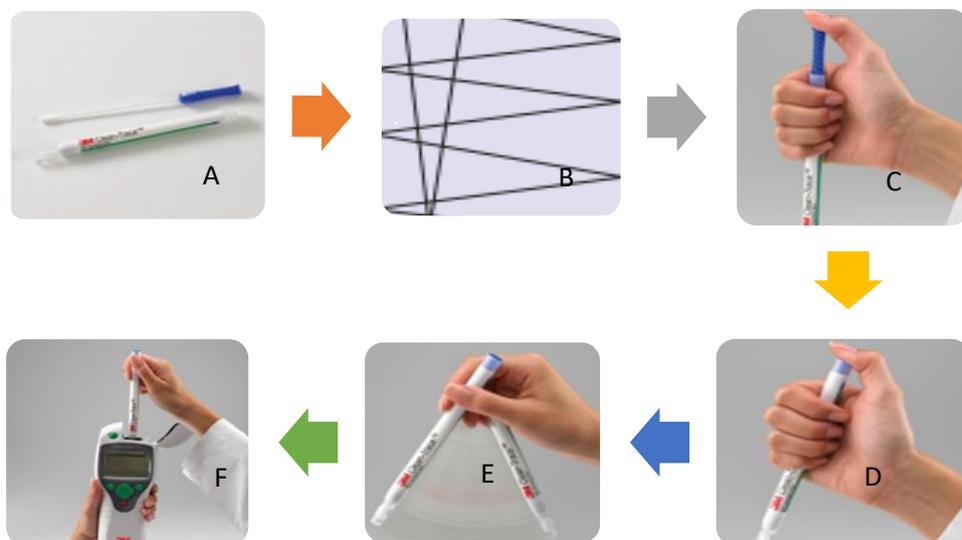
4.7. Superficies

Las superficies a las que se les hizo el muestreo fueron a las de los carrotanques donde se transporta la leche cruda, los silos donde se almacenaba la leche y los cestillos donde se empacaba la leche.

Para el muestreo de los carrotanques y los silos se tomó una muestra representativa de agua una vez lavados por las personas encargadas, para realizar el análisis de aerobios mesófilos en petrifilm y coliformes totales y coliformes fecales en placas.

Para los cestillos se tomó un frotis con un hisopo estéril realizando el mismo procedimiento que para los manipuladores; adicional a este procedimiento a los cestillos y a los carrotanques se les hizo un frotis con la técnica de luminometría, la cual se efectuó de la siguiente manera. ⁽²³⁾

Figura 5: Procedimiento de la toma de muestra por luminometría.



Fuente: (3M)

- A. Tomando la tórula por la parte plástica superior y sin tocar la parte blanca, hisopar horizontal y verticalmente de un lado hacia el otro.
- B. Continuar el hisopado por toda la superficie de forma horizontal y vertical. Una vez terminado de hisopar regrese la tórula al tubo

C. Activar la prueba

D. Presione la tapa azul dentro del tubo hasta el fondo (suena “click”).

E. Después de activar la tórula, agitar rápidamente por un mínimo de 5 segundos para permitir que se mezclen los componentes. (Agitar de forma horizontal, nunca vertical).

F. Introducir inmediatamente después la tórula dentro del Luminómetro, cerrar la tapa y seleccionar “Medición de la muestra”.

- El resultado de la medición, expresada en URL (Unidades Relativas de Luz) aparecerá en el lector.
- Registrar la medición.

4.8. Análisis microbiológico del Agua por filtración por membrana para la detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Pseudomonas aeruginosa*.

Para estos análisis se tiene en cuenta la Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.

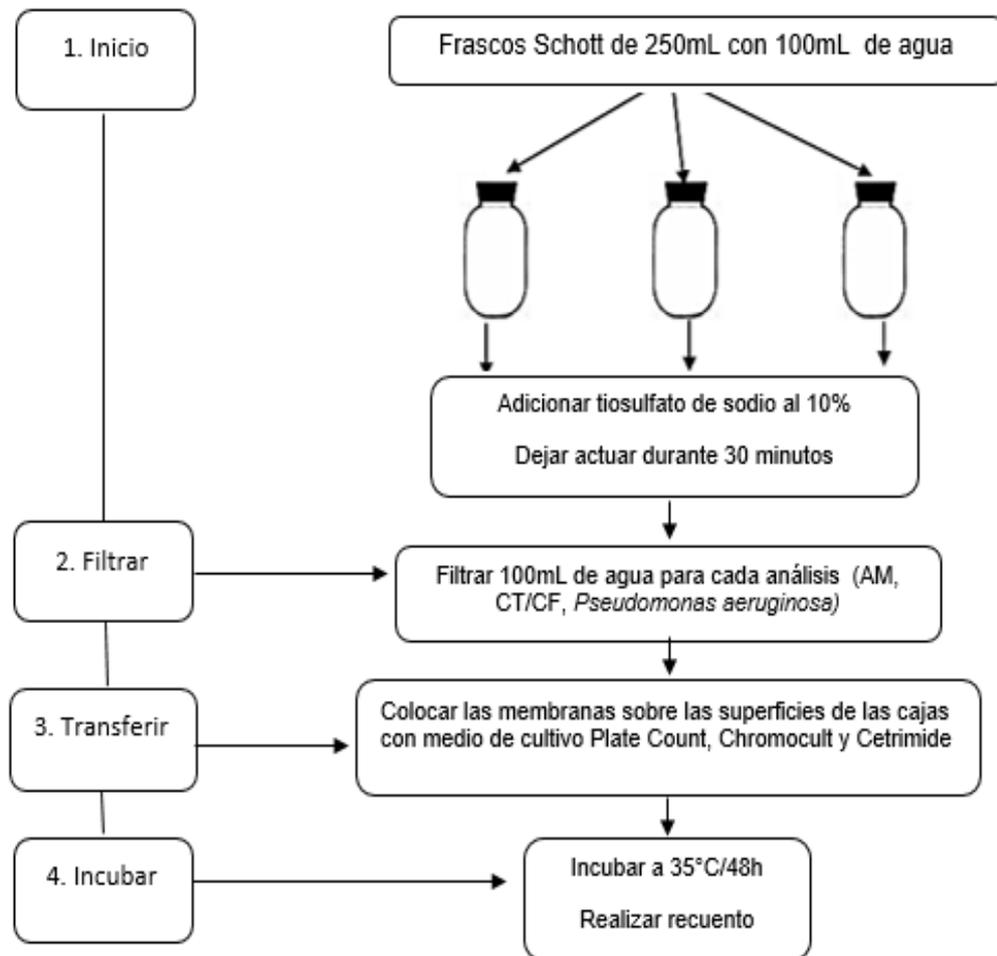
Puntos de muestreos

- Acueducto
- Subterráneo
- Tanque aéreo
- Laboratorio de fisicoquímica y microbiología.
- Retorno
- Recibo
- Pasteurizador
- Área de UHT

Se toma 100mL de muestra para cada análisis en los diferentes punto de muestreo en frascos Schott estériles de 250mL, seguidamente estas muestras son transportadas al laboratorio de microbiología, donde se les adicionara aproximadamente 1mL de tiosulfato al 10% para inactivar el cloro presente, dejándolo actuar por 30 minutos, pasado este tiempo se hace pasar el agua a través del equipo de filtración gracias a un sistema de bomba al vacío, en el filtro queda suspendida la carga microbiana presente en la muestra, que posteriormente se transfiere a cajas de petris pequeñas que contienen: Plate Count para aerobios mesófilos, chromocult para coliformes totales – coliformes fecales y cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cajas de petri con los diferentes medios se llevan a incubar a 35°C durante 48h.

Figura 6: Diagrama de flujo para filtración por membrana



Fuente: (Carrillo & Lozano, 2008)

4.9. Análisis microbiológico para productos UHT

Para estos productos se realiza esterilidad comercial basado en la Norma técnica colombiana (NTC) 4433 y aerobios mesófilos incubadas por 48h haciendo uso de la técnica petrifilm mencionada anteriormente; a excepción de la leche saborizada y avena que se realiza por el método tradicional recuento en placas. Las muestras son incubadas por lotes y orden de trabajo, unas a 35°C por 48h que se siembran en petrifilm y otras por diez días para realizar prueba de esterilidad comercial.

Para la prueba de esterilidad comercial primero se ordenan las muestras de acuerdo al lote, y a la máquina envasadora, una vez ordenadas se colocan

dentro de un recipiente limpio, luego se limpia y desinfecta la superficie externa de los envases con alcohol, para luego abrirlos asépticamente con ayuda de una tijera estéril y proceder a la siembra en placas adicionándoles medio de cultivo BHI (Infusión Cerebro Corazón) que es preparado de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial.

Ya solidificada las cajas se incuban unas a 35°C y 55°C en condiciones aeróbicas y otras a 35°C en condiciones anaeróbicas (Jarra de anaerobiosis).

Nota:

- Leche UAT (UHT) en la prueba de esterilidad comercial de acuerdo a la NTC 616 DE 2006 después de incubar durante 10 días no debe presentar crecimiento microbiano a 35°C ni a 55°C.
- En caso de presenciarse algún crecimiento se realiza tinción de Gram y se toma una contra muestra donde se realizará nuevamente el procedimiento descrito anteriormente.

4.10. Análisis microbiológico para derivados lácteos

Para los productos lácteos se hace el análisis microbiológico desde la leche pasteurizada, las bases de los lácteos hasta el producto final, para ello se hace dilución hasta 10^{-1} de cada muestra y se realiza la siembra en profundidad por recuento en placa, otras veces se realiza en petrifilm, esto depende de la cantidad de muestra a analizar.

Nota

- Para todos los análisis microbiológicos en caso de haber presencia de los microorganismos evaluados y estos no se encuentren dentro del rango permitido por la normativa, se les realiza una contra muestra reportándole al jefe del laboratorio y si en el siguiente muestreo persiste el crecimiento microbiano se toman las medidas pertinentes por el área de calidad como por ejemplo retención del lote de la muestra contaminada.

4.11. Verificación de la técnica tradicional recuento en placa y rápida petrifilm para la detección de mohos y levaduras.

Para la verificación de estas dos técnicas, se empleó las cepas liofilizadas y certificadas de la casa comercial Microbiologics®, referencia KWIK-STICK™ *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, basados en la Norma técnica Colombiana 4092 para el recuento en placa y AOAC 997.02 para placas de petrifilm.

En el año 2017 se realizó la validación de la técnica recuento en placa para la detección de mohos y levaduras en la compañía, con el objetivo de determinar la precisión y exactitud de la misma ⁽²⁵⁾; una vez validada la técnica, la NTC-ISO/IEC 17025:2005 recomienda que los laboratorios deben realizar el seguimiento a la validez de los ensayos, por lo que en este trabajo se realizó la verificación de la técnica utilizando la metodología descrita en la validación, realizando pruebas de repetibilidad y reproducibilidad.

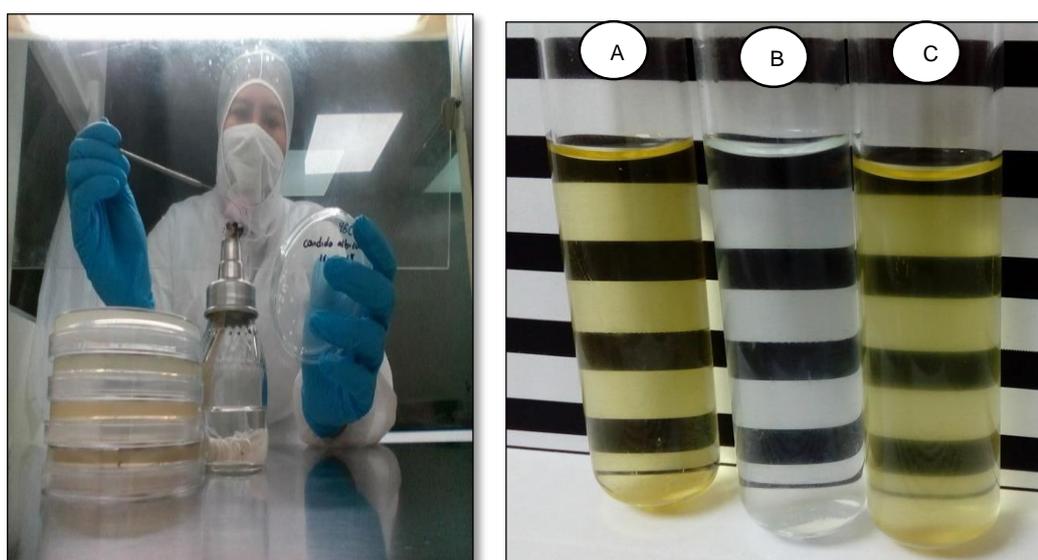
Para dicha verificación se realizó inicialmente la activación de las cepas como se indica en el anexo 7 en el medio de cultivo YGC, estas cajas fueron incubadas a temperatura ambiente por cuatro días, a partir de estos cultivos se hizo repique utilizando el mismo medio de cultivo para hacer una descripción macro y microscópica incubándolos a la misma temperatura.

Con los dos microorganismos aislados se inició con la preparación de los inóculos con los que se iba a trabajar.

Para la concentración del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 se partió de la comparación visual con el patrón de turbidez Mcfarland 0.5 que tiene una concentración de 1.5×10^8 células bacterianas por mL, ⁽²⁵⁾ este patrón fue usado como referencia para ajustar la turbidez de la suspensión de la levadura quedando a esta misma concentración aproximadamente, mientras que para *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 la concentración del inóculo se hizo bajo el recuento en Cámara de Neubauer.

4.11.1. Preparación del inóculo de *Candida albicans*.

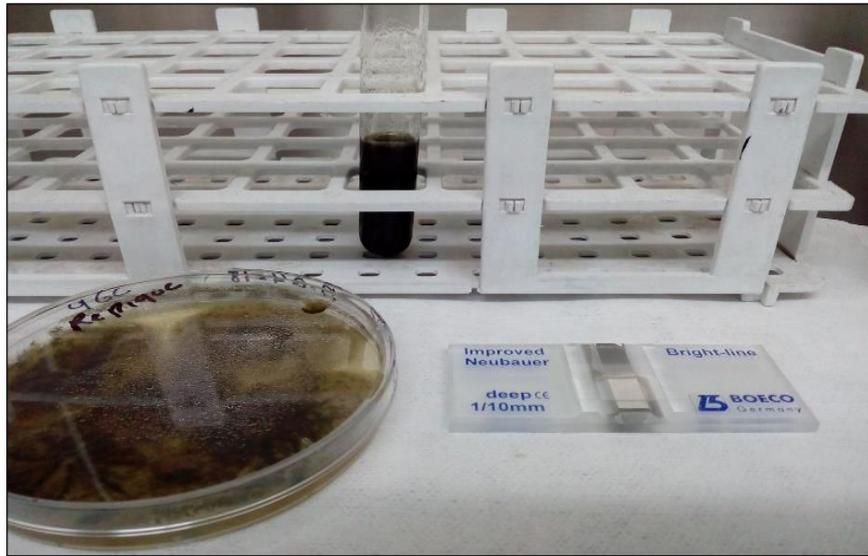
Figura 7: Estandarización de la concentración de *Candida albicans* ATCC 10231. A) Control caldo BHI, B) Patrón McFarland 0.5 C) inóculo *Candida albicans* preparado a partir de la comparación visual del patrón McFarland 0.5.



Fuente: Autor

4.11.2. Preparación del inóculo de *Aspergillus brasiliensis*

Figura 8: Preparación del inóculo de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404



Fuente: Autor

Con la estandarización del inóculo se procedió a realizar los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad, en los que se partió de una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL para *Candida albicans* y 10^6 esporas/mL para *Aspergillus brasiliensis* aproximadamente; de estos inóculos se realizaron diluciones hasta 10^{-6} para la levadura y 10^{-5} para el hongo; trabajando con las dos últimas diluciones para cada microorganismo.

Para dichas pruebas de repetibilidad y reproducibilidad se realizaron cinco ensayos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Por políticas internas de la empresa no se publica ningún resultado, pero si se da una breve explicación de lo que se buscaba con cada análisis.

Cada uno de los resultados obtenidos de los análisis realizados a los productos de la compañía es registrado en un libro especificado (bitácora) para cada producto, para hacer el seguimiento de estos, siendo reportado al jefe del área de control de calidad para darle liberación de esta área.

En caso de existir algún recuento por fuera del límite permitido, se realiza una contra muestra registrándola nuevamente en la bitácora correspondiente como contra muestra.

Los análisis microbiológicos realizados en el laboratorio de calidad (aerobios mesófilos, Coliformes totales, coliformes fecales mohos y levaduras), son utilizados como referente para evaluar las condiciones higiénico sanitaria de los productos elaborados, para su posterior liberación.

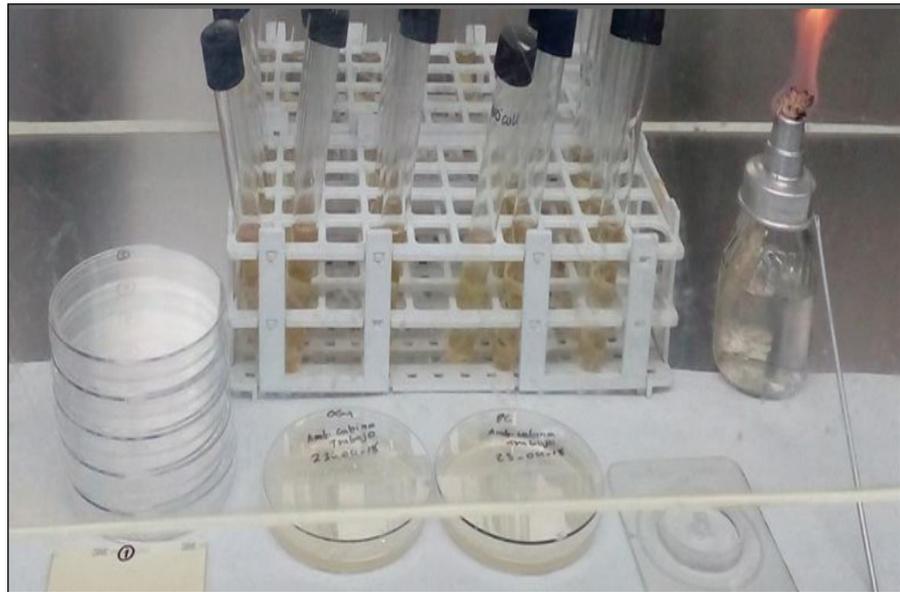
El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados. Un recuento elevado puede significar: Contaminación de la materia prima, deficiente manipulación durante el proceso de elaboración, posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos, Inmediata alteración del producto.⁽²⁶⁾

Los coliformes en productos alimenticios que han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, cocción, etc.), se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias.⁽¹⁹⁾

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como microbiota normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal higienizados. Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo también pueden ser causantes de la descomposición de otros alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable.⁽¹⁹⁾

5.1. Control de ambiente en el área de siembra

Figura 9: Control de ambiente en el área de siembra.



Fuente: Autor

El control de ambientes en el área de siembra se realizó diariamente de acuerdo a las indicaciones del laboratorio de control de calidad. Los resultados obtenidos fueron óptimos, ya que no hubo crecimiento de ninguno tipo de microorganismos. Esto garantiza que los procesos de limpieza y desinfección son adecuados y realizados de forma correcta.

5.2. Control de esterilidad de los medios de cultivos

El control de esterilidad de los medios de cultivo se hace con el fin de verificar la esterilidad del medio de cultivo, es decir que no exista ningún tipo de crecimiento microbiano, para así garantizar los recuentos obtenidos.

5.3. Técnicas empleadas para el análisis microbiológico

Las técnicas empleadas rutinariamente en el laboratorio de calidad para el análisis microbiológico es la técnica recuento en placa donde se realiza siembra en profundidad para evaluar la calidad de los productos, siendo esta las más utilizada y recomendada por la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas en los Alimentos (ICMSF) y placas de Petrifilm.

5.4. Análisis a Materia prima

Realizar el análisis a la materia prima es vital porque a partir de ella se puede conocer la carga microbiana adicional que le puede aportar al producto elaborado en caso de que se encuentre presente algún tipo de microorganismo; ya que estos pueden ocasionar cambios fisicoquímicos hasta el deterioro del

producto en caso de presentar recuentos altos. Es por ello, que las materias primas deben ser sometidas a un análisis microbiológico que demuestre que cumplen con las especificaciones establecidas, para garantizar que son adecuados para el uso al que están destinados.

Aunque muchos de estos microorganismos son eliminados en los procesos de pasteurización cuando se encuentra en su forma vegetativa, algunos sobreviven a estas temperaturas en su forma esporulada.

Aparte del análisis microbiológico a la materia prima, se les realiza análisis fisicoquímicos; en el caso de la leche cruda a este se les practica las pruebas de plataforma (pH, acidez, % de grasa, etc) en el área de fisicoquímica por el personal encargado y al material de empaque se les hace mediciones a ver si cumplen con los estándares, como ancho, largo, altura, calibre, y a los insumos pH, densidad, acidez, en el laboratorio de microbiología.

Figura 10: Análisis fisicoquímico al material de empaque.



Fuente: Autor

5.5. Control de ambiente dentro de la compañía.

El control de ambiente es realizado para garantizar la higiene del ambiente que se encuentra en contacto con los productos elaborados. En caso de que los recuentos sean muy altos este es reportado al jefe de producción donde se toma como medida la limpieza y desinfección del área y nuevamente se vuelve a evaluar el área.

Un ambiente contaminado afecta directamente la calidad del producto, llevando al deterioro del mismo, causándole pérdidas económicas a la compañía.

5.6. Control de manipuladores

Figura 11: Realización de frotis a los manipuladores

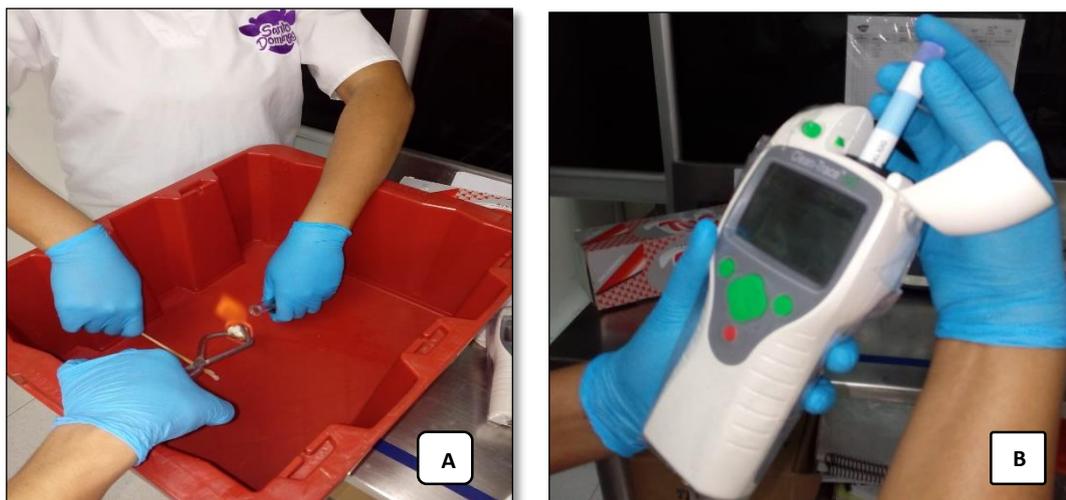


Fuente: Autor

Este examen se realiza mensual a todos los trabajadores que se encuentren en contacto de forma directa durante el proceso de elaboración y empaque del producto, con el objetivo de verificar el estado higiénico sanitario de los manipuladores para que no llegue a afectar el producto.

5.7. Control de Superficies

Figura 12: Muestreo de superficie: **A)** Frotis de cestillo con hisopo estéril **B)** Luminometría.



Fuente: Autor

El control de superficies se realiza de do formas: una como lo muestra la figura 12 A, que consiste en frotar con un hisopo humedecido en caldo peptona estéril

las paredes del recipiente a muestrear para arrastrar consigo los microorganismos presentes y la otra por luminometría con el luminómetro como lo muestra la imagen B.

La técnica de luminometría solo se hace con los carrotanques y los cestillos, siendo estos los que se deben liberar de forma inmediata del área de lavado, esta se emplea para evaluar de forma inmediata la limpieza de las superficies de estos. Esta técnica permite la cuantificación de ATP (Adenosin-tri-fosfato) expresada en URL (unidades relativas de luz) producida por los microorganismos contaminantes que han proliferado por los nutrientes que contiene la leche. La presencia de ATP es un indicador de una higiene incorrecta.⁽²³⁾

Para realizar la medición del ATP se realiza primero el frotis a las paredes con la tórula (hisopo) como se indica en la figura 5, Las puntas de los hisopos de muestreo están humedecidas con una solución que permite extraer el ATP de las células. El reactivo que está dentro del bulbo del dispositivo está formado por una enzima que se encuentra en las luciérnagas llamada Luciferasa. Cuando esta enzima entra en contacto con el ATP reacciona y emite luz, esta emisión de luz es cuantificada por el luminómetro. La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de ATP, dando así una medida cuantitativa de la limpieza de la superficie.⁽²³⁾

Para considerar que la superficie está limpia la URL debe ser menor >100.

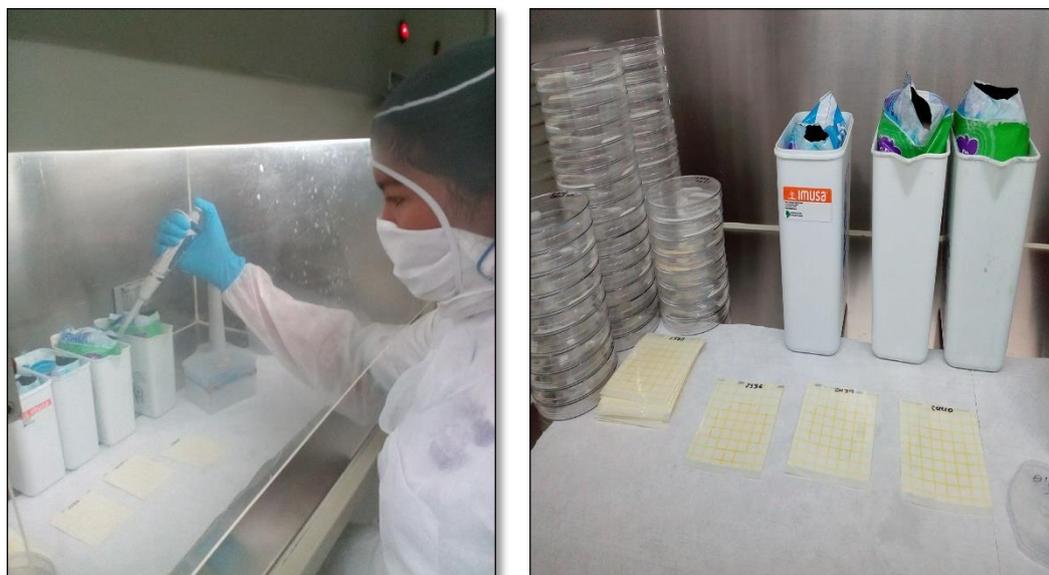
5.8. Análisis microbiológico de aguas

La calidad del agua es de vital importancia ya que esta es utilizada de forma directa en la elaboración de algunos productos o de forma indirecta para los procesos de limpieza diarios.

La planta cuenta con varios puntos de muestreo del agua que facilita la obtención de la misma, donde una parte es obtenida por pozo subterráneo, tratada bajo los parámetros fisicoquímicos de la Resolución del Ministerio de la Protección Social 2115 de 2007 y otro por el acueducto. Para evaluar la calidad de esta, se realizan los análisis microbiológicos por parte del laboratorio de microbiología coliformes totales y *E. coli* contemplados en la misma resolución, por medio de la técnica filtración por membrana, adicional a estos microorganismos también se realiza por medio de la misma técnica el aislamiento de *Pseudomona aeruginosa*.

5.9. Análisis microbiológico para productos UHT

Figura 13: Análisis microbiológicos para productos UHT por la técnica recuento en placa y placas de petrifilm.



Fuente: Autor

Para el análisis microbiológico de los productos UHT el laboratorio de calidad hace uso de las dos técnicas descritas anteriormente, determinando la presencia o ausencia de crecimiento microbiano para esterilidad comercial y menor a uno (<1) para los recuentos obtenidos de las muestras sembradas en petrifilm o en placas que han sido incubadas con anterioridad.

El Decreto 616 de 2006 del Ministerio de la Protección Social, establece que para los análisis microbiológico para los productos UHT debe realizarse la siembra en tubos de ensayos, la compañía modifico la siembra, realizándola en placas bajo los mismos criterios de evaluación descrito por el decreto (utilizando las mismas temperaturas y tiempo de incubación, medio de cultivo BHI, realización de tinción Gram, etc) con el fin de reducir tiempo de análisis y costos.

En el laboratorio son analizados diariamente cuatro lotes de estos productos (aproximadamente)

5.10. Análisis microbiológico para derivados lácteos

La Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud recomienda para el análisis de los derivados lácteos la técnica del número más probable. La compañía Pasteurizadora santo Domingo utiliza la técnica recuento en placa y Petrifilm, siguiendo los mismos lineamientos del procesado de las muestras descritos en esta resolución, para reducir tiempo de procesamiento.

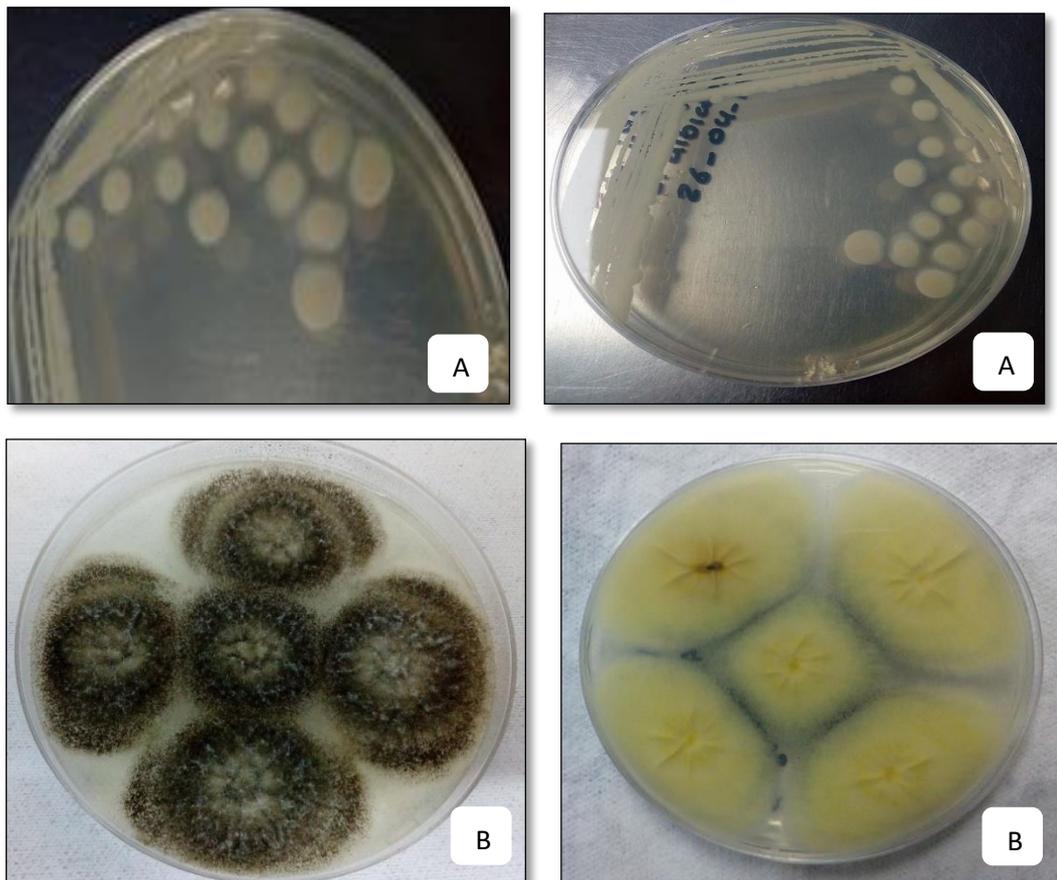
Para el procesado de las muestras en el laboratorio, se muestrean tres productos lácteos indicados como inicio, mitad y final con el mismo lote. Diariamente se estaban analizando 30 muestras.

5.11. Verificación de técnica tradicional recuento en placa y rápida petrifilm para el recuento de mohos y levaduras.

La verificación de la técnica recuento en placa y placas de petrifilm para la detección de mohos y levaduras se realizó con *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* como se indicó anteriormente, estos dos microorganismos fueron cultivados en el medios de cultivo YGC; medio utilizado y recomendado en la validación realizada en el laboratorio de calidad de la compañía.

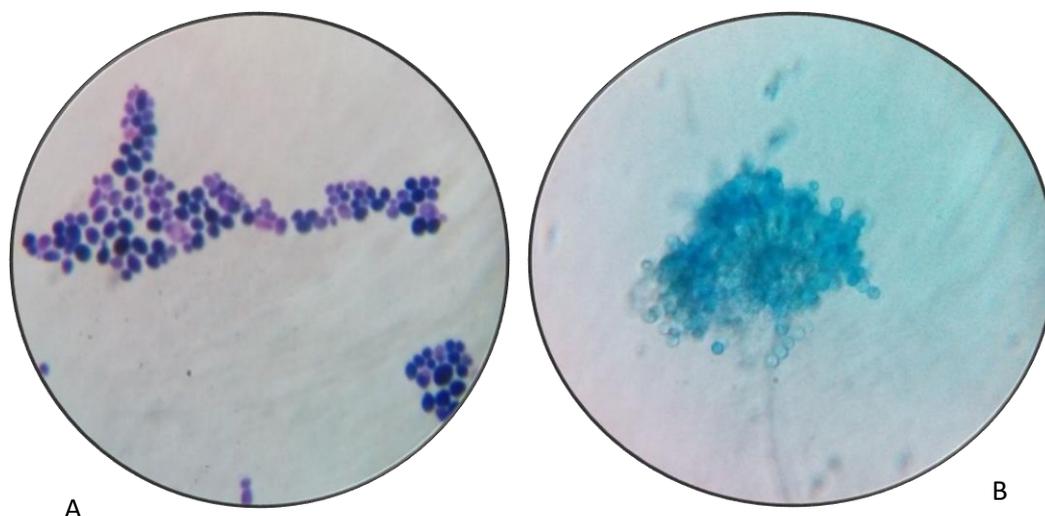
La validación y por ende la verificación se realizó con el fin de demostrar que esta técnica es confiable para la detección de mohos y levaduras aun cambiando de analistas (reproducibilidad) realizándolo las veces que sea necesario (repetibilidad) ya que la empresa realiza diariamente el análisis de estos para la liberación de materia prima y sus productos.

Figura 14: Morfología macroscópica - anverso y reverso de A) *Candida albicans* ATCC 10231, B) *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 en agar YGC.



Fuente: Autor

Figura 15: Morfología microscópica: A) *Candida albicans* ATCC 10231, B) *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 en agar YGC.



A

B

Objetivo 100X

Fuente: Autor

Las figuras 14 y 15 muestran el crecimiento típico macro y microscópico de los dos microorganismos en el medio YGC.

Candida albicans creció formando colonias blancas tanto por el anverso como por el reverso, grandes, cremosas y lisas. Esta levadura se caracteriza por ser dimórfica es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentososo, a 25°C en la naturaleza. ⁽²⁷⁾

Las características que mostro *Aspergillus brasiliensis* en sus colonias por el anverso fue un color amarillo pálido, algodonoso en los primeros días del desarrollo del micelio, al igual que el reverso, pero al transcurrir los días (4 días) fue cambiando de color al esporular, tomando una la coloración negra en la parte frontal y por el revés quedando marrón.

Para realizar la estandarización de los inóculos con las cepas de estudio, se realizó un primer ensayo trabajando con las diluciones recomendadas en la validación con dos ensayos, para comprobar si se podía realizar tanto la detección como el conteo de las UFC/mL de los microorganismos utilizados con las diluciones 10^{-5} - 10^{-6} para *Candida albicans* dado que si se trabaja con muestras más concentradas puede ocurrir un solapamiento en el crecimiento de las colonias y por ende se dificulta el recuento de las colonias crecidas. ⁽²⁵⁾ y 10^{-4} - 10^{-5} para *Aspergillus brasiliensis* ya que si se trabaja con muestras más diluidas puede que no ocurra la cuantificación de colonias y por ende no haya crecimiento del moho. ⁽²⁵⁾

Tabla 6: Resultados obtenidos a partir del primer ensayo de *Candida albicans* ATCC 10231 para la estandarización del inóculo en recuento en placa y placas de petrifilm.

Análisis de varianza	Recuento en placa				Petrifilm			
	Diluciones							
	10 ⁻⁵	Log ₁₀	10 ⁻⁶	Log ₁₀	10 ⁻⁵	Log ₁₀	10 ⁻⁶	Log ₁₀
	60	1.778	7	0.845	90	1.954	14	1.146
56	1.748	4	0.602	87	1.939	13	1.113	
Promedio	58	1.763	5.5	0.723	88.5	1.946	13.5	1.130

Tabla 7: Resultados obtenidos a partir del primer ensayo de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 para la estandarización del inóculo en recuento en placa y placas de petrifilm.

Ensayo	Recuento en placa					Petrifilm			
	10 ⁻⁴	Log ₁₀	10 ⁻⁵	Log ₁₀	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Log ₁₀
1	30	1.477	11	1.041	0	TNTC		4	0.602
2	28	1.447	12	1.079	0			5	0.698
total	58	1.763	23	1.361	0			9	1.301
Promedio	29	1.462	11.5	1.060	-			6	0.650

TNTC: Muy numeroso para el conteo

Fuente: Autor

Como lo muestra la tabla 6 se pudo realizar el conteo tanto en placas como en petrifilm obteniendo resultados similares a los de la validación (ver anexo 5); caso contrario ocurrió con *Aspergillus brasiliensis* con las diluciones 10⁻⁴ y 10⁻⁵ con la técnica rápida petrifilm plasmados en la tabla 7, dado que el recuento fue muy numeroso para el conteo, debido a esto se agregó una dilución más (10⁻⁶), pero en este caso se observó que con la técnica recuento en placa no hubo crecimiento en ninguno de los dos ensayos mientras que en petrifilm sí. Al comparar los recuentos de la levadura con el hongo con las dos técnicas en los diferentes ensayos se ve que hay mayor crecimiento con la técnica rápida petrifilm, con respecto a la técnica recuento en placa.

Atendiendo a los resultados obtenidos anteriormente se decidió trabajar con las mismas concentraciones y diluciones para la realización de la repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 8: Ensayos de repetibilidad y reproducibilidad con las técnicas: recuento en placa y placas de petrifilm para *Candida albicans*.

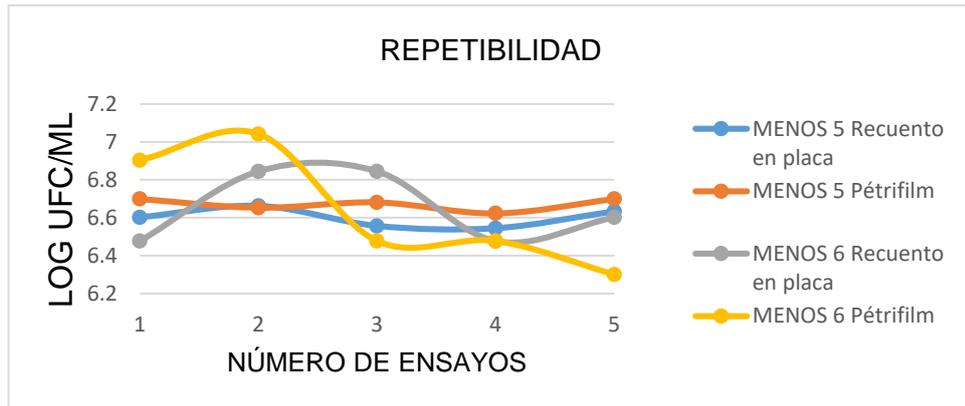
REPETIBILIDAD	Recuento en placa		Petrifilm	
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}
	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀
total	33.1380752	33.4983106	33.3034221	33.855398
Promedio	6.62761505	6.69966211	6.66068442	6.7710796
Desviación estándar	0.0651915	0.24742237	0.01399949	0.1560989
Coefficiente de variación	0.00983634	0.03693057	0.00210181	0.02305377
REPRODUCIBILIDAD	Recuento en placa		Petrifilm	
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}
	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀
total	32.9986568	33.2464986	33.3556431	33.1997552
Promedio	6.59973136	6.64929972	6.67112861	6.63995104
Desviación estándar	0.05025042	0.18587388	0.03265719	0.31555192
Coefficiente de variación	0.00761401	0.0279539	0.0048953	0.04752323

La tabla 8 muestra el promedio de los recuentos obtenidos del ensayo de repetibilidad que mide la concordancia entre las mediciones obtenidas por un analista en varias repeticiones bajo las mismas condiciones de laboratorio al igual que la reproducibilidad pero en este caso cambiando de analista.

Atendiendo a la media de los recuentos reportados por las técnicas empleadas estos guardan cierta similitud encontrándose entre 6,5 – 6,7.

Las figuras 16 y 18 muestran mejor el comportamiento de los recuentos de los 5 ensayos realizados para la repetibilidad y la reproducibilidad.

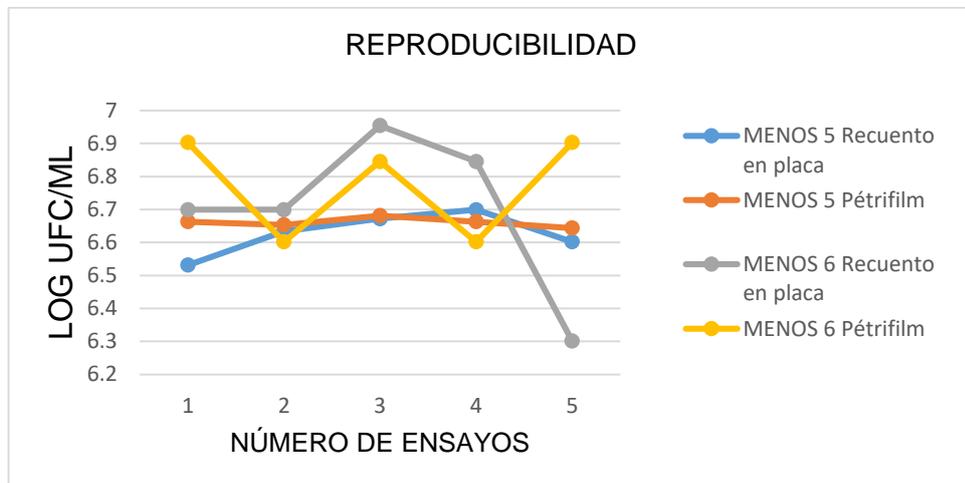
Figura 16: Repetibilidad para *Candida albicans* con las técnicas: recuento en placa y petrifilm.



Fuente: Autor

En la figura 16 se muestra el logaritmo de los recuentos reportados con las técnicas de recuento en placa y petrifilm de los 5 ensayos. Al comparar los 5 ensayos con la dilución 10^{-5} se pudo observar que los recuentos obtenidos en petrifilm y recuento en placa no fueron tan diferentes; sin embargo fueron menos variables los obtenidos en petrifilm (ver figura 18), con respecto a la dilución 10^{-6} con ambas técnicas los recuentos fueron más dispersos, no mostraron tanta concordancia. Analizando cada ensayo solo en el número 2 el recuento fue cercano con la dilución 10^{-5} y en 10^{-6} el ensayo 4.

Figura 17: Ensayo de reproducibilidad para *Candida albicans* con las técnicas: recuento en placa y petrifilm.



Fuente: Autor

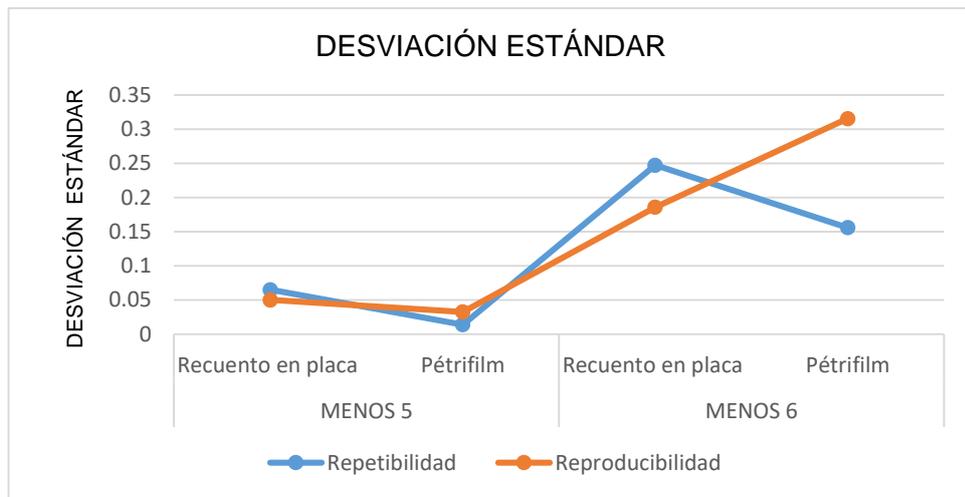
En el ensayo de reproducibilidad mostrado en la figura 18 se cambió de analista, trabajando bajo las mismas condiciones que trabajó el analista en la repetibilidad.

Al comparar los 5 ensayos con la dilución 10^{-5} se observó que con la técnica petrifilm los recuentos en todos los ensayos se mantuvieron muy cercanos y en recuento en placa variaron mucho con el ensayo 1, pero con los otros ensayos guardaron una cercanía con los recuentos en petrifilm. Con respecto a la dilución

10^{-6} con la técnica recuento en placa muestran mucha variación con respecto a la de petrifilm, están más dispersos los recuentos de cada ensayo.

Ahora bien, al comparar el comportamiento de los recuentos de las figuras 16 y 18 por los dos analistas hubo mayor variación en los ensayos con el analista que realizó la repetibilidad. La figura 18 muestra que tan desviados fueron los recuentos con respecto al promedio, de cada técnica empleada de acuerdo a las diluciones

Figura 18: Desviación estándar del ensayo de repetibilidad y reproducibilidad para *Candida albicans*



Fuente: Autor

La figura 18 refleja que tan dispersos fueron los recuentos obtenidos con respecto al promedio de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad con las técnicas empleadas.

La desviación estándar de los recuentos con la repetibilidad presentaron mayor variabilidad con la técnica recuento en placa (ver tabla 8) con las dos diluciones trabajadas, esto mismo sucedió con la reproducibilidad pero con la dilución 10^{-5} . Con la dilución 10^{-6} fue un poco mayor la variación de los recuentos con la técnica petrifilm.

Las variaciones presentadas pudieron deberse a errores humanos, dado a la forma de la preparación del inóculo, ya que para este se realizó con la comparación visual del patrón de turbidez Mcfarland 0.5 y no se utilizó un equipo que permitiera tener la certeza de la concentración como por ejemplo un espectrofotómetro, también se usó caldo BHI en vez de caldo peptona o agua destilada estéril, dado a que este no permite ver bien la turbidez debido al color de ese medio, otra razón podría ser al momento de pipetear.

Tabla 9: Resultados obtenidos de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad llevados a cabo para *Aspergillus brasiliensis*.

REPETIBILIDAD	Recuento en placa			Petrifilm		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
	Log ₁₀					
Total	27.3052654	5.4452678	0	TNTC		32.380212
Promedio	5.46105307	1.08905356	0			6.4760422
Desviación estándar	0.14302429	0.14141657	-			0.3217501
Coefficiente de variación	0.02618987	0.02322472	-			0.0496831
REPRODUCIBILIDAD	Recuento en placa			Petrifilm		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
	Log ₁₀					
Total	27.4302041	5.27230584	0	TNTC		32.8273693
Promedio	5.48604082	1.05446117	0			6.56547385
Desviación estándar	0.05321089	0.05170187	-			0.29147969
Coefficiente de variación	0.00969932	0.04903155	-			0.04439583

Con respecto a los ensayos realizados para *Aspergillus brasiliensis* (tabla 9) se mostró el mismo comportamiento con la dilución 10⁻⁶ cuando se realizaron los primeros ensayos para la estandarización del inóculo, donde no se pudo realizar el conteo de las esporas/mL con la técnica petrifilm debido a que fue muy numeroso el crecimiento del hongo y se expandió por toda la placa, mientras que con la técnica recuento en placa no creció, este suceso permite deducir que con la técnica petrifilm hay mayor crecimiento del microorganismo para muestras más diluidas.

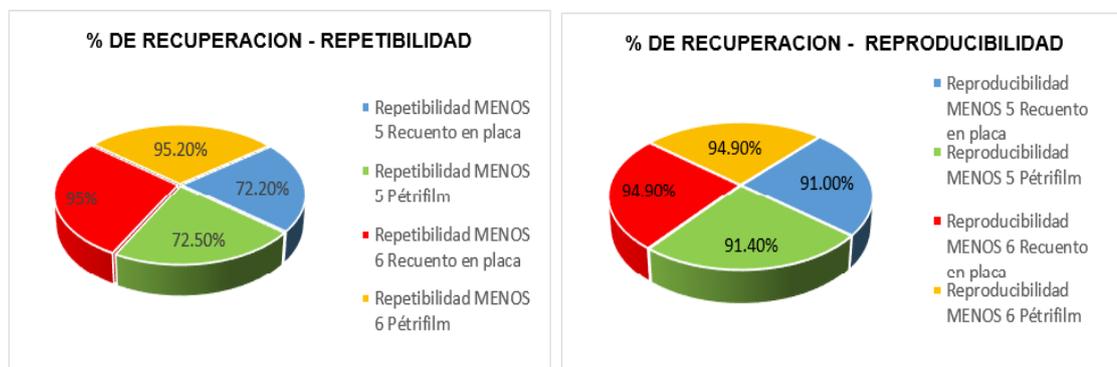
En promedio con los ensayos realizados en la repetibilidad y la reproducibilidad, estos fueron parecidos por ambas técnicas, teniendo menos variación los recuentos realizados por el analista de la reproducibilidad (desviación estándar)

Tabla 10: Porcentajes de recuperación de *Candida albicans* en pruebas de repetibilidad y reproducibilidad

Repetibilidad		
Diluciones	Recuento en placa	Petrifilm
10 ⁻⁵	72.2%	72.5%
10 ⁻⁶	95%	95.2%
Reproducibilidad		
10 ⁻⁵	91%	91.4%
10 ⁻⁶	94.9%	94.9%

Fuente: Autor

Figura 19: Porcentajes de recuperación por las técnicas: Recuento en placa y petrifilm para *Candida albicans* en pruebas de repetibilidad y reproducibilidad



Fuente: Autor

Al comparar los porcentajes de recuperación de *Candida albicans* con respecto a las dos técnicas empleadas (tabla 10, figura 19), teniendo en cuenta las concentraciones de las diluciones trabajadas, los porcentajes de recuperación fueron un poco mayor con la dilución 10^{-5} en la reproducibilidad, encontrándose mayor con la técnica petrifilm 91.4% (figura derecha color verde); con la dilución 10^{-6} ocurrió lo contrario, el porcentaje de recuperación fue un poco mayor en la repetibilidad que en la reproducibilidad siendo mayor el porcentaje con la técnica recuento en petrifilm 95%, pero esta diferencia no es tan grande (figura izquierda, color amarillo).

Tabla 11: Porcentaje de recuperación de *A. brasiliensis* en pruebas de repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad		
Diluciones	Recuento en placa	Petrifilm
10^{-4}	73.7%	TNTC
10^{-5}	63.6%	
10^{-6}	-	
Reproducibilidad		
10^{-4}	74%	TNTC
10^{-5}	63.6%	
10^{-6}	-	

Fuente: Autor

El porcentaje de recuperación de *A. brasiliensis* en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad (figura 11) con respecto a la técnica recuento en placa fueron parecidos con las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} con la dilución 10^{-6} no hubo recuperación del hongo. Con respecto a la técnica petrifilm no se realizó el conteo de las esporas/mL con las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} ya que el recuento fue muy numeroso, pero con la dilución 10^{-6} sí.

Para ver si existía alguna diferencia significativa entre las dos técnicas evaluadas se realizó el análisis estadístico basado en la distribución de t- Student (realizándolo solo para *Candida albicans* debido a que solo con la levadura se

obtuvo recuento con las dos técnicas y con las diluciones trabajadas), en la hoja de cálculo microsoft excel, para lo cual, se manejó una distribución de dos colas, con un índice de confianza del 95 % y una significancia de 0,05; es decir, cada cola con un 0,025 y grados de libertad de 4. Donde se plantearon dos hipótesis

Hipótesis nula: No hay diferencia significativa en los recuentos obtenidos por las técnicas recuento en placas y placas de Petrifilm.

Hipótesis alternativa: Hay diferencia significativa en los recuentos obtenidos por las técnicas recuento en placas y placas de Petrifilm.

El T tabulado arrojó un valor de significancia de 0.034, por lo que se acepta la hipótesis nula, es decir que no existe diferencia significativa entre los recuentos obtenidos por la técnica recuento en placa y placas de Petrifilm.

6. CONCLUSIONES

- Los análisis microbiológicos de Aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras realizados rutinariamente en el laboratorio de calidad permitieron comprender la importancia que tienen para los productos elaborados, ya que aseguran su inocuidad, permitiendo determinar si el producto es apto o no para los consumidores.
- El estado higiénico sanitario de los manipuladores como de las superficies permiten minimizar el riesgo de contaminación cruzada para garantizar un producto seguro y de buena calidad.
- Se aplicaron las técnicas recuento en placas y placas de petrifilm para la enumeración de aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras aplicándolas bajo los criterios establecidos por el área de control de calidad.
- En la verificación de la técnica recuento en placa y placas de petrifilm no existen diferencias significativas para el aislamiento de la levadura *Candida albicans*.
- La verificación con la técnica recuento en placa para la cuantificación de *A. brasiliensis* se vio afectada por factores externos como la concentración del inóculo.

7. RECOMENDACION

- Para la estandarización del inóculo de *Candida albicans* se recomienda trabajar con cámara de Neubauer para ajustar mejor la concentración, en vez de usar el patrón McFarland que es más utilizado para realizar concentraciones bacterianas.
- Se recomienda realizar nuevos ensayos de repetibilidad y reproducibilidad trabajando con otros tipos de mohos y levaduras, como también con otras concentraciones que permitan garantizar con mayor confianza la veracidad del método.
- Para el recuento de mohos y levaduras se recomienda incubar estos microorganismos bajo condiciones de temperatura adecuadas (25°C), actualmente el laboratorio de control de calidad no cuenta con una incubadora para este tipo de microorganismos y se dejan a temperatura ambiente lo que hace que sea más demorado el crecimiento.

8. GLOSARIO

Exactitud: se entiende como la cercanía que presenta un resultado en comparación con un valor de referencia.

Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento experimental repetidas veces bajo las condiciones establecidas. Dentro de este parámetro se engloban la repetibilidad y reproducibilidad

Repetibilidad: Es la medida de concordancia que obtiene un analista bajo las mismas condiciones de laboratorio. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición, utilizado bajo las mismas condiciones, el mismo lugar, repetición en un período corto de tiempo.

Reproducibilidad: Es el grado de concordancia entre resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, bajo condiciones específicas. (Diferentes analistas, diferentes días, etc.)

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernandez, A. P. (2006). Determinación del índice de bacterias mesofilas aerobias presentes en la leche cruda versus leche pasteurizada que se comercializan en la zona urbana de la ciudad de popayan.
2. Icontec. (2005). Norma Técnica Colombiana Ntc-Iso / Iec 17025 (p. 49). Retrieved from https://www.invima.gov.co/images/pdf/red-nal-laboratorios/resoluciones/NTC-ISO-IEC_17025-2005.pdf.
3. Ministerio de Salud. (1997). Decreto 3075 de 1997. 3075, (Ley 09 de 1979), 58. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
4. Ministerio de la proteccion social. (2006). Decreto No. 616 del 28 de febrero de 2006. Reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país.
5. Ministerio de agricultura y desarrollo rural MADR. (2012). Resolución 000017 de 2012.
6. Invima. (1986). Resolución 2310 de 1986. *Invima*, 1986, 1–41. <https://doi.org/10.1080/0161-118691860912>.
7. Ministerio de Salud y de la Protección Social. (2011). Resolución Número 333 De 2011. *Ministerio de Salud y La Protección Social*, 2011(47), 56.
8. Ministerio de la Protección Social, & Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. (2017). Resolución Numero 2115. *Minambiente*, 23. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
9. Icontec. (2009). Norma Técnica Colombiana Ntc 4092, (571), 85.
10. AOAC. (2002). (Applicable to enumeration of total yeasts and molds in foods.) See Tables 997.02A and B for the results of the interlaboratory study supporting the acceptance of the method., 806(March), 2002. Retrieved from <http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/FoodAOAC-997.02.pdf>.
11. Garedew L, Berhanu A, Mengesha D, Tsegay G. Identification of gram-negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gondar town and its suburbs, Ethiopia. *BMC public health*. 2012.

12. Hill B, Smythe B, Lindsay D, Shepherd J. Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 157(2): 305-8.
13. Robinson TJ, Scheffel JM, Smith KE. Raw milk consumption among patients with non-outbreak-related enteric infections, Minnesota, USA, 2001-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2014; 20(1): 38-44.
14. Guerrero Quiceno Jorge Humberto (2017). Identificación de la Población Bacteriana en Leche de Tanque, Recuento de Células Somáticas y su Asociación con 11 Variables en Hatos en el Valle del Cauca.
15. Alonso Nore, L. X., & Poveda Sánchez, J. A. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm para el análisis de alimentos, 19–180. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>.
16. Campuzano S., Mejía D., & Madero C. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. 13, 81–92. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n23/v13n23a08.pdf>.
17. Pierson M. & Smoot L. (2001) Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. USA. 71-87.
18. Riquelme Retamal, V. H. (2015). verificación de un método alternativo para la detección de *Salmonella spp* . en matrices de alimentos.
19. Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., & Velázquez, O. (2009). Método para la determinación de bacterias coliformes , coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP). *Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos*, 2, 117. https://doi.org/http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archive/ro/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli NMP_6529.pdf.
20. Rios Ccolque, K. R., & Riquez Alvaro, I. K. (2007). Determinación del recuento microbiano de productos derivados de la maca (*Lepidium meyenii W.*) utilizando placas petrifilm y su comparación con el método convencional.
21. Padilla, J. E. (2007). Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Pontificia Universidad Javeriana. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

22. Petrifilm, P. (2000). Placas Petrifilm 3M Placas Petrifilm, 150. Retrieved from <http://multimedia.3m.com/mws/media/444944O/petrifilm-aerobic-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf>.
23. 3M. Higiene por Bioluminiscencia, 1–9.
24. Carrillo, E., & Lozano, A. (2008). Validación del metodo de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis203.pdf>.
25. Jaimes Jáuregui Blanca Yazmín. (2017). Validación del método de recuento en placa para la detección de mohos y levaduras empleando dos medios de cultivo en pasteurizadora santo domingo S.A.
26. Rosario, U. N.D. (2017). guía de trabajos prácticos, 1–62.
27. Tanaka, K. (2012). *Candida albicans*. DataBio, 12(34), 2433–2442. <https://doi.org/10.1128/AAC.01366-12>.
28. Menéndez, A. (2013). Validación y cálculo de incertidumbre para la determinación de microorganismos indicadores, mediante microbiología clásica y NMP automatizado, en matrices cárnicas, 45. Retrieved from http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17940/6/TFM_AlejandraVMenendez.pdf

10. ANEXOS

Anexo 1: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	DICIEMBRE				ENERO				FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inducción a la compañía Pasteurizadora Santo Domingo																																
Inducción laboratorio de Calidad																																
Análisis microbiológico a leche Cruda																																
Análisis microbiológico Leche UHT																																
Análisis microbiológico leche Saborizada UHT																																
Análisis microbiológico Avena UHT																																
Análisis microbiológico productos lácteos fermentados																																
Análisis microbiológico Materia prima																																
Análisis microbiológico Leche termizada																																
Análisis microbiológico Pasteurizador																																
Análisis microbiológico Crema de leche																																
Control de Ambientes																																
Control Manipuladores																																
Control de Superficies																																
Análisis microbiológicos de Aguas																																
Verificación de técnica tradicional y rápida Petrifilm 3M, para el recuento de mohos y levaduras.																																
Elaboración informe de grado																																
Sustentación Trabajo de Grado																																
Revisión Bibliográfica																																

Anexo 2: Clasificación de la leche según contenido de grasa

Leche	% grasa m/v			
	Pasteurizada	Ultrapasteurizada	UAT(UHT9)	Esterilizada
Entera	3.0	3.0	3.0	3.0
Semidescremada	1.5 – 2.0	1.5 – 2.0	1.5 – 2.0	1.5 – 2.0
Descremada	0.1 – 0.5	0.1 – 0.5	0.1 – 0.5	0.1 – 0.5

Fuente: Decreto 616 del Ministerio de la protección social.

Anexo 3: Clasificación del yogurt según contenido de grasa

Yogurt	Entera	Semidescremado	Descremado
Materia grasa %m/m	Mín.2.5	Mín.1.5	Máx.0.8
Sólidos lácteos no grasos %	7.0	7.0	7.0
Acidez como ácido láctico %	0.70 -1.50	0.70 -1.50	0.70 -1.50
Prueba de fosfatasa	Negativa	Negativa	Negativa

Fuente Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud

Anexo 4: Clasificación del Kumis según contenido de grasa

Yogurt	Entera	Semidescremado	Descremado
Materia grasa %m/m	Mín.2.5	Mín.1.5	Máx.0.8
Sólidos lácteos no grasas %	7.0	7.0	7.0
Acidez como ácido láctico %	0.60 -1.20	0.60 -1.20	0.60 -1.20
Prueba de fosfatasa	Negativa	Negativa	Negativa

Fuente Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud

Anexo 5: Resultados obtenidos a partir de la estandarización del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 de la validación.

Medio de cultivo	Dilución	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Agar YGC	UFC	TNTC	TNTC	123	58	8	1,5855	0,6131	0,387
	Log₁₀	N/A	N/A	2,090	1,763	0,903			

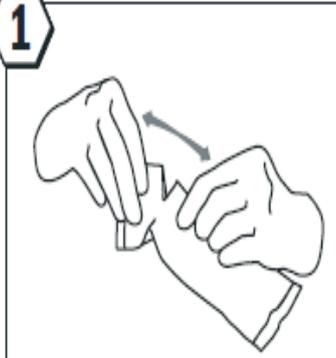
Fuente: (Jaimes Jáuregui Blanca Yazmín, 2017)

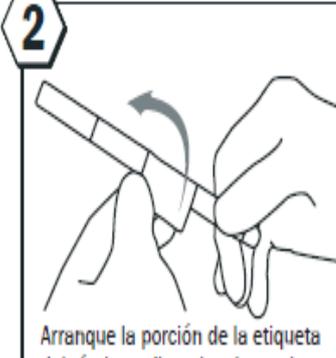
Anexo 6: Resultados obtenidos a partir de la estandarización del inóculo de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

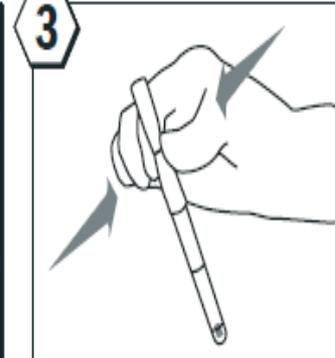
Medio de cultivo	Dilución	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Prom	Des estándar	Coefficiente de variación
Agar YGC	UFC	TNTC	TNTC	30	12	2	0,9524	0,5982	0,628
	Log₁₀	N/A	N/A	1,477	1,079	0,301			

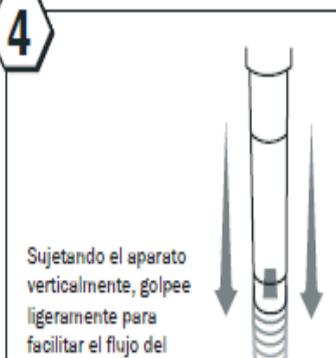
Fuente: (Jaimes Jáuregui Blanca Yazmín, 2017)

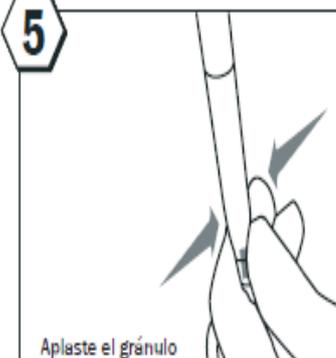
Anexo 7: Reactivación de las cepas liofilizadas.

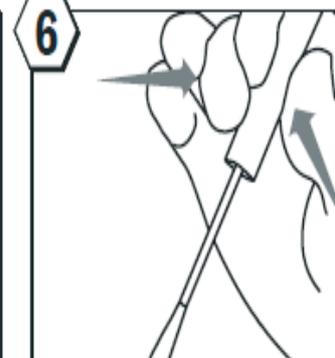
- 

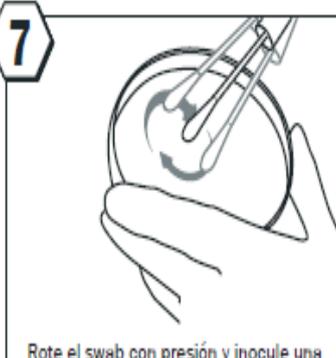
Abra la bolsa en el corte y remueva el KWIKSTIK™.
- 

Arranque la porción de la etiqueta del rótulo y adjuntela a los registros de CC o a la placa de cultivo primario.
- 

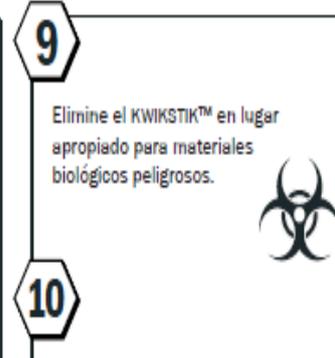
Libere el fluido hidratante por medio de una acción de presión o pellizco en la parte inferior de la tapa de la ampolla.
- 

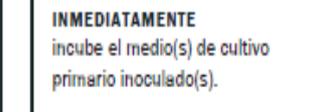
Sujetando el aparato verticalmente, golpee ligeramente para facilitar el flujo del fluido a través de la pasaje hasta la parte inferior del aparato.
- 

Aplaste el gránulo y mezcle con el fluido, usando una acción de pellizco.
- 

INMEDIATAMENTE sature el swab en el material hidratado.
- 

Rote el swab con presión y inocule una área circular de aproximadamente 25 mm de diámetro en la(s) placa(s) de cultivo primario.
- 

Utilizando una alza estéril, haga unas 10-20 rayas repetidamente a través de la área inoculada para facilitar aislamiento de colonia.
- 

Elimine el KWIKSTIK™ en lugar apropiado para materiales biológicos peligrosos.
- 

INMEDIATAMENTE incube el medio(s) de cultivo primario inoculado(s).

Anexo 8: Puntos de muestreos para los análisis microbiológicos asignados por el laboratorio de control de calidad.

Puntos de muestreo		Frecuencia	Semana			
			1	2	3	4
Materia prima	Carrotanques rutas	Quincenal	X		X	
	Insumos y material de empaque	Cada vez que llegue un lote nuevo.	X	X	X	X
Leche termizada	Silos de almacenamiento	Semanal	X	X	X	X
Pasteurizador	Salida de Pasterizador	Semanal	X	X	X	X
Crema de leche	Tubo salida de crema	Quincenal	X		X	
Ambientes	Áreas de procesamiento y empaque de los productos	Mensual		X		
Manipuladores	Manipuladores	Mensual		X		
Superficies	Silos de almacenamiento	Cada vez que se realice lavado de los silos. Una muestra por silo	X	X	X	X
	Carrotanques rutas	Mensual				X
	Cestillos		Dos cestillos después de Lavados			
Aguas	Puntos de muestreos	Mensual		X		

Fuente: Autor

Anexo 9: Análisis microbiológicos realizados a los Puntos de muestreo

Puntos de muestreo	Análisis				Método	Dilución
	AM	CT/CF	MYL	<i>Pseudomona</i> spp		
Materia prima	✓	✓	✓	-	Petrfilm Recuento en placa	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³
Ambientes	✓	-	✓	-	Recuento en placa	-
Manipuladores	✓	✓	-	-	Frotis	Directo
Superficies	✓	✓	-	-	Frotis Luminometría	Directo
Aguas	✓	✓	-	✓	Filtración por membrana	Directo

AM: Aerobios mesófilos, CT: Coliformes totales, CF: Coliformes fecales, M y L: Mohos y Levaduras

Fuente: Autor

Anexo 10: Análisis microbiológico realizado a la leche cruda, procesada y sus derivados

Producto		Análisis				Método	Dilución
		AM	CT/CF	MyL	EC		
Leche	Cruda	✓	-	-	-	Petrifilm	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴
	Pasteurizada	✓	✓	-	-	Petrifilm Recuento en placa	10 ⁻² - 10 ⁻³
	Entera UHT	✓	-	-	✓	Petrifilm	Directo
	Descremada deslactosada UHT	✓	-	-	✓	Recuento en placa	
	Semidescremada deslactosada UHT	✓	-	-	✓		
Derivados lácteos	Kumis	-	✓	✓	-	Petrifilm	10 ⁻¹
	Yogur entero	-	✓	✓	-	Recuento en placa	
	Bebida láctea	-	✓	✓	-		
	Saborizada UHT	✓	-	-	✓	Recuento en placa	Directo
	Avena UHT	✓	-	-	✓	Recuento en placa	
	Crema de leche Pasteurizada	✓	✓	✓	-	Petrifilm Recuento en placa	10 ⁻² - 10 ⁻³

AM: Aerobios mesófilos, **CT:** Coliformes totales, **CF:** Coliformes fecales **M y L:** Mohos y Levaduras, **EC:** Esterilidad comercial.

Fuente: Autor