

**VERIFICACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE ESTÁNDARES MICROBIOLÓGICOS EN LA
INDUSTRIA LÁCTEA ALIVAL S.A**

CINDY LORENA JAIMES BLANCO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER**

2019

**VERIFICACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE ESTÁNDARES MICROBIOLÓGICOS EN LA
INDUSTRIA LÁCTEA ALIVAL S.A**

CINDY LORENA JAIMES BLANCO

TRABAJO DE GRADO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MICROBIÓLOGA

**Tutor empresarial
SANDRA ZAPATA BOLAÑOS, MICROBIÓLOGA**

**Tutor académico
FANNY HERRERA, PH. D**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER**

2019

Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

Pamplona (Norte de Santander - Colombia), Agosto 2019

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1.	Objetivo general.....	2
2.2.	Objetivos específicos.....	2
3.	MARCO TEÓRICO	3
3.1.	ANTECEDENTES	3
3.2.	MARCO LEGAL	3
3.3.	MARCO CONCEPTUAL	5
3.3.1.	Leche cruda.....	5
3.3.1.1.	Definición de leche	5
3.3.1.2.	Producción nacional de leche	5
3.3.1.3.	Microorganismos de la Leche cruda.....	6
3.3.1.4.	Calidad microbiológica de la leche	7
3.3.2.	Leche ultra-alta-temperatura (UHT).....	8
3.3.3.	Mantequilla.....	10
4.	METODOLOGÍA.....	11
4.1.	Recuento de aerobios mesófilos a muestras de leche cruda	11
4.2.	Análisis microbiológico de la mantequilla.....	12
4.2.1.	Recuento <i>E. coli</i> – coliformes, Mohos y Levaduras y <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positivo	12
4.2.2.	Detección de <i>Salmonella</i> spp.	13
4.3.	Esterilidad comercial	13
4.4.	Control microbiológico interno de la planta	14
4.4.1.	Análisis ambiental.....	14
5.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	15
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
6.1.	Análisis microbiológico de la materia prima	16
6.2.	Esterilidad Comercial.....	19
6.3.	Análisis microbiológico de la Mantequilla	20
6.4.	Control microbiológico interno de la planta	22
7.	CONCLUSIONES	26
8.	RECOMENDACIONES	27

BIBLIOGRAFIA	28
ANEXOS.....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tomado del Decreto 1880 de 2011

Tabla 2. Análisis llevados a cabo para los diferentes productos.

Tabla 3. Porcentaje de proveedores que realizan ordeño mecánico y análisis de la calidad higiénica (recuento de bacterias mesófilas aerobias) de la leche analizada.

Tabla 4. Cantidad muestras de leche UHT que presentaron crecimiento de *Bacillus sporothermodurans* en la prueba de esterilidad comercial durante el periodo de Marzo-Mayo.

Tabla 5. Recuentos microbiológicos realizados a la mantequilla durante el periodo de Marzo-Junio.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Promedio del recuento de bacterias mesófilas en las diferentes rutas que llegan a la planta Vs el Índice Máximo permitido internamente.

Gráfica 2. Análisis ambiental a las Áreas Blancas y Grises de la planta.

Gráfica 3. Muestras positivas para *Listeria* spp. durante el periodo de Marzo-Junio.

.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema de aseguramiento de calidad de los alimentos incluye todas las actividades que se llevan a cabo para asegurar la inocuidad del producto en todas las etapas, desde la producción primaria, pasando por la elaboración y almacenamiento, hasta la comercialización y el consumo. Brindándole al cliente un producto de calidad, nutritivo y seguro.

Alimentos del Valle (Alival S.A) es una empresa láctea, la cual cuenta con una amplia gama de productos y derivados lácteos. Su marca San Fernando es muy reconocida los departamentos al sur de Colombia y se caracteriza por crear productos enfocados a la población infantil.

El Decreto 616 del 2006 del Ministerio de Salud de Colombia establece a la leche y sus derivados como uno de los alimentos de mayor riesgo en salud pública, y por lo tanto, éstos deben cumplir con los requisitos que se establezcan para garantizar la protección de la salud de los consumidores. Para asegurar la calidad higiénica de estos productos se debe partir desde la materia prima, ya que, el contenido microbiano de la leche cruda se transfiere en gran medida a los productos incidiendo en la vida útil del producto terminado; adicionalmente, la calidad higiénico-sanitaria se ve afectada por la presencia de microorganismos que pueden estar presentes durante el proceso de producción, en el ambiente, equipos, manipuladores, deficientes condiciones sanitarias del agua potable, procesos de limpieza y desinfección inadecuados, entre otros, pueden incrementar la proliferación microbiana. Por lo anterior, todos estos factores deben controlarse para asegurar que los productos se fabriquen bajo condiciones sanitarias adecuadas, minimizando así los riesgos de contaminación, con el propósito de que los productos cumplan con los estándares de calidad que exige el Decreto 616 del 2006.

Una problemática a nivel mundial son las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) que son provocadas por la ingesta de alimentos no inocuos. Esto genera, además de las implicaciones sobre la salud pública, desconfianza en los consumidores y se ve afectado el prestigio y la economía de la empresa. Por lo tanto, es indispensable controlar los diversos factores microbiológicos asociados a la obtención de los productos alimentarios, mediante el cumplimiento de los sistemas de aseguramiento de la calidad bajo la normativa pertinente, garantizando que los productos que salen al mercado no generen ningún riesgo para la salud de los consumidores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Verificar el cumplimiento de los estándares microbiológicos estipulados por la normatividad colombiana en la industria láctea Alival SA.

2.2. Objetivos específicos

Establecer la calidad microbiológica de la materia prima láctea teniendo en cuenta el decreto 1880 de 2011.

Determinar el cumplimiento de los requisitos microbiológicos establecidos en el Decreto 616 del 2006 para leche UHT y la Resolución 2310 de 1986 para mantequilla.

Evaluar la calidad microbiológica del ambiente en diferentes áreas de la planta de procesamiento.

Verificar el cumplimiento y la validez de los planes de limpieza y desinfección de equipos y superficies mediante la determinación de *Listeria* spp.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES

Alimentos del Valle S.A. (Alival S.A) es una empresa dedica al procesamiento de lácteos, derivados lácteos y bebidas, además de la comercialización de otros productos alimenticios con 59 años en la industria. En la actualidad tiene presencia en los departamentos del Valle del Cauca, Nariño, Choco, Cauca, Eje Cafetero, Ibagué, Tolima, Huila y Bogotá.

Inició en 1952 como Pasteurizadora del Valle. Con la entrada de nuevos socios, dio paso a Alimentos del Valle (Alival) en 1981. Actualmente cuenta con 2 plantas procesadoras: en Pereira (derivados lácteos) y en el Parque Industrial y comercial del Cauca, esta última certificada con ISO 9001 y BPM; y 3 centros de acopio. En la planta Caloto, se producen: leches, leches saborizadas, avena, mantequillas y maquilas de diferentes productos lácteos. Además, presenta 5 marcas: San Fernando, La Perla, Tampico, My Aloe y Clarity Water.

La calidad e inocuidad de cada producto elaborado están evaluadas y certificadas mediante el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura y el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP). Con relación a los diferentes análisis microbiológicos llevados a cabo en el laboratorio de esta industria se rigen por lo establecido por el Ministerio de Salud de Colombia en los decretos 616 del 2006 y la Resolución 2310 de 1986.

En Colombia actualmente no hay normatividad que establezca los rangos microbiológicos con la que la leche cruda deba ser aceptada en una planta de procesamiento, por lo tanto en Alival SA, se realizan estudios microbiológicos semestrales de los proveedores, estableciendo los índices máximos permitidos para las rutas, pero esto con el fin del pago a proveedores por la calidad de la leche.

Para el caso de la calidad microbiológica de los ambientes de áreas controladas Alival SA se rige por propios parámetros internos que se han establecido por estudios anteriores, ya que no hay normativa para estos casos.

3.2. MARCO LEGAL

AOAC, Official method 990.12 Permite ser tomada como referencia para llevar a cabo el método de recuento en placa utilizando el método en lámina rehidratable para aerobios mesófilos (Petrifilm 3M) (AOAC, 2002).

AOAC, Official Methods 997.02. Está contemplado en la metodología para realizar el recuento en placa para Mohos y Levaduras. Método en lámina rehidratable. (AOAC, 2002).

AOAC Official Methods 2014.01. Establece como se debe realizar la metodología para la identificación de *Salmonella* en alimentos (Petrifilm 3M). (AOAC, 2014).

Ministerio de la Protección Social, Decreto 616 del 2006, establece 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 (Ministerio de la Protección Social, 2006) .

Ministerio de la Protección Social, Decreto 2838 de 2006, Fija las características microbiológicas que debe cumplir la leche cruda para consumo humano (Ministerio de la Protección Social, 2006).

Ministerio de la Protección Social, Decreto 1880 De 2011. Se contemplan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional. (Ministerio de la Protección Social, 2011).

Merck Millipore, Método de detección y Cuantificación de Microorganismos aerobios. Agar PCa. (Agar Plate-Count) Manual 12 Edición."

Merck Millipore, Método de detección y Cuantificación de Microorganismos aerobios. Agar YGC. (Agar Extracto de Levadura Cloranfenicol) Manual 12 Edición.

INCONTEC, Norma Técnica Colombiana NTC 4433 del 2015, donde se contempla el método para evaluar la esterilidad comercial en alimentos (INCONTEC, 2015).

INCONTEC, Norma Técnica Colombiana NTC 1419 del 2004, está contemplado los requisitos que deben cumplir las especias la leche prima saborizada en cuanto características organolépticas, fisicoquímicos y microbiológicas (INCONTEC, 2004).

INCONTEC, Norma Técnica Colombiana NTC 399 del 2002, establece la calidad microbiológica que debe cumplir la leche cruda tomada en hato (INCONTEC, 2002).

Ministerio de la Protección Social, Resolución 2115 del 2007 donde se dictan cada una de las condiciones y cada control que debe ser de obligatorio cumplimiento para el agua que está destinada para el consumo humano (Ministerio de la Protección Social, 2007).

Ministerio de Salud, Resolución 2310 de 1986 donde está contemplado los requisitos que debe cumplir los derivados lácteos en cuanto características fisicoquímicas y microbiológicas (Ministerio de Salud, 1986).

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Resolución 000012 de 2007, donde se relaciona con el sistema de precios en cuanto a la calidad y el funcionamiento del mercado lácteo en Colombia (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2007).

3.3. MARCO CONCEPTUAL

3.3.1. Leche cruda

3.3.1.1. Definición de leche

De acuerdo con el Decreto 616 del 2006 expedido por el Ministerio de salud y Protección social, la leche cruda está definida como la leche que no ha sido sometida a ningún tipo de terminación ni higienización (Ministerio de la Protección Social, 2006).

El Codex Alimentarius define que la leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior (Codex Alimentarius, 1999).

3.3.1.2. Producción nacional de leche

El sector lechero en Colombia es un sector sumamente importante para la economía nacional. Las estadísticas oficiales que genera FEDEGAN muestran que en el país se ha incrementado la producción de leche entre el 2015 con 6773 millones de litros a 7257 millones de litros de leche en el 2018 (FEDEGAN, 2018a). Esto se ve reflejado con el aumento en las ventas de leches UHT y quesos durante el periodo 2011 al 2016. Teniendo un crecimiento anual del 8,1% el consumo de leche UHT (ASOLECHE, 2017).

En Colombia en el 2018, 1,5 millones de cabezas de ganado fueron destinadas a la producción de leche, 8,2 millones fue destinado a doble propósito y 9,1 millones cabezas de ganado fueron destinados a cría de acuerdo con las cifras reportadas por FEDEGAN. El consumo de leche transformada industrialmente, sigue siendo bajo en los estratos socioeconómicos bajos y medios. La población Colombiana consume 140 litros de leche al año por persona (solo 67 litros de leche higienizada), cuando la FAO recomienda consumir 180 litros de leche por persona al año (leche higienizada) (FEDEGAN, 2018).

Por lo anterior, La Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN) y el Fondo Nacional de Ganado (FNG), están promoviendo las buenas practicas ganaderas, incentivando a los ganaderos para lograr altos estándares productivos. Debido a la globalización ha surgido la necesidad de reconvertir la ganadería colombiana en sistemas de producción más competitivos, proyectada a satisfacer las necesidades de sus clientes, garantizando la calidad e inocuidad del producto final (Fedegan, 2013).

La ganadería colombiana, participa aproximadamente con un 6% del PIB Nacional, aporta el 21,8% del PIB agropecuario y aporta el 48,7% del PIB pecuario (FEDEGAN, 2018). La producción ganadera en Colombia ha ido mejorado en los últimos años, viéndose reflejado en nuevas razas, mejores pastos y nutrientes para la alimentación de los animales(Cuenca, Chavarro, & Díaz, 2008).

El acopio informal en Colombia representa cerca del 46% de la leche producida (MINCIT & MADR, 2016). Hay un promedio diario de producción de 19,6 millones de litros de leche(Ministerio de Agricultura, 2018). Uno de los desafíos que enfrenten los productores

de leche a pequeña escala se relacionan con producir leche con altos estándares higiénicos por causas como la manipulación, comercialización, la falta de incentivos financieros para introducir mejoras en la calidad, y la poca concientización de prácticas de higiénicas en la materia prima (GARCÍA, 2015).

3.3.1.3. Microorganismos de la Leche cruda

Los microorganismos que se encuentran en la leche, no son microorganismos propios de ella, se encuentran allí con consecuencia de la contaminación, por ende la leche no tienen flora bacteriana característica de ella. La ubre de una vaca nunca es bacteriológicamente estéril, tiene microorganismos que invaden los conductos lácteos de las tetillas (BUÑAY & PERALTA, 2015).

La leche es rica en nutrientes, con una actividad acuosa alta (>0.98) y un pH cercano a la neutralidad, por lo tanto, es muy susceptible a la proliferación por microorganismos, afectando su inocuidad. Estos pueden llegar a la leche a partir del medio ambiente o de los mismos animales. Los microorganismos que se desarrollan en la leche pueden clasificarse en alterantes, patógenos y los benéficos que se emplean comúnmente en las fermentaciones (GARCÍA, 2015). Entre los microorganismos patógenos se encuentran *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* (FAO, 2019).

Según datos de la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) desde el año 2007 hasta el 2016 en Estados Unidos fueron reportados 144 brotes de ETAs vinculados al consumo de leche cruda y sus derivados. El 46% de la población afectada fueron niños menores a 5 años. Siendo los principales agentes patógenos *Salmonella* spp. en un 19% y *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga en un el 15 % (CDC, 2019).

En España, durante el 2002 y 2012 se notificaron 226 brotes por el consumo de leche, y productos lácteos (excluyendo queso, nata y mantequilla), 19 de los brotes fueron asociados con el consumo de leche cruda; se notificaron 12 personas hospitalizadas, todas ellas infectadas con *Brucella* spp., y ninguna defunción en el periodo estudiado (Espinosa et al, 2014).

Según la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá (2015), en el 2012, ocurrieron en Colombia 173 brotes causados por el consumo de leche y productos lácteos y sus derivados, donde los niños de 5 a 14 años fue la población que resulto más afectada, y el 57% de los casos fueron hombres. Este mismo año se realizó un estudio donde se analizaron 600 muestras de leche bovina del sistema de producción doble propósito colombiano, se observó que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 fue de un 3,7%, para *Salmonella* spp., fue del 0,82% y *L. monocytogenes* con el 0,3% (Patiño, 2012). En el municipio de Cali (Valle del Cauca) en el 2013, en un establecimiento militar, ocurrió un brote causado por *L. monocytogenes* afectando a 55 personas, ninguno de los casos

requirió hospitalización. No se procesaron muestras de alimentos, sin embargo, la tasa de ataque más alta por alimento fue para huevos y leche. Se analizaron muestras de materia fecal por métodos moleculares, las cuales todas fueron positivas para *L. monocytogenes* (Hernández Porras et al., 2018).

Otro tipo de microorganismos que se pueden encontrar en la leche son las bacterias ácido-lácticas que producen ácido láctico como metabolito primario del producto de la fermentación de la lactosa. También se utilizan en la industria de los alimentos como cultivos iniciadores, porque contribuyen al sabor, aroma, textura y el valor nutricional por la producción de exopolisacáridos (Parra, 2010). De otra parte los microorganismos Aerobios Mesófilos incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 15 – 45°C, con un óptimo de 35°C, siendo la mínima de 15 a 20 °C y la máxima de 45°C. Altos recuentos de estos microorganismos en los alimentos no fermentados a menudo indican materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario (BUÑAY & PERALTA, 2015).

3.3.1.4. Calidad microbiológica de la leche

La calidad microbiológica de la leche tiene su origen a nivel de la producción primaria. Los factores que pueden incidir en la contaminación de la leche producida son principalmente: la salud e higiene de las vacas, las prácticas de ordeño (lavado y desinfección de pezones), el ambiente donde se ordeñan los animales, limpieza de la ordeñadora y equipamiento que toma contacto con la leche y el almacenamiento de la leche (Molineri et al., 2009a). En consecuencia, bajo deficientes condiciones sanitarias, se pueden obtener altos recuentos microbiológicos y de Células Somáticas, que son los parámetros utilizados para evaluar la calidad de la leche cruda.

La calidad de los productos lácteos refleja en gran medida de la calidad de la materia prima, por lo tanto es el principal factor determinante. Cuando la leche llega con una alta carga de bacterias contaminantes se ve afectada la vida útil de los productos elaborados, afectando, además, su calidad organoléptica y nutricional. Por esta razón, el aumento de microorganismos contaminantes aumenta el riesgo de contaminación de la leche por patógenos así como el crecimiento de los mismos en los productos terminados representando, adicionalmente, grandes pérdidas económicas (BUÑAY & PERALTA, 2015).

La leche debe llegar a la industria con un número bajo de bacterias que no sobrepasen los valores permitidos en recuento de bacterias aerobias mesófilas (ver tabla 1) y estar libre de patógenos, sustancias extrañas, sin adulterantes, espesantes, medicamentos, colorantes, sin agua adicionada y sin sustancias que puedan modificar el contenido de grasa (GARCÍA, 2015). No debe contener residuos ni sedimentos; no debe ser insípida ni tener color y olor anormales, ni contener sustancias químicas (por ejemplo, antibióticos y detergentes), y composición y acidez normales (González et al, 2014) .

Tabla 1. Tomado del Decreto 1880 de 2011

REQUISITO	LÍMITE
Recuento microorganismos mesófilos, UFC/mL, max	700.000

Fuente: Tomado del Decreto 1880 de 2011

Para obtener leche cruda inocua se deben aplicar las Buenas Prácticas Higiénicas (BPH) a lo largo de todas las etapas del proceso, la obtención, recolección, transporte y comercialización de la leche (Acosta, 2011). El Codex Alimentarius en el Código Internacional Recomendado de Prácticas – Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969)(Codex Alimentarius, 2003) y el Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos (CAC/RCP 57-2004)(Codex Alimentarius, 2009), plasma los requisitos mínimos para obtener materia prima y productos lácteos con características que garanticen su seguridad e inocuidad.

En Colombia la calidad sanitaria de la leche varía según la región del país, principalmente debido a las condiciones ambientales y el acceso a la tecnología, entre otras. En regiones de trópico bajo (departamentos calurosos), gran parte de los ordeños se realizan de manera manual, en condiciones poco óptimas como pisos de tierra y lugares no cubiertos, a comparación de las regiones del trópico alto (regiones frías) que cuentan con mayor tecnología para realizar el ordeño, mejores procedimientos de ordeño y cuentan con mejores lugares e infraestructura para el ordeño, obteniendo así mejores características sanitarias en la leche (Arboleda & Echeverri, 2017).

Un estudio realizado por González et al, (2014) sobre la calidad de la leche cruda nacional para el consumo humano, observó que solamente en Bogotá y el departamento de Antioquia se cumplía con el parámetro de calidad total, teniendo mayor efecto el recuento de bacterias mesófilas aerobias. Por lo que se dedujo que la mayoría de productores menores estaban fallando en la limpieza y desinfección de los residuos de leche en los implementos usados para la obtención y almacenamiento de la leche, o ubres sucias o no higienizadas previo al ordeño y la no refrigeración rápida de la leche.

3.3.2. Leche ultra-alta-temperatura (UHT)

En el Decreto 616 de 2006 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, comercialice, expendan, importe o exporte en el país”. Luego En el Capítulo V, artículo 15 se define la clasificación de las leches de acuerdo con su proceso de fabricación, estas pueden ser pasteurizadas, ultrapasteurizadas, ultra alta temperatura (UAT), leche larga vida, esterilizada, en polvo y deslactosada (MPS, 2017).

En el Título II, Capítulo, I define: “Leche ultra-alta-temperatura UAT (UHT) leche larga vida”, como: 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 (MPS 2017).

En los últimos años la industria láctea ha presentado un problema en cuanto al cumplimiento de dicho decreto, al tener resultados no satisfactorios respecto a la prueba de esterilidad comercial, la cual “Después de incubar durante 10 días no debe presentar crecimiento microbiano a 35 °C y 55 °C”, obteniéndose resultados positivos para la presencia de microorganismos productores de esporas altamente resistentes a los tratamientos de ultra pasteurización (HHRS). *Bacillus sporothermodurans* es un microorganismo formador de esporas altamente resistente al calor (denominado HHRS o HRS). Actualmente, es un problema a nivel mundial en la industria láctea ya que se considera que la leche UHT es un nuevo nicho ecológico para *B. sporothermodurans* debido a la falta de competencia de otros organismos en este producto (Calderón, García, & Martínez, 2006).

B. sporothermodurans no es patógeno y no causa cambios organolépticos en los productos UHT, pero aun así es considerado indeseable porque es la principal causa de concepto de “no satisfactoria” en la prueba de esterilidad comercial y por ende no permite el cumplimiento de los requisitos legales establecidos. Un estudio realizado en Bogotá propone que una posibilidad por la que se da la presencia de *Bacillus sporothermodurans* en la leche UHT es la supervivencia de sus esporas ya que el tiempo de contacto en el tubo de calentamiento es tan corto que el tratamiento térmico no alcanza a ser efectivo para destruirlas (Castañeda, 2015). Se ha considerado que la solución para este problema debería ser aumentar los tratamientos térmicos al procesar la leche, pero es inviable ya que se verían afectadas las características organolépticas y nutricionales de la leche.

Por otra parte, *Bacillus cereus* es un microorganismo patógeno que puede encontrarse en leche UHT, debido a varios factores, principalmente su capacidad para producir esporas resistentes al calor que pueden soportar el tratamiento UHT, y la contaminación de los alimentos después del tratamiento, como es el envasado inadecuado de la leche que permite la entrada de microorganismos (Vidal et al., 2015). A este respecto, en Brasil, se analizaron muestras de leche (30 de leche cruda, 30 de leche pasteurizada, 30 de leche UHT y 30 de leche en polvo) detectando contaminación por *Bacillus cereus* en 50%, 97%, 13%, y 73% respectivamente, lo que comprueba que la contaminación aumentó después del proceso de pasteurización; adicionalmente, esta bacteria tiene el agravante de producir

biofilms en tuberías de leche, favoreciendo de esta forma, la contaminación de la leche después del procesamiento térmico (Rezende-Lago et al., 2007).

A partir de muestras de leche y los productos lácteos se ha logrado aislar hasta el 85% de *B. cereus* enterotoxigénicos. Se han informado incidencias de *B. cereus* en productos lácteos procesados (Sadek, et al, 2006). También se encontró en la leche en polvo de fórmula (41.7%) y las leches de UHT (30%) expandidas en los mercados minoristas en Malasia (Lesley et al, 2017).

3.3.3. Mantequilla

La mantequilla es el producto graso higienizado, obtenido a partir de la crema de leche, adicionado o no de cultivos lácticos específicos y sometida a proceso de batido (Ministerio de Salud, 1986). El contenido de humedad no debe ser mayor porque el efecto conservante de la sal disminuye, permitiendo un mayor crecimiento de los microorganismos, pudiendo ser necesario el uso de conservantes para mantener la estabilidad.

La pasteurización de la crema destruye microorganismos vegetativos alterantes como *Pseudomonas* spp. y *Flavobacterium* spp. y patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *E. coli* 0157, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., además, desnaturaliza enzimas, en particular las lipasas inherentes a la crema cruda o de origen microbiano, mejorando la calidad de conservación. La pasteurización es un punto crítico de control, porque no hay tratamientos de descontaminación adicionales en la fabricación de mantequilla. Cualquier falla en la pasteurización podría llevar a la supervivencia de patógenos. Por ende la calidad microbiológica de la mantequilla depende principalmente de las condiciones higiénicas durante el procesamiento posterior, donde estas deben evitar la multiplicación de los microorganismos que sobreviven a la pasteurización y se minimice la activación de las esporas (Lund et al, 2000).

La crema para hacer mantequilla se lava después de batirla, sin embargo, esto puede resultar en la recontaminación de la mantequilla con microorganismos, por ejemplo, *Pseudomonas nigrificans* que da una coloración negra y *Pseudomonas mephitica* que genera un olor similar a la mofeta y *Pseudomonas fragi*, que causa un sabor a rancio del ácido butírico producido por la hidrólisis de la grasa de la mantequilla. Las levaduras y mohos psicrótróficos se consideran como un índice de limpieza en la mantequilla, estos pueden causar deterioro lipolítico y se controlan manteniendo una baja humedad y buena calidad del aire en el entorno de producción (Adams & Moss, 2008). Los coliformes totales en los productos lácteos generalmente se consideran de origen animal y tienden a indicar la calidad higiénica del producto. Cuanto más cuidadosamente se produzca y manipule la leche, menor será el recuento de coliformes (Ikram, Nuzhat, Sikander, & M.A., 2001).

Entre las medidas higiénicas que se aplican en la planta de procesamiento de mantequilla se tiene: el cerrado del cuarto después de la pasteurización (lo que excluye la contaminación del medio ambiente externo), procedimientos de limpieza y desinfección

adecuados del equipo antes de la puesta en marcha del proceso y el constante control del ambiente en el cuarto, ya que durante el envasado el producto está expuesto al medio ambiente, por lo que el aire debe ser de muy buena calidad para limitar la contaminación del producto con esporas fúngicas.

A la mantequilla que se produce en Alival, se le agrega un porcentaje de sal, esto con el fin de garantizar una mayor eliminación de humedad y una mejor distribución del agua y la sal en toda la fase grasa. La sal es un conservante natural de los alimentos inhibiendo el crecimiento de muchos microorganismos. Sin embargo, hay gran cantidad de levaduras que pueden crecer en presencia de altas concentraciones de sal, a bajo pH y a bajas temperaturas como *Rhodotorula* spp., *Saccharomyopsis lipolytica*, *Candida* spp., entre otras. Los géneros de mohos que causan la descomposición de la mantequilla son: *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Aspergillus* y *Cladosporium* (Lund et al., 2000). Entre los microorganismos patógenos se ha encontrado *L. monocytogenes* en mantequilla y nata con frecuencias que varían entre 0,7 y 8,3%, *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) y *S. aureus* con frecuencias entre 1,6 y 20,3% (Verraes et al., 2015).

4. METODOLOGÍA

4.1. Recuento de aerobios mesófilos a muestras de leche cruda

Se analizaron muestras de leche cruda procedentes de diferentes regiones de Colombia: Bogotá, Darién, Pereira, Pto Boyaca, Bitaco, Cumbal, Norte, Popayán, Timbio, Tuluá, Caloto y Silvia

Las metodologías que se ejecutaron para determinar el recuento de aerobios mesófilos fueron según la AOAC INTERNATIONAL, AOAC Official Methods 990.12. Recuento en placa de aerobios para alimentos. Método en lámina rehidratable (Petrifilm 3M). AOAC, 2016. 17.2.07.

Se tomaron 10 ml del producto y se diluyeron en 90ml de agua peptonada universal al 0,1%, seguidamente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} , y se sembraron 1 ml de dilución 10^{-4} , con ayuda de un dispersor en un Petrifilm para el recuento de aerobios de 3M. Las muestras se incubaron a 35°C, durante 24 ± 2 h y posteriormente el Petrifilm se leyó utilizando el *Petrifilm™ Plate Reader*.

Tabla 2. Análisis llevados a cabo para los diferentes productos

Análisis	Medio de cultivo	Temperatura y tiempo de incubación	Producto	Metodología
Recuento de aerobios mesófilos	Petrifilm para aerobios mesófilos	35°C ± 2 °C – 24 horas	Leche cruda de acopios	AOAC 990.12.

Recuento de <i>E. coli</i> – coliformes	Petrifilm para el recuento de <i>E. coli</i> – coliformes	35°C ± 2°C – 2 días	Mantequilla	AOAC 991.14
Recuento de mohos y levaduras	Agar YGC (agar de cloranfenicol glucosa extracto de levadura)	25°C ± 2 °C – 5 días	Mantequilla	Merck Millipore. Agar YGC. Manual 12 Edición
	Petrifilm para el recuento de mohos y levaduras			AOAC 997.0.
Recuento de <i>S. aureus</i>	Agar Baird Parker	35°C ± 2°C – 2 días	Mantequilla	AOAC 2003.08
Detección de <i>Salmonella spp</i>	Petrifilm™ Salmonella Express	42°C ± 2 °C – 2 días	Mantequilla	AOAC 2014.01

4.2. Análisis microbiológico de la mantequilla

Todos los análisis realizados a las muestras de mantequilla se hicieron con base en diluciones decimales. Se pesaron 10g del producto y se diluyeron en 90ml de agua peptonada universal al 0,1%, seguidamente la dilución 10^{-1} se llevó a baño maría por 2min, esto con el fin de que la mantequilla se derritiera y se quedara de manera homogénea, pasado este tiempo se dejó por 10min en refrigeración. Los análisis que se le realizaron se pueden ver en la tabla 2

4.2.1. Recuento *E. coli* – coliformes, Mohos y Levaduras y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo

El procedimiento para llevar a cabo el recuento de *E. coli* – coliformes se realizó de acuerdo a la AOAC INTERNATIONAL, AOAC Official Methods 991.14. Recuento en placa rehidratable para *E. coli* – coliformes (Petrifilm 3M). (AOAC, 2002). Para recuento de mohos y levaduras se realizó de acuerdo a la AOAC INTERNATIONAL, AOAC Official Methods 997.02 Recuento en placa rehidratable para Mohos y Levaduras (Petrifilm 3M). (AOAC, 2002). Y la metodología utilizada para el recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo se efectuó según la AOAC Official Methods 2003.08 para el recuento de *Staphylococcus aureus* en Productos Lácteos.

Se inoculó 1 ml de la muestra sobre la placa Petrifilm correspondiente, levantando la película y con una micropipeta se inóculo el volumen. Bajando con cuidado la película superior para evitar que se formen burbujas de aire y seguidamente se colocó el dispersor y se le realizó presión. Las placas se incubaron a 35°C, durante 24 ± 2 h. Pasado este tiempo se procedo a realizar el recuento.

Interpretación de resultados: *E. coli* crece como colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC en 48h, y los coliformes totales crecen colonias de color rojo oscuro en 24h. El gas atrapado alrededor de las colonias de coliformes indica la confirmación de coliformes (3M™, 2017b). Las levaduras crecen como colonias pequeñas, con bordes definidos, de color azul y los mohos crecen como colonias grandes, con bordes difusos, sin límite definido, tienen un centro oscuro y se expanden difusamente alrededor de éste (3M™, 2017a); *S. aureus* crece como de color rojo-violeta en la placa (3M™, 2007).

4.2.2. Detección de *Salmonella* spp.

El procedimiento para llevar a cabo la detección de *Salmonella* se realizó de acuerdo a la AOAC INTERNATIONAL, AOAC Official Methods 2014.01. Sistema exprés para *Salmonella* (Petrifilm 3M) (AOAC, 2014).

Se pesaron 25g de la muestra y se diluyeron en 225ml de Base para Enriquecimiento para *Salmonella*, seguidamente se le adicionaron 4,5 de suplemento para *Salmonella* spp y se agito. El enriquecimiento se incubó a $42^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 horas. Pasado este tiempo se tomaron 0,1ml del enriquecimiento con un asa desechable estéril y se sembró en Petrifilm™ *Salmonella* Express, este se incubó bajo las mismas condiciones. Para confirmar la presencia de *Salmonella* spp. se utilizó el Disco de confirmación 3M Petrifilm *Salmonella* Express (SALX), las colonias de color rojo se marcaron con un círculo en la parte superior de la película y luego esta se levantaba y se insertaba el disco en el gel. Las placas se incubaron a $42.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4 a 5 horas. Se confirmó la presencia de *Salmonella* spp. cuando la colonia cambia de color a azul verde, azul oscuro o negro, o la presencia de un precipitado azul. El no cambio de color se consideraba negativo (Department of Agriculture and Water Resources, 2017)

4.3. Esterilidad comercial

La prueba de esterilidad comercial para la leche UHT se realizó a 3.824 muestras durante 3 meses a productos terminados (leches y leches saborizadas) las muestras se incubaron 10 días a $35^{\circ}\text{C} - 55^{\circ}\text{C}$, pasado este tiempo las muestras se registraron y se rociaron con alcohol al 96%, y se abrieron asépticamente los envases. Con una micropipeta se transfería un 1ml de las muestras ($35^{\circ}\text{C} - 55^{\circ}\text{C}$) en 6 tubos con 10 ml con caldo BHI (en total son 12 tubos). Los tubos de la muestra que se incubaron a 35°C : 3 tubos se incubaron en aerobiosis y los otros 3 en anaerobiosis a la misma temperatura (35°C) por 72 horas y se realizó el mismo procedimiento con los tubos de la muestra que se incubó a 55°C pero se incubaban a 55°C por 72 horas. Pasado ese tiempo los tubos se sembraron por superficie realizando una estría con una asa desechable estéril en medio BHI suplementado con vitamina B12. Se dejan un tiempo de incubación de 2 días a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo se realizó la lectura basado en la NTC 4433, la cual no permite el crecimiento de ningún tubo. Cuando se presentaba crecimiento de colonias sospechosas

para *B. sporothermodurans* se realizó tinción de gram y pruebas de catalasa y oxidasa. Se confirmaba la presencia de este microorganismo cuando las dos pruebas eran positivas y la microscopia eran bacilos Gram positivos como filamentos largos (Bernier et al, 2012).

4.4. Control microbiológico interno de la planta

4.4.1. Análisis ambiental

Para llevar a cabo el control ambiental dentro de la salas de producción y almacenamiento se tiene determinados parámetros internos que varían según el área, pero el rango máximo para de un recuento de aerobios mesófilos en las salas blancas es de 0 - 12 UFC/Área, mohos y levaduras 0 - 5 UFC/Área, coliformes y *Bacillus cereus* 0 UFC/Área.

La metodología empleada fue basada en la técnica de sedimentación en placa y las condiciones de temperatura para bacterias fueron de 35°C/24H y para mohos y levaduras a 25°C/5 días y se realizaban cada semana a las áreas controladas y mensual a las salas que no tenían control ambiental. Las condiciones de temperatura y tiempo de incubación fueron aplicadas de acuerdo a lo aprobado por la AOAC Official method 997.02 Yeast and Mold Counts in foods (AOAC, 2002).

Para llevar a cabo este análisis se colocaron las cajas de Petri con agar Plate-Count, YGC, VRB y agar Selectivo para *Bacillus cereus* en superficies planas en cada área durante 15 minutos. Pasado este tiempo, las cajas se sometían a las condiciones de incubación para bacterias a 35°C/2 días y para mohos y levaduras a 25°C/días.

4.4.2. Detección de *Listeria spp* en superficies.

El método que se utilizó fue con hisopos Check para *Listeria*: en el punto de muestreo se abrió el empaque estéril, se retiró el hisopo y se froto en la superficie (aprox 10x10 cm). Después de recolectar la muestra en varios puntos de la planta, la muestra se trasladaba al laboratorio, se registra el muestreo en el formato correspondiente y se incubaron a 35°C +/- 1°C durante 24 horas. Pasado la incubación se efectuaba la lectura teniendo en cuenta que la prueba es positiva cuando se observa cambio de color café a negro. No se permitía la presencia de *Listeria spp.* en ningún punto de muestreo.

Los Hisopos *Listeria* se basan sobre la formación de Esculina. La hidrolisis de Esculina por *Listeria spp* resulta en la formación de un precipitado de color negro distintivo. La punta del hisopo usada en la prueba está compuesta de alginato de calcio. La formulación permite que la punta se disuelva completamente cuando se sumerge en el medio.

Si el color del medio cambia de marrón claro a negro o marrón oscuro, indica la presencia de *Listeria spp* en la muestra. El cambio de olor después de 24 horas debe ser registrado como un resultado positivo

Los puntos que se muestreaban eran las patas y bandas de las máquinas de la salas, las canastas recién lavadas, y canaletas y sifones en varios puntos en la planta.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Mes \ Actividades	Marzo		Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	
Introducción laboratorio de microbiología																				
Análisis microbiológico																				
Producto terminado																				
Materia prima (leche cruda)																				
Análisis ambiental																				
Mantequilla																				
<i>Listeria spp.</i>																				
Esterilidad comercial																				
Inicio de desarrollo del trabajo escrito																				
Revisión bibliográfica																				
Envío del primer avance																				
Envío del segundo avance																				
Envío del tercer avance																				
Sustentación del trabajo grado																				

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis microbiológico de la materia prima

Para evaluar la calidad higiénica de leche de diferentes departamentos de Colombia, se tomó como referencia el recuento de bacterias mesófilas (calidad higiénica aceptada cuando el recuento de mesófilos es <700.000 UFC/mL) (Ministerio de la Protección Social, 2006), Ver tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de proveedores que realizan ordeño mecánico y análisis de la calidad higiénica (recuento de bacterias mesófilas aerobias) de la leche analizada.

Calidad higiénica de la leche								
Departamento	Rutas	No. De proveedores	% Ordeño mecánico	Aceptada		Rechazada		Total
				n	%	n	%	
Cundinamarca	Bogotá	Centro de acopio	15%	18	60%	12	40%	30
Risaralda	Pereira	Centro de acopio	10%	15	57,7%	11	42,3%	26
Nariño	Cumbal	Centro de acopio	8%	17	58,6%	11	41,3%	29
Cauca	Timbio Caloto Silvia	20	55%	23	70%	10	30%	33
Valle del Cauca	Bitaco Norte Tuluá	16	87,5%	57	87,7%	8	12,3%	65
Popayán	Popayán	6	50%	18	81%	4	19%	22
Boyacá	Pto Boyacá	Centro de acopio	13%	21	60%	14	40%	35
Total	12	-	-	159	69,1%	71	30,9%	230

Nota: Todas las fincas cuentan con tanque de refrigeración.

En la industria láctea es primordial prolongar la vida útil de sus productos, sacando al mercado productos de calidad e inocuos. Debido a que la calidad tiene su origen desde la materia prima, las empresas ganaderas productoras de leche son el eslabón primario para garantizar las condiciones para obtener un producto de óptima calidad, realizado un seguimiento de la carga microbiológica de la leche cruda (Molineri et al., 2009).

Como puede observarse en la Tabla 2, ningún departamento tuvo una aceptación del 100% de las muestras analizadas. El porcentaje de aceptación más alto se presentó en el Valle del Cauca que de 65 muestras, solo 57 pasaron el índice aceptable, y los departamentos que presentaron recuentos más elevados fueron Risaralda y Nariño. Un factor que pudo influir en este resultado es el tiempo de almacenamiento y agitación (oxigenación) de las muestras durante su transporte a la planta (BUÑAY & PERALTA, 2015), ya que el Valle de Cauca por su geografía cuenta con carreteras amplias con un buen estado del pavimento y pocas curvas, a diferencia de la leche que viene de otros

departamentos donde el tiempo es mucho más prolongado, influyendo en el aumento de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas.

Los porcentajes de aceptación obtenidos con los departamentos de Cundinamarca y Risaralda son similares con los datos del Perfil sanitario nacional de leche cruda, que obtuvieron el 60% y el 44% de aceptación respectivamente (González et al., 2014).

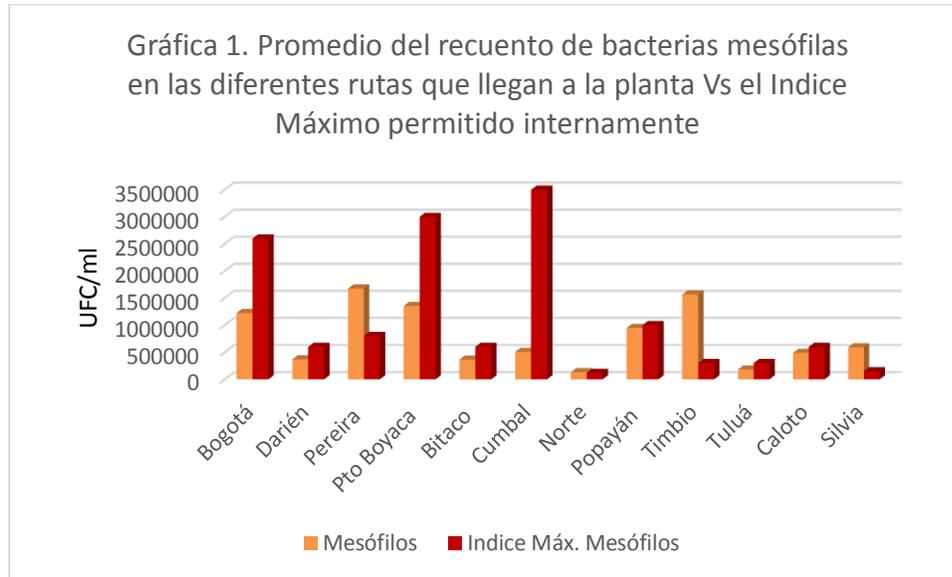
En Colombia de marzo a junio de 2019, se presentó la temporada de lluvias que pudo también influenciar en los altos recuentos de algunas muestras analizadas que superaron el millón de microorganismos/ml. Cuando el ganado lechero se expone a la suciedad por estiércol, pasto y barro durante las lluvias antes del ordeño, la ubre húmeda contamina las pezoneras, debido a que los microorganismos pueden llegar a la punta del pezón por el agua durante el ordeño contaminando la leche; al respecto se realizó un estudio en el Alto Chicamocha departamento de Boyacá, haciendo un análisis microbiológico en 34 hatos y 1657 vacas, hallando diferencias en los recuentos entre las épocas (estación seca y de lluvia) incrementándose los Mesófilos, Coliformes y Células Somáticas (Moreno et al., 2007).

En comparación, un estudio realizado en Popayán en el 2006, donde se analizaron 21 muestras de leche cruda comercializada en la zona urbana, de las cuales el 70% de las muestras tuvo una calidad aceptable y otras muestras llegaron hasta 26.000.000 UFC (Pinzón, 2006). Se podría decir que la calidad higiénica de la leche ha tenido una mejora mínima, en el transcurso del tiempo, ya que el recuento más alto en este estudio para el departamento de Popayán fue de 8.000.000 ufc/ml, lo cual sigue siendo muy preocupante.

Los porcentajes de aceptación y rechazo de los centros de acopio no presentaron diferencias significativas entre ellos. Esto se pudo dar en gran medida por el método de ordeño. Las rutas que cuenta con mayor número de proveedores que realizan el ordeño de manera mecánica tienen un menor porcentaje de rechazo en comparación de los centros de acopio, donde la mayoría de los ganaderos realizan el ordeño de manera manual, sin almacenar la leche en un taque de refrigeración, exponiendo la leche a temperatura ambiente después del ordeño, lo que favorece la multiplicación de los microorganismos, y por ende, aumenta el recuento de microorganismos mesófilos. Esto se corrobora en el estudio realizado por Moreno y colaboradores, (2007) el cual obtuvo un recuento en cantina de 1'600.000 ufc/ml y en tanque de almacenamiento en frío de 300.000 ufc/ml.

Otros factores que pueden aumentar los recuentos son: las condiciones higiénicas de los establos y sitios de ordeño, inadecuada desinfección de los pezones y rutinas de limpieza, deficiente limpieza y desinfección de los recipientes usados en el ordeño (Rodríguez et al, 2014), variables no evaluados en este estudio. Moreno (2007), demostró que la desinfección antes del ordeño juega un papel importante en la calidad higiénica de la leche, obteniendo un promedio mayor de los sistemas que no desinfectan antes del ordeño de 1.880.000 UFC/ml respecto de los que desinfectan 1.010.000 UFC/ml.

En la gráfica 1, se observa el promedio de los recuentos de bacterias mesófilas aerobias de cada ruta recibida en Alival S.A durante el periodo de marzo-junio. El índice máximo que se utilizó como referencia fue el parámetro interno establecido por Alival SA para pago de proveedores.



Se logra evidenciar, que los rangos de aceptación son mucho más estrictos para algunas rutas y más amplio para otras a comparación a lo establecido por el Decreto 1880 del 2011 (Ministerio de la Protección Social, 2006). Las rutas que no cumplen el parámetro de calidad interno teniendo un recuento de bacterias mesófilas aerobias superior a 1'500.000 ufc/ml son Pereira-Timbio, y Silvia teniendo un promedio de 574.286 ufc/ml. La leche cruda que transporta el 42% de las rutas se pueden considerar de mala calidad por superar el 1'000.000 ufc/ml. Para disminuir estos valores se deben fomentar las Buenas Prácticas Ganaderas, Buenas Prácticas Higiénicas que garanticen pezones limpios, secos y sanos, que es la principal factor para obtener leche de calidad (Calderón et al., 2006).

Los altos recuentos de bacterias mesófilas aerobias en la leche reducen la vida útil de los productos elaborados a partir de ella, deteriorando la calidad organoléptica e interfiriendo en la fermentación ácido láctica, pudiendo llegar a ser una fuente de transmisión de ETAs (RODRÍGUEZ et al, 2014).

Otro factor que puede ser la fuente de recuentos tan elevados, es la inadecuada limpieza y desinfección de los carrotanques en donde se transporta la leche, ya que en los controles internos realizados a los carrotanques después de pasar por el proceso de limpieza y desinfección arrojaron que el 27,2% y el 38,9% presentaron recuentos incontables de coliformes y mesófilos aerobios respectivamente (Datos no mostrados), contaminando de forma directa la materia prima.

En Colombia, no se han definido los indicadores de calidad de la leche cruda de los diferentes sistemas de producción (trópico alto y bajo). La leche que abastecen la planta,

todas son producidas en el trópico alto, donde se espera que la calidad de la leche sea mucho mejor en comparación a otras regiones, ya que, cuentan con mejor acceso a tecnologías, e infraestructura para el ordeño (Arboleda & Echeverri, 2017). Un estudio realizado por Rodríguez et al, (2014) determinó que el 99,33% de las empresas doble propósito en Córdoba (Trópico bajo) el ordeño era manual y los pisos del lugar destinados para el ordeño en el 58,38% eran de tierra, evidenciándose, además, altos recuento de células somáticas en la leche.

Es importante resaltar, que dentro de una misma ruta se presentaron recuentos muy variados, por lo que se llega a considerar que hay proveedores con muy buenas y malas prácticas de higiene y ordeño.

Los datos obtenidos en el recuento de la ruta de Bogotá fueron similares a los reportados por Calderon et al, (2006) quienes evaluaron la calidad microbiológica de leches crudas en 1.159 fincas, indicando que el recuento de bacterias mesófilas fue de 1.179.306 UFC/mL. Según los autores del estudio, las principales causas de dicha contaminación se debieron a residuos de leche en las herramientas del ordeñador, higiene inadecuada de las ubres, almacenamiento insalubre, y la refrigeración tardía de la leche.

6.2. Esterilidad Comercial

De las 3.809 muestras de leche analizadas para la prueba de esterilidad comercial, el 23,1% de las muestras de leche UHT de diferentes presentaciones y marcas comerciales arrojaron resultados de prueba de esterilidad “No satisfactoria”, presentando crecimiento de *Bacillus sporothermodurans* en agar BHI (Ver tabla 4). Se confirmó la presencia de este bacilo al obtener los resultados típicos de este microorganismo al realizar tinción de Gram y las pruebas de oxidasa y catalasa.

Tabla 4. Cantidad muestras de leche UHT que presentaron crecimiento de *Bacillus sporothermodurans* en la prueba de esterilidad comercial durante el periodo de Marzo-Mayo.

Crecimiento en tubos de esterilidad Comercial	Número muestras positivas para <i>Bacillus sporothermodurans</i>		
	Abril	Mayo	Junio
Tubos aerobios a 35°C o 55°C	326	260	294
Tubos anaerobios a 35°C O 55°C	0	0	0

La industria láctea presenta un grave problema debido a la presencia de *B. sporothermodurans* en la leche UHT, debido a que ocasiona el incumplimiento de la prueba de esterilidad comercial, llegando a causar el decomiso del producto y por ende grandes pérdidas económicas a las empresas productoras (Bernier et al, 2012). En la actualidad, se está tratando de demostrar que este microorganismo no afecta la vida útil

de producto, ni altera las características organolépticas, con el fin de llegar a acuerdos con el Ministerio de Protección social y se acepte la presencia de este *B. sporothermodurans* en la prueba de esterilidad comercial.

Por otro lado, la ausencia de este microorganismo en la mayoría de las muestras no significa que no esté presente, ya que *Bacillus sporothermodurans* es una bacteria complicada para cultivar en el laboratorio. Durante la práctica se evidenció esto, ya que en algunas ocasiones no se sembró la leche en agar BHI con Vitamina B12, sino se utilizó el Petrifilm para aerobios mesófilos, lográndose confirmar la presencia de este microorganismo en todas las leches sembradas al presentar un crecimiento invasivo, con bordes difusos, característico de *Bacillus sporothermodurans*, al no crecer como una colonia definida. No está claro porque resulta ser más efectivo el Petrifilm para aerobios mesófilos que el medio BHI con vitamina B12 para el crecimiento de este bacilo.

Bacillus sporothermodurans ha sido caracterizado como un microorganismo aerobio estricto. Sin embargo, un estudio realizado a las leches UHT en Colombia, confirmaron la presencia de *Bacillus sporothermodurans* anaeróbicos facultativos en 75 muestras de leche UHT comercializadas en Colombia, presentando crecimientos atípicos en ausencia de oxígeno (Bernier et al., 2012).

6.3. Análisis microbiológico de la Mantequilla

Se pudo evidenciar que el 11% de las muestras de mantequilla que presentaron mohos y levaduras durante los cuatro meses tuvieron recuentos inferiores al índice máximo permisible para mohos y levaduras descrito en la Resolución 2610 de 1986, a su vez se pudo percibir un aumento progresivo en los recuentos de estos microorganismos durante los cuatro meses, siendo el mes de junio el que mostró mayor crecimiento en el producto y mayor número de muestras contaminadas. El principal factor por el que se observó este aumento de mohos y levaduras en el producto radica en la utilización de metodologías diferentes a que en el mes de Marzo y Abril se utilizó el protocolo de prueba rápida por Petrifilm de Mohos y Levaduras, y en el mes de Mayo y Junio se trabajó con la metodología tradicional de siembra por profundidad en agar YGC (Ver tabla 5). Actualmente se investiga el motivo por el cual algunas muestras presentan recuentos altos de estos microorganismos y otras por el contrario cumplen. Por políticas internas de confidencialidad de la empresa estos resultados no pueden ser mostrados en este trabajo

Tabla 5. Promedio de recuentos microbiológicos realizados a la mantequilla durante el periodo de Marzo-Junio

Mes	Muestras contaminadas	Recuentos Mohos y levaduras (UFC/g)	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)	Recuentos Coliformes Totales (UFC/g)	Recuentos Coliformes Fecales (UFC/g)	Detección de <i>Salmonella spp</i> (UFC/g)
Marzo	0	<10	<10x10	<10	<10	Ausencia
Abril	1	200	<10x10	<10	<10	Ausencia
Mayo	4	750	<10x10	<10	<10	Ausencia

Junio	10	900	<10x10	<10	<10	Ausencia
--------------	----	-----	--------	-----	-----	----------

Alonso y Poveda, (2008), demostraron que las técnicas rápidas Petrifilm proporcionan resultados equivalentes a los obtenidos por los métodos tradicionales, existiendo una variación menor del 10% entre las técnicas de recuento y con un nivel de confianza del 95%. Dueñas, (2017) demostró que el recuento microbiano por el método alternativo de placas Petrifilm puede reemplazar al método convencional en harinas ya que no encontraron diferencias estadísticamente significativas. Para poder tener certeza sobre el por qué para la mantequilla no se tienen los mismos resultados por las dos metodologías es necesario realizar una validación del método rápido para poder estimar la sensibilidad, selectividad, resultados y desempeño del método para esta matriz ya que puede que por la metodología aplicada para disolverla, por su alto contenido de grasa, o por no utilizar un diluyente apropiado se vean afectados los resultados en el método de análisis rápido Petrifilm.

Diferentes estudios reportan la presencia de mohos y levaduras en mantequilla. Ikram-ul et al., (2001), analizaron 50 muestras de mantequilla obteniendo levadura solo en una muestra. El recuento de mohos osciló entre 0-280 / UFC/g. Otro estudio reveló que 100% de las muestras examinadas estaban contaminadas por mohos y levaduras, registrando niveles de contaminación hasta de 3×10^4 ufc/g (Meshref, 2010).

Los mohos y levaduras crecen en un amplio rango de temperatura y pH, resultando en una decoloración de la superficie y un sabor desagradable y la mayor preocupación es que algunos mohos son capaces de producir metabolitos tóxicos conocidos como micotoxinas. (Meshref, 2010) llegando a causar graves problemas a la salud de los consumidores.

Los microorganismos que se encuentran presentes en la mantequilla refleja la calidad de crema, las condiciones sanitarias de la batidora utilizada para la fabricación la mantequilla, la calidad del aire de la sala y las condiciones sanitarias de los operarios (Ikram-ul et al., 2001). Por lo tanto, las esporas de los mohos pueden llegar a la crema por contaminación del aire de la sala y la manipulación descuidada del material de embalaje puede ser una fuente de contaminación.

Los coliformes en los productos lácteos se consideran de origen animal y tienden a indicar la calidad higiénica del producto. La presencia de coliformes fecales en el producto terminado se indica una mala condición sanitaria, a un mal lavado de limpieza y desinfección de manos por parte de los manipuladores de alimentos, o puede que también se pueda contaminar durante el empaque. Se ha reportado la presencia es estos microorganismos en la mantequilla. Un estudio reveló que en 24 muestras de mantequilla se encontraron coliformes fecales y en 20 muestras se encontraron coliformes no fecales (Ikram-ul et al., 2001). En Egipto se analizaron 60 muestras de mantequilla, de las cuales el 36,7% y 31,7% estaban contaminadas por coliformes totales y coliformes fecales (Meshref, 2010). La ausencia de estas bacterias indicadoras en las muestras analizadas en

nuestro estudio, demuestra que la pasteurización de la crema es efectiva, y que los manipuladores tienen buenas prácticas higiénicas.

La resolución 2310 de 1986 establece que la determinación de coliformes fecales y totales en el laboratorio se realice mediante el protocolo de Numero Más Probable (NMP), en Alival S.A no se lleva a cabo esta metodología, se utiliza el Petrifilm de *E.coli* / Coliformes, para comparar los resultado, los recuentos obtenidos se multiplicaron por el factor inverso de la dilución y este dato se ubica en la tabla de NMP y se reporta el resultado correspondiente.

S. aureus coagulasa positivo es un patógeno indicador de prácticas de manipulación inadecuadas. El principal reservorio es la cavidad nasal y la piel del hombre. Este microorganismo puede ser transportado por el aire y el polvo y llegar a contaminar el producto (Ikram-ul et al., 2001). Se ha llegado a encontrar la presencia de este microorganismo en un 23,3% en muestras de mantequilla (Meshref, 2010). La ausencia de este microorganismo indica el buen manejo y la higiene inadecuada del personal.

Salmonella spp. es una de las causas más comunes de brotes de ETAs, cuya incidencia se ha incrementado en los últimos años (Wilson et al., 2016). En el 2015, 13 personas fueron infectadas con *Salmonella* Paratyphi B en Estados Unidos al consumir una mantequilla de nuez contaminada, la empresa retiró voluntariamente todos sus 12 productos de mantequilla de nuez el 2 de diciembre de 2015 (CDC, 2016). *Salmonella* pueden sobrevivir en alimentos con baja actividad de agua (aw) largos periodos como en la mantequilla. La contaminación del producto puede ocurrir en la materia prima (crema) o durante su procesamiento. Aunque la crema se somete a un proceso de pasteurización, en alimentos con alto contenido de grasa y con baja actividad de agua le permiten a la bacteria la capacidad de resistir altas temperaturas, por lo tanto, pueden estar presentes en el producto final (Brenes & Arias, 2016).

El cumplimiento de los estándares microbiológicos obtenidos en las muestras de mantequilla analizadas, indica que el proceso de pasteurización de la crema es eficaz. La contaminación de mohos y levaduras en el producto se debe a una recontaminación durante el proceso de almacenamiento en frío de la crema, el cual tarda 10 días.

6.4. Control microbiológico interno de la planta

6.4.1. Análisis ambiental

El ambiente de las salas asépticas juega un papel muy importante en cuanto a factores de contaminación, dado que esto puede influir en la calidad microbiológica del producto sobre todo en la etapa final, puesto que en el ambiente hay gran cantidad de microorganismos que pueden llegar afectar la vida útil del producto, por tal razón es uno de los parámetros mayormente evaluados en las plantas de procesamiento de alimentos (Aguirre, 2016).

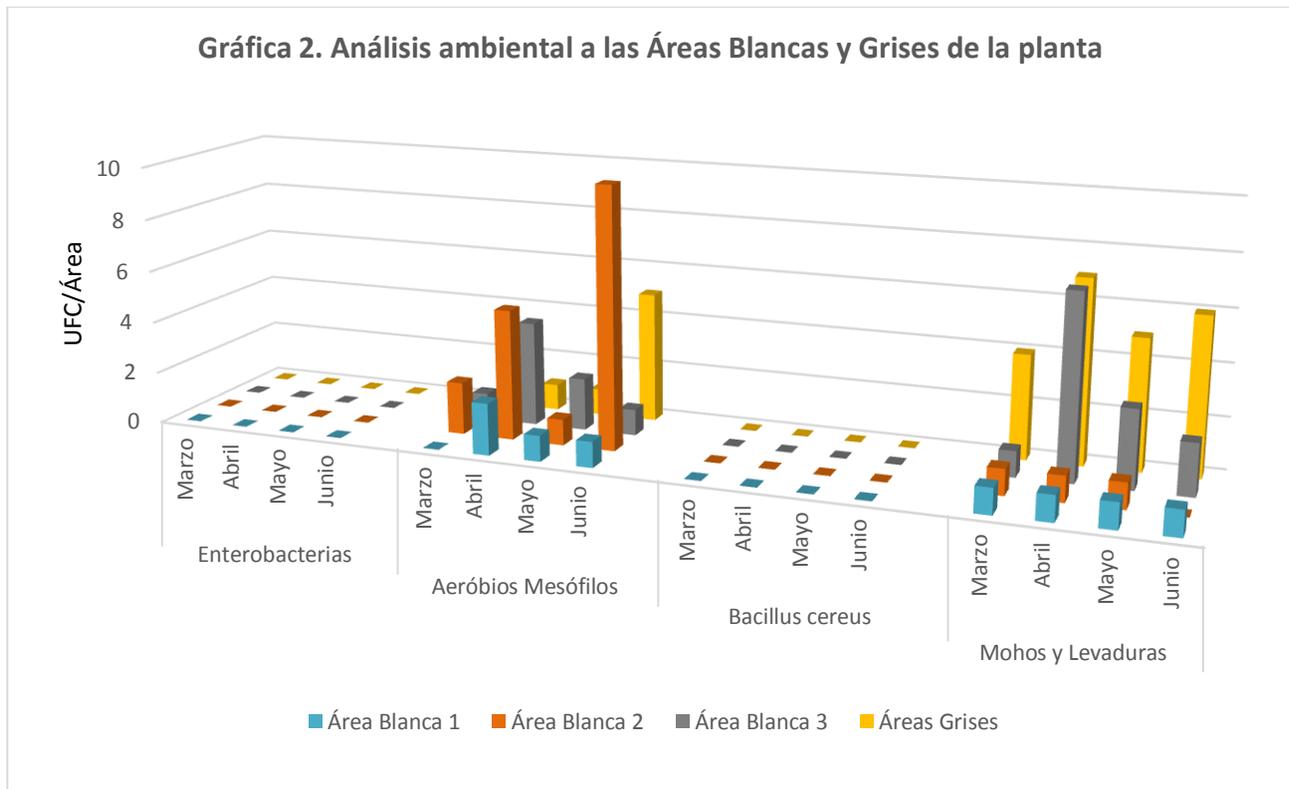
En la gráfica 3 se encuentran reflejados los recuentos de mesófilos, *Bacillus cereus*, coliformes y mohos y levaduras de los análisis del ambiente realizados de Marzo-Junio, en 3 áreas blancas diferentes relacionadas con el empaque y procesamiento del producto (Sala bolsa, Sala Tetrapack y Sala de Derivados) y 4 áreas grises. Para cada punto de muestreo (Áreas blancas y grises) se tomó un número específico de puntos de acuerdo al plan de muestreo (datos no mostrados).

Se puede destacar, que para los cuatro parámetros microbiológicos analizados (mesófilos, *Bacillus cereus*, coliformes y mohos y levaduras) en las diversas áreas blancas, se presentaron recuentos dentro de los valores normales en la totalidad de muestreos realizados, siendo los índices máximos en salas blancas 12 UFC/Área para mohos y levaduras, 5 UFC/Área para coliformes totales y fecales y *Bacillus cereus* 0 UFC/Área

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos se pudo evidenciar que hubo recuentos similares entre mohos y mesófilos aerobios. Se puede evidenciar un incremento de los recuentos en las áreas no controladas como era de esperarse, ya que estas no cuentan con un control de aire.

Uno de los principales factores que influyeron en el aumento de los recuentos durante unos meses en las áreas blancas fue el mantenimiento del aire acondicionado, ya que muchas veces al tomar la muestra el aire no estaba funcionando y la temperatura de la sala se encontraba mayor a 30°C en las horas de la tarde. Para mantener ventilado el área y mitigar un poco el calor, se abrieron las puertas permitiendo el flujo del aire de las zonas grises a las blancas.

Otro factor que pudo influir es el flujo de personas que están entrando y saliendo de la sala, trayendo contaminación del exterior al interior sobre ellos, puesto que para entrar a la sala solo era necesario la limpieza y desinfección de manos y botas, y el uso obligatorio de cofia y tapabocas. Debido a que los operarios de estas salas podían movilizarse con el mismo uniforme por gran parte de la planta, trayendo consigo contaminación ambiental encima, se disminuyó la efectividad de los aspersores.



Pese a que hubo recuentos de microorganismo en las diferentes áreas, estas se encuentran dentro del rango aceptable, por lo que no representa una posible fuente de contaminación en el producto debido a que estas salas son de empaque, por lo tanto, las maquinas cuentan con sus propias condiciones asépticas y no se mantiene la leche expuesta directamente al ambiente.

6.4.2. Detección de *Listeria* spp. en superficies.

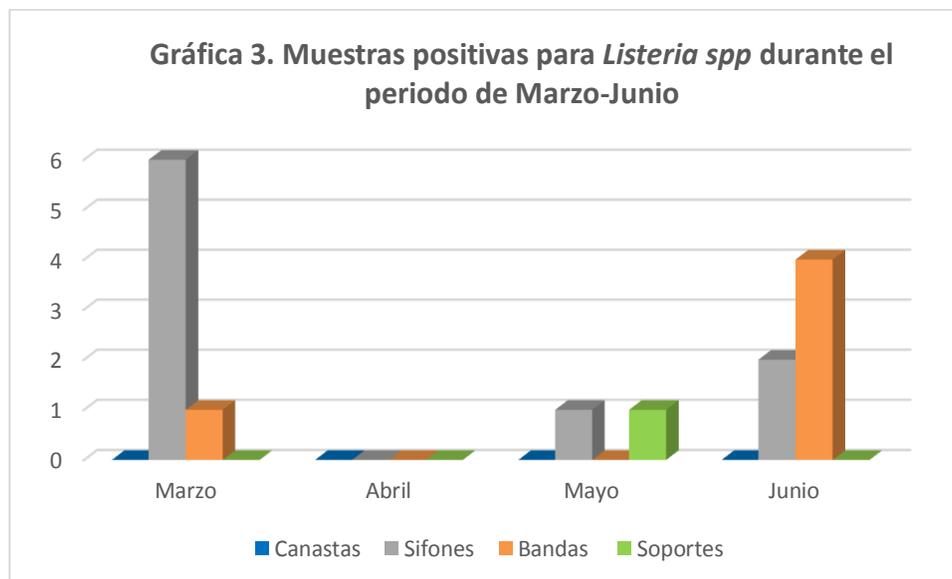
Listeria spp., es microorganismo indeseable en las plantas de alimentos, es posible aislarla de sifones, paredes, instrumentos, equipos y maquinaria, puede llegar por contaminación ambiental, o contacto con materia prima contaminada (Mesa, 2016). Por esto, *Listeria* spp. es utilizada como indicador de eficacia de limpieza y desinfección de superficies y equipos. Así mismo, es muy difícil de erradicar ya que tiene la capacidad de desarrollar biopelículas, (Biofilms), generando resistencia a los detergentes y desinfectantes utilizados para la limpieza de superficies de la planta (Aguirre, 2016). Además puede multiplicarse (lentamente) a temperaturas de refrigeración, de tal forma que logra pasar todas las barreras que se utilizan en la industria de alimentos contra bacterias patógenas.

Las biopelículas son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie sólida y rodeada de una matriz polimérica extracelular. Esta les permite incrementar la capacidad de resistencia hacia agentes antimicrobianos, desinfectantes y sanitizantes, entre otros. En la industria de alimentos son fuente importante de contaminación en las áreas de producción interfiriendo en los procesos de producción y causar daño a los equipos (Villanueva & Salazar, 2017).

Como se puede observar en la gráfica 4, de los muestreos realizados en diferentes en los diferentes meses, se obtuvo aislamiento de *Listeria* spp. en las bandas transportadoras de las envasadoras, las cuales son utilizadas para transportar el producto final y han pasado previamente por un proceso de limpieza y desinfección que se realiza semanalmente, por lo tanto la presencia de este microorganismo indicia que la limpieza que se realiza en la sala es deficiente.

Por otro lado, el punto que presentó mayor frecuencia de contaminación durante los cuatro meses fueron los sifones y desagües, esto se pudo dar porque los desagües tienen superficies porosas en donde se dificulta la limpieza, facilitando la formación de biopelículas que permitan la resistencia de *Listeria* spp. a los desinfectantes, además los utensilios de limpieza no siempre llegan a estos lugares de difícil acceso. También por las condiciones ambientales de elevada humedad y nutrientes ya que en la planta constantemente hay derrames de leche y crema (Moreno, 2013), y por lo tanto, los desagües llegan a ser un importante reservorio de bacterias patógenas. Si la limpieza de estos se realiza con agua a alta presión permite la propagación de los microorganismos, ya que se disemina la contaminación en la gotas de agua (Ripollés, 2018).

Listeria monocytogenes se ha detectado en plantas procesadoras de productos lácteos comúnmente en zonas con presencia de humedad, entre ellas, zonas con agua estancada, desagües, equipos de proceso, etc (Mesa, 2016). Según un estudio realizado por el Ministerio De Salud Y Protección Social, 2015, la prevalencia de *Listeria* spp. en sifones y/o desagües en plantas de procesamiento de porcinos en Colombia es del 17,5%, convirtiéndose en un factor de riesgo en la planta por la recontaminación del producto con las superficies de contacto como bandas transportadoras y canastas



7. CONCLUSIONES

- El 30,9% de las muestras de leche cruda que llegan a la planta de Alival S.A, no son de buena calidad, al tener recuentos elevados de microorganismos mesófilos, superando el rango establecido en Decreto 2838 de 2006.
- El 50% de las rutas de leche cruda cumplen con los índices máximos establecidos por la Empresa, sin embargo, estos datos solo son tenidos en cuenta para el pago de proveedores, ya que para aceptar o rechazar un camión depende de los resultados de las pruebas de plataforma.
- El 23,1% de las muestras de leche UHT incumplen la prueba de esterilidad comercial debido a que el tratamiento térmico no es el suficiente para eliminar esporas termoresistentes como las de *Bacillus sporothermodurans*.
- Las muestras de mantequilla analizadas presentaron recuentos elevados de mohos y levaduras, pero se encuentran dentro de los rangos permitidos que establece la Resolución 2310 de 1986 para derivados lácteos.
- En la evaluación de ambiente, se obtuvieron valores aceptables para el recuento de mesófilos, mohos y levaduras, *Bacillus cereus* y coliformes en el ambiente de las diferentes zonas de las áreas blancas, lo que indica conformidad de la calidad microbiológica del ambiente.
- Se evidenció la presencia de *Listeria* spp. en sifones y bandas transportadoras del área de envasado de la leche, indicando fallas en el proceso de lavado y desinfección de los mismos.

8. RECOMENDACIONES

Intensificar los planes de limpieza y desinfección para controlar la presencia de *Listeria* spp. en las áreas de envasado, garantizando de este modo la ausencia total en superficies y equipos.

Implementar una metodología precisa para la identificación de *Listeria monocytogenes* ambiental.

Realizar un mantenimiento periódico a los sistemas de aire y aspersores de las áreas blancas para mantener los parámetros ambientales estrictamente controlados.

Validar el protocolo tradicional para mohos y levaduras (recuento en placa), y eliminar el uso de Petrifilm para analizar matrices grasas, para obtener resultados reales y confiables.

BIBLIOGRAFIA

- 3M™. (2007). 3MTM Placas Petrifilm™ Staph Express para Recuento de *S. aureus*. Recuperado de <https://multimedia.3m.com/mws/media/1409682O/guia-interpretacion-petrifilm-staph-express.pdf>
- 3M™. (2017a). 3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de Mohos y Levaduras. *Microbiology Products*. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MohosyLevadurasporPetrifilm_19101.pdf
- 3M™. (2017b). Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes. *Microbiology Products*, 3(1), 1-6. Recuperado de <https://multimedia.3m.com/mws/media/444950O/3m-petrifilm-e-coli-coliform-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf>
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food microbiology*. Royal Society of Chemistry. Edition 4
- Aguirre, M. (2016). Determinación Del Perfil Microbiológico De La Leche Pasteurizada A Través De Su Línea De Producción En La Planta Procesadora Colanta - Planeta Rica. Universidad De Córdoba.
- Alonso, L., & Poveda, A. (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Pag 164-166 Disponible en : <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>
- AOAC, Official Methods Of Analysis Of AOAC International. Official method 990.12. Aerobic Plate Count In Foods Dry Rehydratable Film (Petrifilm™ Aerobic Count Plate) Method. 2016. 17.2.07. Disponible en : https://www.edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-990.12.pdf
- AOAC, Official Methods Of Analysis Of AOAC International. Official method 997.02 Yeast and Mold Counts in foods. 2016. 17.2.11. Disponible en: http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-997.02.pdf
- Arboleda, D., & Echeverri, E. (2017). Evaluación de las normas sobre calidad sanitaria de la leche cruda en América Latina y la revisión de la norma para Colombia, (Tesis de pregrado). Corporación Universitaria Lasallista. Caldas, Colombia. Pag 19. Disponible en: http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2034/1/Calidad_sanitaria_leche_cruda.pdf
- ASOLECHE. (2017). ¿Cuáles son las tendencias en el consumo de lácteos en Colombia? - Asoleche - Ecosistema Lácteo Colombiano. Recuperado 6 de junio de 2019, de <https://asoleche.org/2017/01/31/tendencias-consumo-lacteos-en-colombia/>
- Bernier, I., Cárdena, E., & Piñeros, O. (2012). *Bacillus sporothermodurans* anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia. *Revista Alimentos Hoy*, 21(27), 126-138.

Brenes, K., & Arias, M. (2016). Determinación de la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* enterica en muestras de mantequilla de maní distribuidas de manera comercial en San José, Costa Rica. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (26), 21-25.

Buñay, N., & Peralta, F. (2015). Determinación del recuento de aerobios mesófilos en leche cruda que ingresa a industrias Lacto Ochoa - Fernández Cia . Ltda. (Tesis de pregrado). Universidad De Cuenca. Cuenca –Ecuador. Pag 25. Disponible en : <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/21584>

Calderón, A., García, F., & Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista MVZ Córdoba* (Vol. 11). Universidad de Córdoba. Pag 730. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69311106>

Castañeda, S. (2015). Caracterización de la microbiota de leche ultra alta temperatura (UAT, UHT) analizada en Bogotá. *Investigaciones en Seguridad Social y Salud*, 17. Disponible en <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964508/revista-inv-seg-social-17-2-leches-uht.pdf>

CDC. (2016). FDA Investigated Multistate Outbreak of Salmonella Infections Linked to Raw Nut Butter Products | FDA. Recuperado 29 de julio de 2019, de <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/fda-investigated-multistate-outbreak-salmonella-infections-linked-raw-nut-butter-products>

CDC. (2019). Raw (Unpasteurized) Milk. Recuperado 17 de junio de 2019, de <https://www.cdc.gov/Features/RawMilk/>

Codex Alimentarius. (1999). Norma General Del Codex Para El Uso De Términos Lecheros. Codex Stan 206-19991, 1-4. Disponible en www.fao.org/input/download/standards/332/CXS_206s.pdf

Codex Alimentarius. (2003). Principios generales de higiene de los alimentos CAC/RCP 1-1969, 25-35. Recuperado de <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/es/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP>

Codex Alimentarius. (2009). Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos. Cac/Rcp, 1-54. Recuperado de www.codexalimentarius.net/input/download/standards/.../CXP_057s.pdf

Condalab. (2019). Agar Cloranfenicol (Agar YGC) ISO. Recuperado de <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1075-5496-agar-cloranfenicol-agar-ygc-iso.html>

Cuenca, N., Chavarro, F., & Díaz, O. (2008). El sector de ganadería bovina en Colombia. aplicación de modelos de series de tiempo al inventario ganadero. *Revista de la Facultad de Ciencias Económicas*, 16(1), 165-177. Disponible en https://www.academia.edu/31334092/El_Sector_De_Ganader%C3%ADa_Bovina_en_Colombia._Aplicaci%C3%B3n_De_Modelos_De_Series_De_Tiempo_Al_Inventario_Ganadero

Department of Agriculture and Water Resources. (2017). Salmonella Express System – AOAC 2014.01, 3-4. Disponible en <http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/export/3m-petrifilm-salmonella-express-system-aoac.pdf>

Dueñas, A. (2017). Validación microbiológica de un método rápido para la cuantificación de hongos en harina de maca (*Lepidium meyenii* W.) OSS (Organic Sterilization System). (Tesis de pregrado). Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. Disponible en http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1696/Due%C3%B1as_y.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Espinosa, L., Varela, C., Martínez, E., & Cano, R. (2014). Boletín epidemiológico semanal. Boletín epidemiológico semanal (Vol. 22). Recuperado de <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/884/1067>

Fedegan. (2013). Buenas Prácticas Ganaderas. Recuperado 9 de junio de 2019, de <https://www.fedegan.org.co/programas/buenas-practicas-ganaderas>

Fedegan. (2018a). Producción. Recuperado 1 de junio de 2019, de <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>

Fedegan. (2018b). Cifras de referencia del sector ganadero colombiano. Fedegan, 49. Recuperado de <https://www.google.com.co/search?q=Cifras+de+referencia+del+sector+ganadero+colombiano&oq=Cifras+de+referencia+del+sector+ganadero+colombiano&aqs=chrome..69i57.926j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8>

García, L. R. (2015). Evaluación fisicoquímica y microbiológica del proceso de elaboración del queso doble crema en una fábrica de lácteos del Municipio De Belén (Boyacá). *Safety Science*, 33(3), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2015.04.023>

González, V., Rodríguez, D., Carrascal A., & Mercado, M. (2014). Perfil sanitario nacional de leche cruda para consumo humano directo. Recuperado de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/Perfil-sanitario-nacional-leche-cruda.pdf>

Hernández Porras, E. E., Rosero Torres, L. E., Parra Barrera, E. L., Guerrero Montilla, J. A., Gómez Rubio, A. L., & Moreno Castañeda, J. E. (2018). Brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos estudiados mediante técnicas moleculares. *Revista de Salud Pública*, 19(5), 671-678. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n5.52317>

Ikram, U., Nuzhat, I., Sikander, A., & M.A., Q. (2001). Incidence of Coliform in Butter. *Journal of Biological Sciences*, 1(4), 175-177. <https://doi.org/10.3923/jbs.2001.175.177>

INCONTEC, Instituto Colombiano De Normas Técnicas Y Certificación. Colombia. NTC 4433. Microbiology. Method For Determination Of Commercial Sterility In Food. Bogota, D.C. 2015. Disponible en <https://es.scribd.com/document/125687899/NTC4433>

INCONTEC, Instituto Colombiano De Normas Técnicas Y Certificación. Colombia. NTC 1419. Milk products. Milk with flavors. Bogota, D.C. 2004. Disponible en https://www.minagri.gov.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/normatividad-lacteos/Colombia/NTC_Leche_Liquida_Saborizada_1419.pdf

Lesley, M. B., Ernie, S. R., Kasing, A., & Son, R. (2017). Detection of *Bacillus cereus* in formula milk and ultra high temperature (UHT) treated milk products. *International Food Research Journal*, 24(3), 985-989. Disponible en [http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20\(03\)%202017/\(12\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20(03)%202017/(12).pdf)

Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. (Grahame W. (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publishers

Merck Millipore. Agar PCa. (Agar Extracto de Levadura Cloranfenicol) Manual 12 Edición.

Merck Millipore. Agar YGC. (Agar Extracto de Levadura Cloranfenicol) Manual 12 Edición

Mesa, N. (2016). Estrategias para minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes* en el procesamiento de leche pasteurizada. (Tesis). Universidad Nacional Abierta Y A Distancia -UNAD. Disponible en: <https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/11186/1/52905254.pdf>

Meshref, A. M. S. (2010). Microbiological quality and safety of cooking butter in Beni-Suef governorate-Egypt. *African health sciences*, 10(2), 193-198. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326975>

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (12 ENE 2007). Resolución 12 de 2007. Se establece el sistema de pago de la leche cruda al productor. Recuperado de: <https://www.minagricultura.gov.co/Normatividad/Resoluciones/Resoluci%C3%B3n%20No.%20000012%20de%202007.pdf>

Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural, Ministerio De Comercio, Industria Y Turismo. (2015). implementación de política para mejorar la competitividad del sector lácteo nacional, 1-93. Disponible en <https://www.minagricultura.gov.co/ministerio/direcciones/Documents/d.angie/programa%20de%20avance%20presupuestal%202015.pdf>

Ministerio de Agricultura. (2018). Sector Lácteo Colombiano. Recuperado de <https://sioc.minagricultura.gov.co/SICLA/Documentos/002 - Cifras Sectoriales/Cifras Sectoriales - 2018 Mayo Cadena Láctea.pdf>

Ministerio De La Protección Social. (22 JUN 2007). Resolución 2115 de 2007. Se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Recuperado de: http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/normativa/Res_2115_de_2007.pdf

Ministerio de la Protección Social. (28 FEB 2006). Decreto 616 del 2006. Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país. Recuperado de <https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006D616.aspx>

Ministerio De La Protección Social. (27 Mayo 2011). Decreto 1880 De 2011. Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional. DO No. 48.085. Recuperado de https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/decreto_1880_2011.htm

Ministerio de Salud y Protección Social. (20 de mayo de 2015). Resolución 1619 de 2015. Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios en los ejes estratégicos de Vigilancia en Salud Pública y de Gestión de Calidad. DO: 49.517. Recuperado de https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_minsaludps_1619_2015.htm

Ministerio De Salud Y Protección Social. (2015). Evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en salchicha, jamón, mortadela y salchichón en Colombia. Recuperado de <http://www.ins.gov.co/Paginas/inicio.aspx>.

Ministerio de Salud. (24 de Febrero de 1986). Resolución 02310 de 1986. Procesamiento composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos. Recuperado de: http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/resolucion_2310_1986.pdf

Molineri, A. I., Signorini, M. L., Cuatrin, A. L., Canavesio, V. R., Neder, V. E., Russi, N. B., Calvino, L. F. (2009). Calidad Bacteriológica y Relación entre Grupos Bacterianos en Leche de Tanque de Frío. FAVE Sección Ciencias Veterinarias, 8(2), 75-86. <https://doi.org/10.14409/favecv.v8i2.1490>

Moreno, F., Rodriguez, G., Mendez, V., Osuna, L., & Rocio, M. (2007). Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). Revista de medicina veterinaria, (14), 61-83.

Moreno, P. (2013). Serotipificación molecular y susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*, aislada de carne y derivados de origen porcino, en el departamento del Tolima. (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. Disponible en <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/9801>

Parra, R. (2010). Review. Bacterias Acido Lacticas: Papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 8, 94. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117902>

Patiño, R. (2012). Detección de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7y *Listeria monocytogenes*, en muestras de leche bovina del sistema de producción doble propósito

colombiano. (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana. Bogota D.C., Colombia. Disponible en <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/3424>

Pinzón, A. (2006). Determinación del índice de bacterias mesófilas aerobias presentes en la leche cruda, versus leche pasteurizada, que se comercializa en la zona urbana de la Ciudad de Popayán. Popayán (Colombia): Universidad Nacional Abierta ya Distancia, Facultad de Ciencias Agrarias, 18-21. Disponible en https://images.engormix.com/s_articles/pinzon_leche_bacterias.pdf

Rezende-Lago, N. C. M., Rossi Jr., O. D., Vidal-Martins, A. M. C., & Amaral, L. A. (2007). Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59(6), 1563-1569. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000600032>

Ripollés, C. (2018). Supervivencia de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de contacto con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo. Universitat Autònoma de Barcelona.

Ripollés, C. (2018). Supervivencia de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de contacto con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo. Universitat Autònoma de Barcelona. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/664171/cra1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rodríguez, V., Calderón, A., & Acosta, A. (2014). Calidad de leches crudas en empresas ganaderas doble propósito en el departamento de Córdoba (Colombia) en condiciones de máxima precipitación. Veterinaria y Zootecnia, 8(2), 72-86. Disponible en <https://doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.5>

Secretaría Distrital De Salud. (2015). Informe brotes enfermedades transmitidas por alimentos primer semestre de 2015, 3. Disponible en http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/INFORMACION%20COMUNIDAD/INFORME_%20BROTOS_ETA_ISEM_2015.pdf

Verraes, C., Vlaemynck, G., Weyenberg, S. Van, Zutter, L. De, & Daube, G. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. International Dairy Journal, 50, 32-44. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>

Vidal, A. M. C., Rossi Junior, O. D., Abreu, I. L. de, Bürger, K. P., Cardoso, M. V., Gonçalves, A. C. S., D'Abreu, L. F. (2015). Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Ciência Rural, 46(2), 286-292. Disponible en <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141539>

Villanueva, D., & Salazar, M. (2017). Formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima. Anales de la Facultad de Medicina, 78(3), 322. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i3.13768>

Wilson, M. R., Brown, E., Keys, C., Strain, E., Luo, Y., Muruvanda, T., Musser, S. (2016). Whole Genome DNA Sequence Analysis of *Salmonella* subspecies enterica serotype Tennessee obtained from related peanut butter foodborne outbreaks. PloS one, 11(6), e0146929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146929>

ANEXOS

1. Parámetros microbiológicos exigidos por el Decreto 616 de 2006 para leches ultrapasteurizadas

Tabla 8. Características microbiológicas de la leche ultrapasteurizada

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

n = número de muestras que se van a examinar

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 con resulta de entre m y M

2. Parámetros microbiológicos exigidos por la resolución 2310 de 1986 para mantequilla

	n	m	M	c
NMP Coliformes totales/g	3	75	150	1
NMP Coliformes fecales/g	3	<3	-	0
Hongos y levaduras/g	3	500	1000	1
Estafilococos coagulasa positiva/g	3	100	200	11
Salmonella/ 25g	3	0	-	0

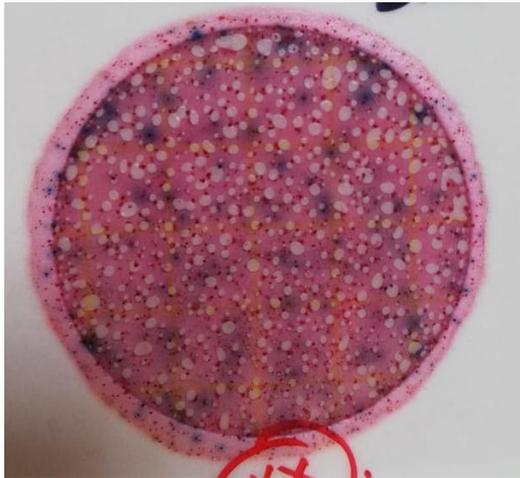
3. Petrifilm para aerobios mesófilos y resultados positivos



4. Petrifilm para mohos y levaduras y resultados positivos



5. Petrifilm para *E. coli*/ Coliformes y resultados positivos



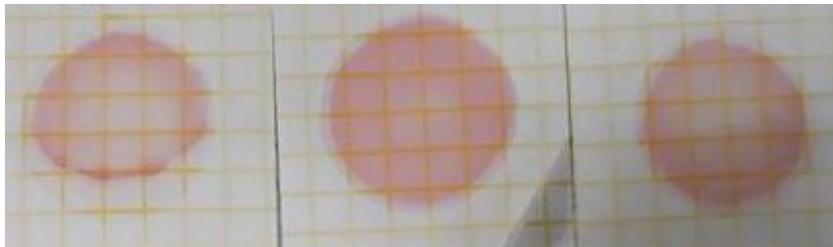
6. Petrifilm para *Salmonella* spp.



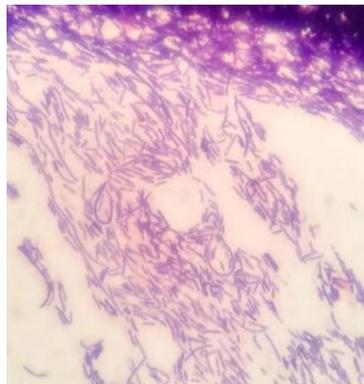
7. Resultado positivo y negativo utilizando Hisopos para *Listeria spp*



8. Crecimiento típico de *Bacillus sporothermodurans* en leche UHT en Petrifilm para aerobios mesófilos



9. Microscopía de *Bacillus sporothermodurans*



10. Comparación entre los resultados del método tradicional y el Petrifilm para mohos y levaduras en mantequilla

