

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS
TERMINADOS EN LA PRODUCCIÓN DE BEBIDAS GASEOSAS EN LA COMPAÑÍA
GASEOSAS LUX, POSTOBÓN S.A**

LENDYS TATIANA GALVIS MARTÍNEZ
Estudiante décimo semestre
Programa de Microbiología

TRABAJO DE GRADO
Modalidad pasantía
Presentado como requisito para optar el título de
MICROBIÓLOGA

TUTOR
Francisco Rodríguez Rincón
Profesor Titular Departamento de Microbiología

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER
2019

Nota de aceptación

Firma del jurado

Pamplona, 2019

DEDICATORIA

A mis abuelos que ya no están conmigo, a quienes los llevo siempre presente, agradeciéndoles por hacer de mí la persona que soy, a mi papá Celiar Galvis, mi mamá Luz Mary Martínez, tías Luz Marina, Luz Cely y Aracelis y primos Antonio y Yubis por ser quienes me dieron esa voz de aliento que necesité muchas veces y a mi hermano Alejandro porque con solo su existencia hizo de mí la mujer más feliz y quien se convirtió en mi motivo para salir adelante. Es por ustedes y para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la experiencia brindada y por poner en mi camino a personas que ayudaron en mi crecimiento personal y académico, gracias a mi familia por nunca dudar de mis capacidades, a mis amigos en especial Liliana Vega por brindarme un cariño que solo una hermana lo puede hacer y a cada uno de mis profesores por los conocimientos ofrecidos.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS.....	3
2.1	OBJETIVO GENERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	JUSTIFICACIÓN.....	4
4.	MARCO LEGAL	7
4.1	Resolución 2115 del 2007 del Ministerio de Salud y Protección Social.....	7
4.2	Norma Técnica Colombiana 2740.....	7
4.3	Norma Técnica Colombiana 4306.....	7
5.	MARCO TEÓRICO.....	8
5.1	MATERIAS PRIMAS	8
5.1.1	Azúcar	8
5.1.2	Agua	8
5.1.3	Ácidos.....	9
5.1.4	Dióxido de carbono	9
5.2	PRODUCTO TERMINADO.....	9
5.2.1	Bebida gaseosa o carbonatada.....	9
5.3	MICROORGANISMOS INDICADORES PRESENTES EN EL AGUA	10

5.3.1	Coliformes totales	10
5.3.2	<i>Escherichia coli</i> (<i>E-coli</i>)	11
5.3.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
5.4	MICROORGANISMOS INDICADORES PRESENTES EN EL AZUCAR Y PRODUCTO TERMINADO	11
5.4.1	Aerobios mesófilos.....	11
5.4.2	Mohos y Levaduras	12
6.	METODOLOGÍA	13
6.1	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AZUCAR	13
6.1.1	Análisis microbiológico de Aerobios Mesófilos.....	13
6.1.2	Método de filtración por membrana.....	13
6.1.3	Análisis microbiológico de Mohos y Levaduras.....	14
6.2	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA	14
6.2.1	Análisis microbiológico de Coliformes Totales y Coliformes Fecales.....	15
6.2.2	Análisis microbiológico de <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>P. aeruginosa</i>	15
6.3	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS EN PROCESO	16
6.4	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS TERMINADOS	17
6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
7.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES REALIZADA DURANTE LA PASANTIA EN GASEOSAS POSTOBON.....	18

8.	RESULTADOS	19
8.1	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AZÚCAR	19
8.2	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA	20
8.3	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL PRODUCTO EN PROCESO	21
8.4	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BEBIDAS GASEOSAS	22
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
10.	CONCLUSIONES	26
11.	RECOMENDACIONES	27
12.	BIBLIOGRAFÍA	28
13.	ANEXOS	32

LISTAS DE TABLAS

Tabla 1. Características Químicas que tienen mayores consecuencias económicas e indirectas sobre la salud humana.....	8
Tabla 2. Características microbiológicas	9
Tabla 3. Requisitos fisicoquímicos de las bebidas gaseosas o carbonatadas	
Tabla 4. Requisitos microbiológicos para bebidas gaseosas o carbonatadas.....	10

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recuento de Aerobios mesófilos y Levaduras en muestra de azúcar	19
Figura 2. Recuento de Aerobios mesófilos en muestra de agua.....	20
Figura 3. Recuento de Aerobios mesófilos, Mohos y Levaduras en muestras de producto en proceso.	21
Figura 4. Recuento de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras en muestras de bebidas gaseosas.....	22

LISTAS DE ANEXOS

Anexo A. Composición medio de cultivo Plate Count	32
Anexo B. Composición medio de cultivo M-Green.....	32
Anexo C. Composición medio de cultivo Readycult	33
Anexo D. Composición medio de cultivo Asparagina.....	33

1. INTRODUCCIÓN

Postobón es una compañía que cuenta con la mayor participación de mercado en la industria de las bebidas no alcohólicas en Colombia y es la empresa con capital 100% colombiano más grande en ingresos en ese sector.

Cuenta con 111 años de historia durante los cuales ha sido pionera en el desarrollo de la mayoría de categorías de bebidas existentes en el mercado colombiano.

Actualmente, participa en diferentes categorías de productos como gaseosas, aguas, jugos, hidratantes, energizantes y té, contando con un portafolio de más de 35 marcas y 250 referencias, destacando las marcas gaseosas Postobón, Colombiana, Pepsi, Breñaña, Hipinto, Popular, Seven Up, Montain Dew, Jugos Hit, Tutti Frutti, Mr. Tea, Agua Cristal, Agua Oasis, H2Oh!, Gatorade, Squash, Peak y Lipton Tea, entre otras.

De esta forma la empresa GASEOSAS POSTOBÓN ha dejado huella en Colombia y otros países gracias a su innovación, visión de negocios, capacidad de adaptación y transformación, condiciones que le permiten mantener el liderazgo con compromiso, sostenibilidad y con el desarrollo del país. La compañía pertenece a la Organización Ardila Lülle, una de las principales organizaciones industriales de América Latina.

Para el control microbiológico que se lleva a cabo dentro de la empresa se tiene en cuenta la materia prima, el proceso y el producto terminado siguiendo los lineamientos establecidos en el manual de microbiología, el cual está conformado por: una norma fundamental donde se establecen los criterios básicos a seguir, procedimientos para la preparación de medios de cultivo

y reactivos, método que describe la toma y preparación de las muestras para desarrollar cualquier técnica microbiológica, métodos de ensayo (técnicas microbiológicas), método para la toma y preparación de muestras y la norma de conteo y cálculo de unidades formadoras de colonias; garantizado que los análisis microbiológicos sean trazables, es decir que las muestras que se analicen del proceso correspondan con el producto terminado analizado. Los análisis microbiológicos que se tienen en cuenta son: Aerobios Mesófilos y Mohos, Levaduras por filtración por membrana y Coliformes Totales y Coliformes Fecales por el método Presencia/Ausencia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la calidad microbiológica de materias primas y productos en proceso y terminados en la producción de gaseosas en la compañía Postobón S.A.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la calidad microbiológica de muestras de azúcar mediante la detección de microorganismos indicadores teniendo en cuenta la NTC 4306.
- Establecer la calidad microbiológica de muestras de agua tratada mediante la detección de microorganismos indicadores y patógenos teniendo en cuenta la Resolución 2115 de 2007.
- Conocer la presencia de microorganismos indicadores en productos en proceso teniendo en cuenta la reglamentación interna de la empresa.
- Comprobar la calidad microbiológica de muestras de productos terminados mediante la detección de microorganismos indicadores, teniendo en cuenta la NTC 2740.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) representan un riesgo para la salud desde el principio de la historia humana. Según la Organización mundial de la Salud (OMS); un brote de ETAs, se define como: “Un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento, y los análisis epidemiológicos apuntan al alimento como el origen de la enfermedad”(OMS, 2015). La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada (OMS, 2019).

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno gramnegativo, oportunista que es responsable de numerosas infecciones agudas y crónicas y presenta un problema considerable para pacientes con quemaduras graves, fibrosis quística y otros estados inmunocomprometidos *P. aeruginosa* es el patógeno más común que infecta a pacientes con fibrosis quística y es la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos individuos (Lyczak, 2000). Una vez adquirido, es difícil erradicar *P. aeruginosa* debido a varios factores que previamente se ha demostrado que contribuyen a la infección crónica observada con *P. aeruginosa*. El organismo tiene una capacidad intrínseca para resistir una variedad de agentes antimicrobianos, lo que hace que el tratamiento exitoso sea muy difícil. Además, se ha demostrado que dentro del huésped infectado, las bacterias residen en biopelículas, que también son altamente resistentes al tratamiento con antibióticos (Lambert, 2002).

Por otro lado, los hongos, los cuales incluyen mohos y levaduras pueden ser benéficos para el hombre, cuando se usan en la producción de determinados alimentos (queso, pan y cerveza). Sin embargo, algunos hongos producen sustancias tóxicas (micotoxinas) perjudiciales a la salud del hombre y de los animales.

Así mismo, *Escherichia coli* aparte de ejercer una función útil al organismo cuando suprime la fijación y desarrollo de especies bacterianas perjudiciales en el tracto intestinal, y sintetiza importantes cantidades de vitaminas. Una minoría de cepas de *E. coli* es capaz de causar enfermedades en el hombre por diferentes mecanismos. Las fuentes de contaminación de las cepas patogénicas son animales (particularmente bovinos y ciervos), hombre (tracto intestinal y heces) y agua, que se contaminan por el contacto con materia fecal durante el procesamiento de alimentos de origen animal o por fallas en la manipulación. Existen seis tipos de *E.coli* cuyas diferencias se basan principalmente en sus mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia; ellas son: *E.coli* Enteropatógena, *E.coli* Enteroinvasiva, *E.coli* Enterotoxigénica, *E.coli* Enterohemorrágica, *E.coli* Enteroadherente difusa y *E.coli* Enteroagregativa. *E.coli* productora de Toxina Shiga (ECTS) se considera un subgrupo de las Enterohemorrágicas (ECEH); las ECTS se consideran el tipo más común de (ECEH) y muchas veces estos dos términos se consideran sinónimos, sin embargo, esto no siempre es así ya que existen cepas enteroagregativas que pueden producir Toxinas tipo Shiga. El serotipo más común de ECTS es el O157:H7.

Se ha reportado transmisión de *E. coli* por medio de aguas recreativas y de agua de consumo contaminadas, por escorrentías que contengan excremento animal y humano. Las cepas

enteropatógenas de *E. coli* responden de la misma manera que otras cepas de *E. coli* a los procedimientos de tratamiento y desinfección del agua (WHO 2011).

En diferentes países se han reportado brotes de enfermedades relacionados con el cambio climático, como ocurrió en Walkerton Canadá, donde un brote por *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* de origen hídrico, causó 7 muertos, 65 hospitalizaciones y más de 2300 casos de enfermedades gastrointestinales. En este caso, el agua potable, suministrada por pozos de aguas subterráneas poco profundas, resultó estar contaminada con estiércol del ganado de una granja de la localidad, tras un período de intensas lluvias de primavera, evento que se predice una vez cada 60 años (Auld 2015).

Por esta razón, y teniendo en cuenta que los microorganismo mencionados anteriormente pueden estar presentes en las muestras analizadas, es necesario llevar a cabo un proceso minucioso en el análisis de la calidad de estas bebidas garantizando así, su inocuidad y la no afectación de la salud de sus consumidores.

4. MARCO LEGAL

4.1 Resolución 2115 del 2007 del Ministerio de Salud y Protección Social

Esta Resolución 2115 establece las características físicas, químicas, microbiológicas, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua potable. Indicando los valores máximos aceptables desde el punto de vista microbiológico para los microorganismos *E.coli* y Coliformes Totales, a partir de las diferentes técnicas utilizadas.

4.2 Norma Técnica Colombiana 2740

Esta norma establece los requisitos que deben cumplir las bebidas gaseosas o carbonatadas destinadas a consumo directo y los métodos de ensayo para su evaluación.

4.3 Norma Técnica Colombiana 4306

La Norma Técnica Colombiana 4396 establece los requisitos que debe cumplir y los métodos de ensayo a los cuales debe someterse el azúcar, que se utiliza como materia prima en la industria y para consumo directo.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 MATERIAS PRIMAS

5.1.1 Azúcar

Producto cristalizado obtenido del cocimiento del jugo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) o de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*), constituido esencialmente por cristales sueltos de sacarosa obtenidos mediante procedimientos industriales apropiados y que no han sido sometidos a procesos de refinación, cuyo color es máximo de 400 UI y la turbiedad es máximo 250 UI (NTC 611, 2018).

5.1.2 Agua

Es aquella que cumple con los parámetros físicos, químicos y microbiológicos exigidos en la Resolución 2115 de 2007 (Res 2115, 2007).

Tabla 1. Características Químicas que tienen mayores consecuencias económicas e indirectas sobre la salud humana

Elementos y compuestos químicos que tienen implicaciones de tipo económico	Expresadas como	Valor máximo aceptable (mg/L)
Calcio	Ca	60
Alcalinidad Total	CaCO ₃	200
Cloruros	Cl ⁻	250
Aluminio	Al ³⁺	0,2
Dureza Total	CaCO ₃	300
Hierro Total	Fe	0,3
Magnesio	Mg	36
Manganeso	Mn	0,1
Molibdeno	Mo	0,07
Sulfatos	SO ₄ ²⁻	250
Zinc	Zn	3
Fosfatos	PO ₄ ³⁻	0,5

Tomada de: Resolución 2115 del 2007

Tabla 2. Características microbiológicas

Técnicas utilizadas	Coliformes Totales	Escherichia coli
Filtración por membrana	0 UFC/100 cm ³	0 UFC/100 cm ³
Enzima Sustrato	< de 1 microorganismo en 100 cm ³	< de 1 microorganismo en 100 cm ³
Sustrato Definido	0 microorganismo en 100 cm ³	0 microorganismo en 100 cm ³
Presencia – Ausencia	Ausencia en 100 cm ³	Ausencia en 100 cm ³

Tomada de: Resolución 2115 del 2007

5.1.3 Ácidos

La mayoría de las bebidas gaseosas contienen ácidos: cítrico, fosfórico, málico y tartárico. Estos ácidos proporcionan esa sensación refrescante y al mismo tiempo preserva la calidad y el dulzor de la bebida. El pH promedio de las bebidas gaseosas es de 2.4 (Licata, 2019).

5.1.4 Dióxido de carbono

Responsable de las burbujas de la gaseosa, el dióxido de carbono se introduce al agua bajo presión. A medida que se agrega más dióxido de carbono, disminuye el pH, otorgando más acidez a la gaseosa y por lo tanto resulta más burbujeante. También se lo considera un conservante ya que genera un medio ácido que previene el crecimiento de microorganismos (Licata, 2019).

5.2 PRODUCTO TERMINADO

5.2.1 Bebida gaseosa o carbonatada

Bebida no alcohólica, no fermentada, elaborada por disolución de gas carbónico (CO₂) en agua tratada, lista para el consumo humano directo, adicionada o no de edulcorantes naturales, artificiales o ambos, jugos de frutas, concentrados de frutas y aditivos permitidos por la legislación nacional vigente o en su defecto el Codex Alimentarius. Las bebidas gaseosas deben

presentar aspecto limpio, libre de cuerpos extraños, y sin sedimentos ni materiales en suspensión que no correspondan a las características de diseño del producto (NTC 2740, 2008).

Tabla 3. Requisitos fisicoquímicos de las bebidas gaseosas o carbonatadas

Parámetro	Bebidas gaseosas o carbonatadas		Aguas Carbonatadas (Sodas)	
	mínimo	máximo	mínimo	máximo
Grados Brix (sólidos solubles)	---	15,0	NA	NA
Volumen de carbonatación ¹⁾	1,5	5	3,0	5,5
pH	2,3	3,5	NA	NA
Acidez titulable como ácido cítrico en % de fracción en masa.	5,0	70,0	NA	NA

NOTA Los resultados obtenidos para el contenido acidez expresado como ácido cítrico se expresa en fracción de masa según el Sistema Internacional de Unidades, el cuál dice:
"Fracción en masa de B, W_B: Esta cantidad se expresa frecuentemente en por ciento, %. La notación "% (m/m)" no deberá usarse".

NA: No tiene aplicabilidad

¹⁾ Este requisito no se aplica para aquellas bebidas no carbonatadas consideradas por práctica comercial como bebidas gaseosas.

Tomada de: Norma Técnica Colombiana 2740 del 2008

Tabla 4. Requisitos microbiológicos para bebidas gaseosas o carbonatadas

Requisito	Filtración por membrana	Recuento en Placa
Recuento de Coliformes totales en UFC	0 / 100 ml	< 3 / ml
Recuento de Mohos en UFC	25 / 100 ml	--
Recuento de Levaduras en UFC	50 / 100 ml	--

Tomada de: Norma Técnica Colombiana 2740 del 2008

5.3 MICROORGANISMOS INDICADORES PRESENTES EN EL AGUA

5.3.1 Coliformes totales

Bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, fermentan la lactosa a 35°C +/- 2°C con la producción de ácido y gas, catalasa positiva, móviles en su gran mayoría por medio de flagelos peritricos. Tienen una importancia relevante como indicadores de

contaminación del agua y los alimentos. Las bacterias de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en suelos, semillas y vegetales (Pascual, 2000).

5.3.2 *Escherichia coli (E-coli)*

Bacilo aerobio Gram Negativo no esporulado que se caracteriza por tener enzimas específicas como la β Galactosidasa y β Glucoronidasa. Es el indicador microbiológico preciso de contaminación fecal en el agua para consumo humano (Res 2115, 2007).

5.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Principal patógeno de la familia *Pseudomonadaceae* y se identifica por ser un bacilo gramnegativo ligeramente curvado que crece en aerobiosis, es muy versátil nutritivamente y no fermenta hidratos de carbono pero produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructosa y lactosa o sacarosa (Mandel , 2010)

5.4 MICROORGANISMOS INDICADORES PRESENTES EN EL AZÚCAR Y PRODUCTO TERMINADO

5.4.1 Aerobios mesófilos

En este grupo se incluyen todas las bacterias capaces de desarrollarse a 35°C +/- 2°C en condiciones aeróbicas. En este recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos, refleja, entre otras cosas, las condiciones higiénico-sanitarias de la materia prima, saneamiento de ambientes de procesamiento, procesos de limpieza y desinfección y condiciones de almacenamiento y distribución del alimento.

5.4.2 Mohos y Levaduras

La mayoría son aeróbicos, aunque hay algunas especies facultativas. Su nutrición es heterótrofa, adquieren su energía de compuestos orgánicos del suelo y del agua. Las levaduras son hongos unicelulares de forma esférica, alargada u ovalada, presentan diferentes colores: blanco, rosado, beige o rojo. Su tamaño oscila entre 2,5 – 10 micrómetros de ancho y 4,5 - 21 micrómetros de largo (Lozada 2007).

Los mohos producen compuestos tóxicos, conocidos como micotoxinas y se encuentran presentes como contaminantes de alimentos de consumo humano y animal. Los efectos adversos de las micotoxinas incluyen problemas en el crecimiento infantil, defectos en el desarrollo del tubo neuronal, daños al sistema inmunológico, enfermedades renales, y mayores probabilidades de desarrollar cáncer de hígado y esófago (Santillan, 2017).

6. METODOLOGÍA

6.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AZUCAR

6.1.1 Análisis microbiológico de Aerobios Mesófilos

Para el análisis microbiológico de Aerobios Mesófilos mediante la técnica de filtración por membrana. se tomaron 20g de la muestra y se mezclaron en 200mL de agua peptonada; La mezcla se hace pasar a través de un filtro de membrana de nitrato de celulosa reticulado e hidrofóbico de 0.45 μm . De manera que los microorganismos quedan retenidos en su superficie. A continuación la membrana se deposita en una placa estéril de 60 mm por 15 mm que contiene Plate Count, incubando a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48H (Norma BE1-06-60, 2015).

Este medio no contiene inhibidores o indicadores y es relativamente rico en nutrientes. La digestión enzimática de caseína (triptona) es una fuente de nitrógeno que contiene un alto nivel de aminoácidos libres y el extracto de levadura suministra principalmente las vitaminas del complejo B. La glucosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de bacterias, mientras que el agar es el agente solidificante (ISO, 2013)

6.1.2 Método de filtración por membrana

El método de filtración por membrana es utilizado para la identificación de Aerobios Mesófilos y Mohos y Levaduras en las siguientes muestras: Azúcar, agua (Planta de Tratamiento de Agua Potable), rinse, entrada de agua, tanque de agua, tanque de bebida, tanque de jarabe y producto terminado.

La muestra se hace pasar a través de un filtro de membrana de nitrato de celulosa reticulado e hidrofóbico de 0.45 μm . De manera que los microorganismos quedan retenidos en su superficie. A continuación la membrana se deposita en una placa estéril de 60 mm por 15 mm que contiene

el medio de cultivo apropiado. Después del periodo de incubación y a la temperatura indicada, las colonias que han crecido en la superficie de la membrana pueden ser contadas directamente (Association of Analytical Communities, 2005).

6.1.3 Análisis microbiológico de Mohos y Levaduras

Para el análisis microbiológico de Mohos y Levaduras mediante la técnica de filtración por membrana se utilizaron los 100mL resultantes del proceso anterior utilizando el medio M-Green, el cual se incubaba a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5d (Norma BE1-06-61, 2015).

M-Green es un medio desarrollado para la detección y enumeración de hongos en bebidas, con una formulación compleja exclusiva para esta función. La formulación es rica en peptonas, extracto de levadura y glucosa, pero los crecimientos bacterianos están inhibidos por el pH ácido del medio. El Verde Bromocresol es un indicador que facilita la visualización y recuento de las colonias de hongos. Estas colonias son verdes por la difusión del Verde Bromocresol en las mismas, pero si se reduce el pH pueden aparecer amarillas (Atlas, 1993).

6.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA

El análisis microbiológico se realizó una vez por semana, en donde se tomaron 300 mL de las tres entradas UV y de las tres salidas UV y de los siete purificadores de carbón en la Planta de Tratamiento de Agua Potable a las que se les realizó análisis de Aerobios Mesófilos por el método de filtración por membrana, Coliformes Totales y Coliformes Fecales y *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa* por el método Presencia/Ausencia.

6.2.1 Análisis microbiológico de Coliformes Totales y Coliformes Fecales

Para el análisis microbiológico de Coliformes Totales y Coliformes Fecales mediante el método Presencia/Ausencia se utilizaron 100mL de las muestras a los que se les añadió el medio ReadyCult incubando a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24H (Norma BE1-06-65, 2015).

En este medio de cultivo, la gran cantidad de peptonas y el tampón fosfato incorporado garantizan un rápido crecimiento de Coliformes, mientras que el laurilsulfato inhibe en gran medida la flora acompañante, especialmente la Gram-positiva. El sustrato cromogénico X-GAL que es degradado por Coliformes y el sustrato fluorogénico MUG que es altamente específico para *E. coli*, permiten la detección simultánea de Coliformes Totales y *E. coli*. La presencia de Coliformes Totales está indicada por un color azul verdoso del caldo y *E. coli* por una fluorescencia azul bajo luz UV (USEPA ,2019).

6.2.2 Análisis microbiológico de *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa*

Para el análisis microbiológico de *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa* mediante el método Presencia/Ausencia se utilizó el medio Asparagina, la muestra se añadió hasta llevar a los 100mL incubando a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por $48\pm 2\text{H}$ (Norma BE1-06-64, 2015).

Es un medio que permite el correcto enriquecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* por ser estrictamente mineral, con la Asparagina como única fuente de nitrógeno y la glicerina como única fuente de hidratos de carbono. Los demás componentes tamponan y proporcionan minerales. En principio, sólo los Gram negativos no fermentadores pueden crecer en estas condiciones. *Pseudomonas aeruginosa* hidroliza la asparagina, convirtiéndola en ácido aspártico.

La aparición de crecimiento mediante turbidez (aparezca o no pigmentación fluorescente) se considera presuntiva de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. y/o de otros Gram negativos No fermentadores.

Si la prueba presuntiva es negativa, reportar como *Pseudomona* spp. Ausente en 100mL (Ausencia/100mL). Si la prueba presuntiva es positiva, reportar como *Pseudomona* spp. Presente en 100 mL (Presencia/100mL) (Eaton, 2005)

Prueba confirmativa para la determinación de Presencia/Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*

A frascos con caldo acetamida a doble concentración (igual preparación que el caldo asparagina) se le añade las muestras de caldo asparagina positivo y se incuba a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 horas.

La ausencia de una coloración púrpura al cabo de 48 ± 2 horas constituye una Prueba confirmativa Negativa para *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de una coloración púrpura al cabo de 48 ± 2 horas constituye una Prueba confirmativa Positiva para *Pseudomonas aeruginosa*.

6.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS EN PROCESO

Mientras el producto está en proceso se toman 300mL de muestras en bolsas plásticas estériles con tiosulfato de sodio a la entrada del agua (agua que ha sido tratada y posteriormente irá al tanque de agua) y al agua de enjuague con cloro (rinse) que se utiliza para el lavado de los envases antes del llenado, a estas muestras por medio de filtración por membrana se les realiza análisis microbiológico de Aerobios Mesófilos en medio Plate Count, análisis de Coliformes

Totales y Coliformes Fecales Presencia/Ausencia utilizando medio ReadyCult y análisis de *Pseudomonas spp* y *P. aeruginosa* Presencia/Ausencia usando medio Asparagina, incubando a temperaturas mencionadas anteriormente.

Por otro lado se toman 300mL de muestras en bolsas plásticas estériles del tanque de agua (esta agua es utilizada para la preparación de la bebida), tanque de bebida y del tanque de jarabe; Así mismo se toman tres envases pasados por el enjuague con rinse a los que se les añade 200mL de Agua Peptonada, a todas las muestras mencionadas por medio de filtración de membrana se lleva a cabo análisis de Aerobios Mesófilos en medio Plate Count, y Mohos y Levaduras y Acidúricas en M-Green incubando a temperaturas descritas anteriormente.

Para la toma de muestra del producto en proceso se tuvo en cuenta que este no se repitiera en la semana en el sabor ni en el tamaño del mismo y se realizó tres veces por semana.

6.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS TERMINADOS

Se tomaron cinco productos terminados los cuales correspondían a la bebida analizada en el proceso, teniendo en cuenta su producción en minutos diferentes a los que por medio de filtración por membrana se les determinaron Aerobios Mesófilos usando medio Plate count y se incubaron a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ y Mohos y Levaduras y Acidúricas en medio M-Green e incubando a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Usando el programa Microsoft Excel se procedió a graficar los resultados de las muestras analizadas evaluadas en los meses Abril. Mayo y Junio.

8. RESULTADOS

Por confidencialidad en los resultados del análisis microbiológico de la empresa POSTOBÓN

S.A los datos aquí expuestos no coinciden con los reales, estos son una aproximación.

8.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AZÚCAR

El análisis microbiológico del azúcar se llevó a cabo semanalmente evaluando Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras.

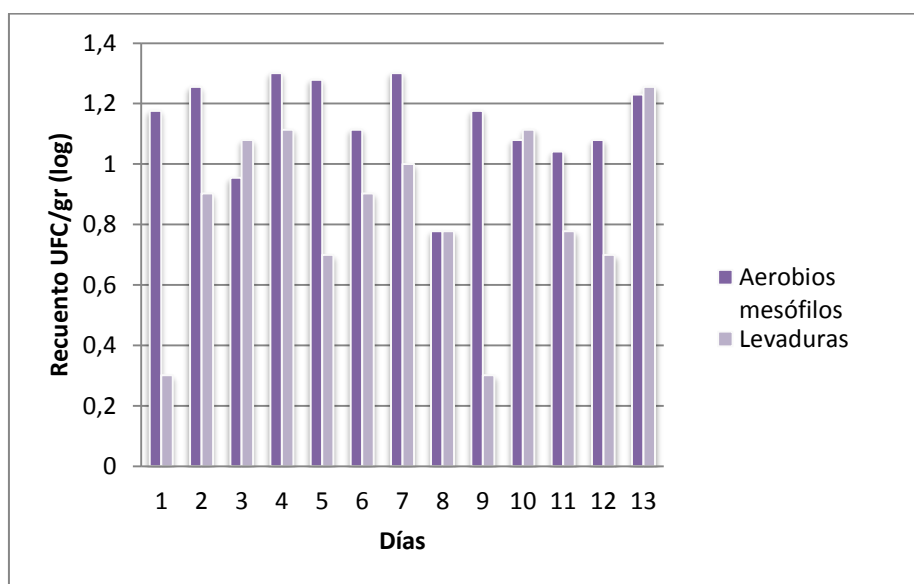


Figura 1. Recuento de Aerobios mesófilos y Levaduras en muestra de azúcar

De las 13 muestras de azúcar evaluadas semanalmente expuestas en la gráfica anterior durante los meses Abril, Mayo y Junio, se obtiene que estas no exceden los límites de recuento permitidos en la Norma Técnica Colombiana 4306 para Aerobios Mesófilos (<200 UFC/g) y para Mohos y Levaduras (<100 UFC/g). En este último caso, solo se obtiene crecimiento de levaduras.

8.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA

El análisis microbiológico de agua fue una vez por semana analizando Aerobios mesófilos, Coliformes totales y Coliformes fecales y *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa* de las tres entradas UV, las tres salidas UV y los siete purificadores de carbón.

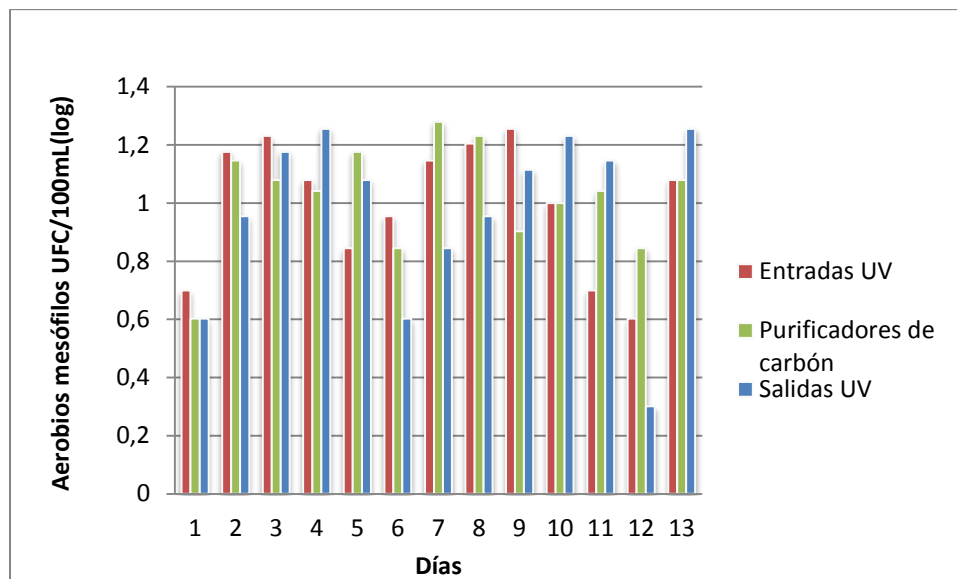


Figura 2. Recuento de Aerobios mesófilos en muestra de agua

Las muestras de agua fueron tomadas semanalmente en la Planta de Tratamiento de Agua Potable en donde se obtuvo solo crecimiento de Aerobios Mesófilos, sin embargo los recuentos expuestos en la figura 2 no sobrepasan los exigidos en la Resolución 2115 de 2007 mencionado en el párrafo 1, el cual es $<100\text{UFC}/100\text{mL}$. Por otro lado se obtiene en todas la muestras la Ausencia en 100mL para Coliformes Totales y Coliformes Fecales y *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa*.

8.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL PRODUCTO EN PROCESO

A cada producto en proceso, se procede a tomar muestras en la línea de producción a: La entrada del agua, rinse, tanque de agua, tanque de bebida, tanque de jarabe y se toman tres envases vacíos de dicho producto.

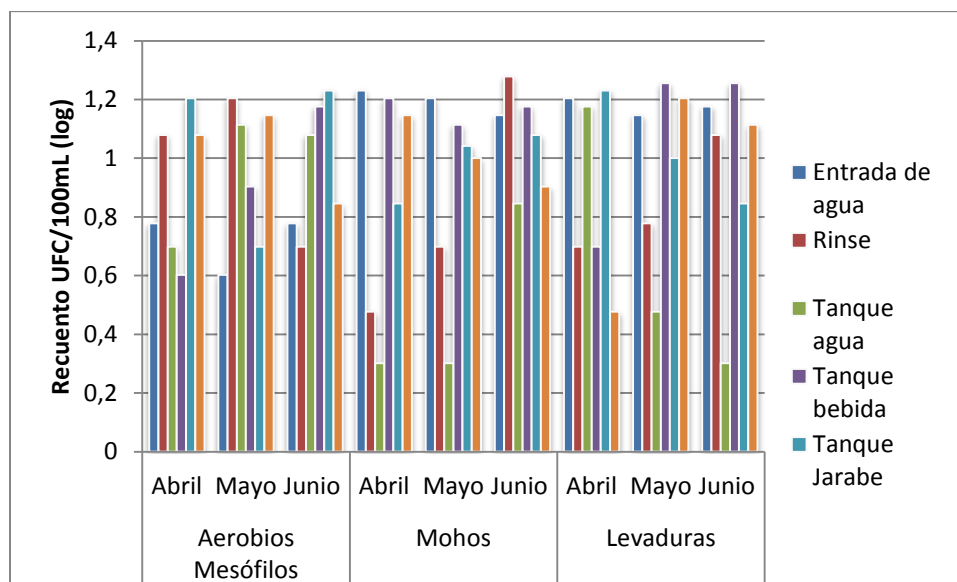


Figura 3. Recuento de Aerobios mesófilos, Mohos y Levaduras en muestras de producto en proceso.

Para un total de 12 muestreos en los meses Abril y Junio y 15 muestreos en el mes de Mayo se obtiene que todas las muestras presentaron crecimiento de Aerobios Mesófilos (ver figura 3) pero estos no excedieron lo permitido por la Norma Postobón N° BE1-04-106 en cual es de 20UFC/100mL, sin embargo el recuento de Mohos y Levaduras si sobrepasa lo permitido en dicha norma pues este es de 10UFC/100mL. En el caso de las muestras de Rinse y Entrada de Agua a las que se les realizo Análisis de Coliformes Totales y Coliformes Fecales y *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa* se obtiene Ausencia/100mL en todas las muestras analizadas.

8.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BEBIDAS GASEOSAS

Cada vez que se realizó el muestreo del producto en proceso, se procedió a tomar cinco productos terminados de dicha producción, estos son diferentes en tamaño y sabor en cada muestreo.

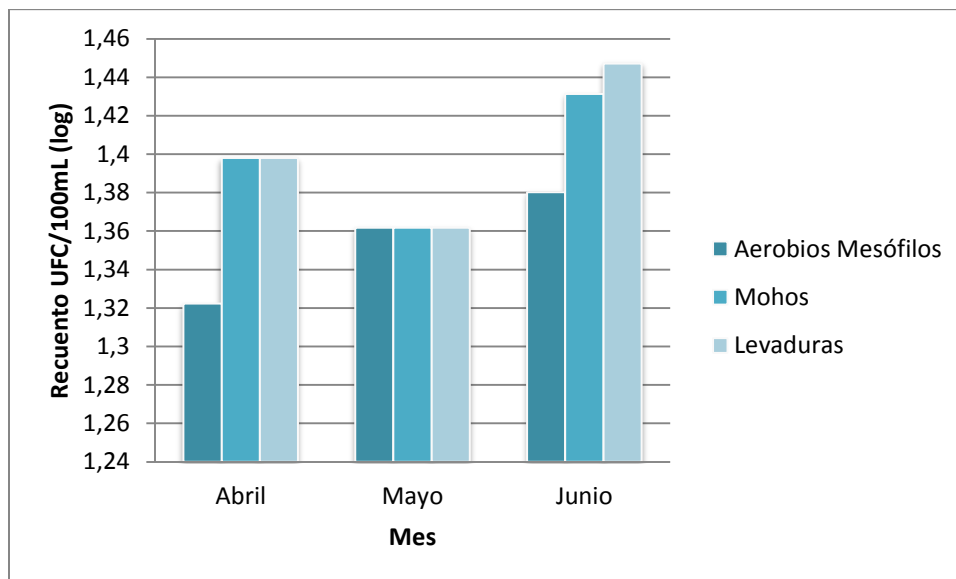


Figura 4. Recuento de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras en muestras de bebidas gaseosas.

En la figura anterior se aprecia el recuento de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras realizados a 60 muestras en el mes de Abril y Junio y 75 muestras en el mes de Mayo los cuales exceden en dicho recuento para Mohos en el mes de Junio, ya que según la NTC 2740 el valor máximo aceptable es de 25UFC/100mL, cumpliendo así en parámetros para Aerobios Mesófilos y Levaduras.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las muestras analizadas de agua y de azúcar cumplen con los parámetros microbiológicos establecidos en la Resolución 2115 de 2007 y la NTC 4306 respectivamente, sin embargo en los muestreos realizados en las líneas de producción tanto el recuento de Mohos como el de Levaduras exceden los límites permitidos por la Norma Postobón BE1-04-106, así como también en el mes de Junio para el producto terminado los valores obtenidos en el recuento de Mohos sobrepasan lo estipulado en la NTC 2740. El riesgo de la presencia de Mohos en las bebidas es la producción de micotoxinas, esto conlleva a una enfermedad llamada micotoxicosis, la ingesta de bebidas contaminadas produce efectos agudos y crónicos; generalmente los efectos son teratogénicos (defectos congénitos durante la gestación), carcinogénicos, estrogénicos e inmunosupresivos (Abrunhosa, 2014).

Aunque las muestras no sobrepasaron los recuentos para Aerobios Mesófilos, la contaminación producida por estos microorganismos tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de Aerobios Mesófilos bajo no asegura que un alimento este exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total significa, inevitablemente, presencia de flora patógena (Yujra, 2008).

Durante todo el proceso de embotellado de las bebidas gaseosas, debe llevarse diversos controles de calidad; que permitan conocer, desde la calidad del lavado del envase hasta la apariencia y conservación del producto final. . Existen diversos controles de calidad, rendimientos y capacidad del proceso; de esta manera, se identifican las causas de los efectos negativos ocurridos en un periodo determinado; durante el proceso productivo. Así mismo el

control de mermas de producción en forma específica y minuciosa se hace indispensable; puesto que, permite tomar las acciones correctivas en el momento indicado si fuere necesario, para lograr resultados que no excedan los establecidos para cada producto o proceso.

Las bebidas gaseosas preparadas correctamente por lo general no fomentan la multiplicación de microorganismos, como bacterias, mohos y levaduras, pues el conservante ácido que posee (ácido cítrico) y la presencia de gas carbónico (CO₂) sirven como barrera de protección, sin embargo se pueden presentar contaminaciones debido a la presencia de otros factores durante el proceso como contaminación del jarabe o de los envases, etc, que van a afectar el producto final, Por lo que se debe determinar en qué parte del proceso debió ocurrir la contaminación para corregir tal falla y optimizar el proceso con ajustes en los Sistemas de Calidad (Bermudez, 2008).

Yujra N, realizó un estudio en Bolivia a bebidas gaseosas, este se llevó a cabo con muestras de dos lotes de diferente producción de la planta embotelladora de gaseosas Smart Drink, El estudio determinó la cantidad de microorganismos presentes en las bebidas gasificadas, comparando los resultados con la Norma Boliviana NB325001 y la Norma Técnico-Sanitario para la elaboración y venta de bebidas gasificadas 407. Para ello se utilizaron dos muestras de distintas producciones, la primera muestra fue obtenida del lote producido en la fecha 29 de octubre de 2008 con una producción total de 480L/Día, la segunda muestra fue de la producción en fecha 4 de noviembre de 2008 con una producción de 600L/Día. Obteniéndose en el lote del 4 de noviembre de 2008 un recuento igual al límite máximo permisible que representa < 10 UFC/ml de aerobios mesófilos. Lo cual indica que en la elaboración de ese lote se propagaron algunos problemas ya sea por deficientes métodos de manipulación, contaminación de la

instalación, equipos y materiales a utilizar, o simplemente por contaminación con la materia prima y la materia prima suplementaria (Yujra, 2008).

Bermudez P, publicó un estudio de la contaminación de bebidas gaseosas envasadas en PET causadas por mohos y levaduras en la empresa Ajecuator e Ecuador debido a la devolución inmediata de algunos lotes de la bebida gaseosa first sabor limón en presentación de 1.5 litros, Dentro del proceso se obtuvieron resultados que estaban dentro de los límites permitidos, sin embargo dos áreas presentaban parámetros muy cercanos al máximo incluso superior a ella, estas dos áreas fueron el área de jarabe terminado y el área de envasado. Se determina que de las 25 devoluciones sufridas en el periodo de estudio el 40% corresponde a la contaminación del producto (mohos y levaduras), seguido por botellas que no tienen la forma específica (mal soplado). Con porcentajes muy similares entre el etiquetado de las botellas y la incorrecta codificación de lotes (Bermudez, 2008)

10. CONCLUSIONES

- Se logró determinar la presencia de Aerobios Mesófilos y Levaduras en muestras de azúcar teniendo en cuenta la NTC 4306, sin embargo, los recuentos obtenidos no exceden los permitidos por dicha Norma.
- Se detectó la presencia de Aerobios Mesófilos en muestras de agua teniendo en cuenta la Resolución 2115 de 2007 y lo expuesto en el parágrafo 1 de la misma, en donde dichos recuentos no exceden los estipulado en la Resolución, por otro lado se obtiene Ausencia/100mL en los análisis de Coliformes Totales y Coliformes Fecales y *Pseudomonas spp* y *P. aeruginosa*.
- A partir de muestras de productos en proceso, se encontraron Aerobios Mesófilos y Mohos y Levaduras pero solo estos dos últimos excedieron el límite permitido por la Norma Postobón N° BE1-04-106.
- Se logró determinar la presencia de Aerobios Mesófilos y Mohos y Levaduras en muestras de bebidas gaseosas incumpliendo la NTC 2740, debido a que los recuentos para Mohos exceden el valor máximo permitido.

11. RECOMENDACIONES

- Las operaciones de envasado (es decir, el llenado y cierre de los recipientes) deberán efectuarse utilizando procedimientos que ofrezcan protección contra la contaminación. Entre las medidas de control aplicables figuran la utilización de una zona cerrada y de un recinto cerrado para realizar las operaciones de envasado, separándolas de las demás operaciones que tiene lugar en la planta de elaboración como protección contra la contaminación. Deberá controlarse y vigilarse la presencia de polvo, suciedad en los revestimientos y microorganismos en el aire.
- Se deberá realizar un calendario sanitario donde se destaquen y se respeten los siguientes puntos:
 - Control y mantenimiento de los equipos
 - Control y limpieza de la instalación.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A. S., Pereira, M. y Venâncio A. (2014). A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probable daily intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2012.720619.
- Association of Analytical Communities. Aerobic Plate Count in Foods – Hydrophobic Grid Membrane Filter Method. AOAC 986.32. Philadelphia, USA: AOAC International 2005.
- ATLAS, R.M. & L.C. PARKS (1993) Handbook of Microbiological Media. CRC Press. London
- Auld H. MacIver D. Klaassen J. (2004). Heavy rainfall and waterborne disease outbreaks: the walkerton example. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 67:20-22. pp. 1879-1887.
- Bermúdez P. Estudio de la Contaminación de Bebidas Gaseosas Envasadas en PET Causadas por Mohos y Levaduras en la empresa Ajecuator. 2008. Recuperado de: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/3409>
- Eaton A. D., Clesceri L. S. and Greenberg A W., (Eds.), 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Ed., APHA, Washington, D.C.
- Fundamentos de la verificación microbiológica. Filtración por membrana de Aerobios Mesófilos Medellín, 2015. (BE1-06-60).

- Fundamentos de la verificación microbiológica. Filtración por membrana de Mohos y Levaduras. Medellín, 2015. (BE1-06-61).
- Fundamentos de la verificación microbiológica. Presencia o ausencia de *Pseudomonas* spp y *P. aeruginosa*. Medellín, 2015. (BE1-06-64).
- Fundamentos de la verificación microbiológica. Presencia o ausencia de Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Medellín, 2015. (BE1-06-65).
- International Standardisation Organisation. ISO. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. EN ISO 4833-1:2013
- Lambert P. 2002. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*. JR Soc. Medicina. 95 : 22-26
- Licata M. Las bebidas gaseosas, composición y características de sus ingredientes. 2019. Recuperado de: <https://www.zonadiet.com/bebidas/bebidasgaseosas.html>
- Lozada C. Diseño del plan de saneamiento básico como parte del programa de Buenas Prácticas de Manufactura en las cocinas de un hotel en Bogotá. Trabajo de grado, Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, agosto 2007.
- Lyczak, J, Cannon L y Pier G. 2000. Establecimiento de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*: Lecciones de un oportunista versátil. Los microbios infectan. 2: 1051-1060.
- Norma Técnica Colombiana. BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS. BEBIDAS GASEOSAS O CARBONATADAS. NTC 2740. Segunda edición. 2008. Recuperado de: <file:///C:/Users/HP/Desktop/NTC2740%20BEBIDAS%20GASEOSAS.pdf>

Norma Técnica Colombiana. INDUSTRIAS ALIMENTARIAS. AZÚCAR BLANCO.

NTC 611. Quinta edición. 2004. Recuperado de: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC611.pdf>

Norma Técnica Colombiana. AZUCAR REFINADO. NTC 4306.

Mandel G. Bennet J, Dolin R (2010). Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica. 7^o Edición. Editorial Elseiver.

Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo

Territorial. Características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Bogotá. Junio 2007 (Resolución número 2115).

Organización mundial de la salud. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario – HACCP. Washington, D.C. 2015

PASCUAL ANDERSON, María del Rosario, CALDERÓN Y PASCUAL, Vicente.

Microbiología alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas. 2da edición. Madrid: Díaz de Santos S.A., 2000. 447 p. ISBN 84-7978-424-5.

Postobón S.A. (2019). Quienes somos. Recuperado de: <https://www.postobon.com/la-compania/quienes-somos>

Santillan R. Rodriguez G. et al. Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública?

Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Desarrollo Educativo e Innovación Curricular (CODEIC). 2017. Recuperado de:

http://www.revista.unam.mx/vol.18/num6/art46/PDF_art46.pdf

USEPA United States Environmental Protection Agency – National Primary Drinking Water Regulations - Analytical Methods Approved for Drinking Water Compliance Monitoring under the Total Coliform Rule. Revised June 2019.

Yujra Neyer. Análisis microbiológico de las bebidas gaseosas en Bolivia. 2008.

Recuperado de: <https://www.trabajos69/analisis-microbiologico-bebidas-gaseosas-bolivia/analisis-microbiologico-bebidas-gaseosas-bolivia2.shtml>

World Health Organization (WHO) (2011). Guidelines for drinking water quality. 4th ed. Geneva: WHO. p. 564.

13. ANEXOS

Anexo A. Composición medio de cultivo Plate Count

Este medio de cultivo se adquiere en el mercado, deshidratado y en forma granular, está compuesto por:

- Peptona de caseína
- Extracto de levadura
- D (+) glucosa
- Agar agar

Anexo B. Composición medio de cultivo M-Green

Este medio de cultivo se adquiere en el mercado deshidratado en polvo y en ampollas, está compuesto por:

- Extracto de levadura
- Dextrosa Anhidrida
- Caseína (digestión pancreática)
- Tejido animal (digestión péptica)
- Sulfato de Magnesio
- Fosfato de Potasio
- Diastasa
- Tiamina
- Verde de Bromocresol

Anexo C. Composición medio de cultivo Readycult

Este medio de cultivo se adquiere en el mercado listo para su uso, está compuesto por:

- Triptosa
- Cloruro sódico
- Sorbitol – Triptófano
- Hidrogenofosfato dipotásico
- Dihidrogenofosfato dipotásico
- Lauryl sulfato sal sódica
- x-gal (5 bromo-6 cloro-3indolyl- β - D-galactopiranosido)
- MUG (4-metilumbeliferil - β - D-glucoronido)
- PTG

Anexo D. Composición medio de cultivo Asparagina

Este medio de cultivo se adquiere en el mercado, deshidratado y en polvo o también puede ser preparado a partir de los siguientes componentes básicos:

- Anhidro dipotasio hidrogenofosfato (K_2HPO_4)
- L-Asparagina monohidrato ($C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Glicerol