

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA EMPRESA DE
LÁCTEOS FRESKALECHE S.A.S SEDE AGUACHICA, CESAR.**

SAIRA ANDREINA RAMÍREZ PESCADOR

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER
2021**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA EMPRESA DE
LÁCTEOS FRESKALECHE S.A.S SEDE AGUACHICA, CESAR.**

**SAIRA ANDREINA RAMÍREZ PESCADOR
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGO**

**TUTORA ACADÉMICA
PhD. CLAUDIA CLAVIJO OLMOS**

**M.s.c ALEXANDRA PINO NAVARRO
DIRECTORA DE TRABAJO**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER
2021**

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Pamplona, diciembre 2021.

Agradecimientos

En primer lugar, le agradezco a Dios, por bendecirme y acompañarme a lo largo de mi vida.

A mis padres por la crianza que me dieron, por hacer de mí una buena persona, soñadora y feliz. En especial, agradezco a mi padre por ser mi motor, mi guía y compañero, por su esfuerzo, sacrificio y sobre todo su apoyo en todo momento, por motivarme a salir adelante y siempre creer en mí.

A mis hermanos por su apoyo, colaboración y amor en todo este camino que hoy finalmente se materializará.

Agradezco a todos los amigos que hice a lo largo de mi carrera, por su lealtad, sinceridad y compañerismo. Especialmente, agradezco a Rosa Alzate, por ser mi compañera, mi confidente y mi equipo de trabajo, hoy materializamos este sueño juntas, como siempre lo soñamos.

Por último, agradezco a aquellos docentes que contribuyeron a mi formación profesional en estos años, por guiarme y hacer de mí una profesional con altos valores morales y éticos.

Tabla de contenido

1. Objetivos	2
1.1 General	3
1.2 Específicos	3
2. Justificación	3
3. Marco referencial	5
3.1 Generalidades de la Leche	5
3.2 Microorganismos presentes en la leche cruda	5
3.3 Epidemiología	8
3.4 Procesos industriales de la leche	9
3.5 Control de calidad en la cadena láctea	10
4. Área de estudio	12
4.1 Marco legal	13
4.1.1 Ministerio de la Protección Social	13
4.1.2 Norma Técnica Colombiana NTC	14
4.1.3 Norma Técnica NTC-ISO/IEC colombiana	14
5. Metodología	16
5.1 Análisis de leche cruda	16
5.2 Análisis de leche termizada	16
5.3 Análisis de HHRS en leche cruda	16
5.4 Análisis de Leche UHT	17
5.4.1 Análisis a las 48 horas	17
5.4.2 Análisis a los 10 días (Esterilidad Comercial)	17
5.5 Análisis de Agua potable	18
5.5.1 Siembra convencional	18
5.5.2 Filtración por membrana	18
5.6 Análisis patógenos <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp</i>	18
5.7 Análisis de ambientes	19
5.8 Análisis de manipuladores	20
6. Cronograma de actividades	21

7. Resultados y análisis	22
7.1 Análisis de leche cruda de los acopios de la zona y silos pertenecientes a la planta.	22
7.1.2 Recuentos de aerobios mesófilos en los silos de la planta.	25
7.2 Recuento de Enterobacterias en los silos de leche procesada	27
7.3 Esporas HHRS en leche cruda.	29
7.4 HHRS en leche de proceso.	32
7.5 Análisis de producto UHT	33
7.5.1 Análisis de 48 horas	33
7.5.2 Esterilidad Comercial	34
7.6 Análisis de aguas, patógenos, ambientes y manipuladores en la planta.	37
8. Conclusiones	39
9. Recomendaciones o sugerencias	40
10. Glosario	41
11. Referencias	43
12. Anexos	48
12.1 Recuento de Aerobios mesófilos	48
12.2 Recuento Enterobacterias	48
12.3 Lector de Placa petrifilm 3M	49
12.4 Cronograma de actividades durante la pasantía empresarial	49

Lista de tablas

Tabla 1. Promedio de los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos en los meses Julio a noviembre.-----	22
Tabla 2. Promedio de recuentos mensuales de aerobios mesófilos en los silos de leche cruda de la planta. -----	25
Tabla 3. Promedio de UFC/ml de cada uno de los silos de leche procesada de la planta en los meses de julio a noviembre.-----	27
Tabla 4. Presencia HHRS en leche cruda de los acopios de la zona en los meses de julio a noviembre. -----	31
Tabla 5. Porcentaje de presencia de HHRS en muestras de leche termizada.----	33
Tabla 6. Porcentaje presencia esporas HHRS en leche UHT. -----	34
Tabla 7. Porcentajes mensuales de esterilidad comercial en aerobiosis y anaerobiosis (utilizando el aceite comercial).-----	¡Error! Marcador no definido.

Lista de gráficas

Gráfica 1. Comportamiento microbiano de leche cruda de los acopios aledaños a la zona identificando cada acopio por medio de un color. Estos datos se presentan en forma de logaritmo.	23
Gráfica 2. Promedio de Aerobios mesófilos de los silos de leche cruda durante los meses de julio a noviembre, representados por colores.	26
Gráfica 3. Promedio de recuento de Enterobacterias presente en los silos de leche procesada. Naranja: silo F; Gris: silo G, amarillo: silo H; azul: silo I; verde: silo J; rosado: Silo K; café: silo L; rojo: silo M.	28
Gráfica 4. Promedio de presencia de HHRS en leche cruda de los acopios. Rojo: Acopio 1; Azul: Acopio 2; Amarillo: Acopio 3; Verde: Acopio 4.	32
Gráfica 5. Consolidado de leche cruda, termizada y UHT con presencia presuntiva de HHRS en los meses de Julio a noviembre. Rojo: Leche cruda; Verde: Leche termizada; Azul: Leche UHT.	36

Lista de figuras

Figura 1. Impacto del cambio climático y la alimentación en la contaminación por microorganismos, residuos químicos y antibióticos a largo de la cadena de producción láctea.	7
Figura 2. Vista previa instalaciones Freskaleche S.A.S	13
Figura 3. Kit para patógenos 3M. MDS	19
Figura 4. Tinción de Gram, prueba de oxidasa y catalasa realizada a las colonias típicas de HHRS en medio BHI.	29
Figura 5. Ejemplo de crecimiento aerobios mesófilos de muestras de leche cruda en petrifilm AC. Dilución 10^{-5}	48
Figura 6. Ejemplo de crecimiento de Enterobacterias en muestras de leche procesada. Dilución 10^{-1}	48
Figura 7. Ejemplo de lectura de recuentos por medio del sistema de lector de placa automatizado de 3M.	49

Introducción

La leche es un producto de origen natural, proveniente de mamíferos (vaca, búfala, cabra, camella, entre otros), catalogado como un alimento de gran importancia en la alimentación de la población en general, especialmente en niños puesto que, aporta nutrientes esenciales convirtiéndose en una gran fuente de energía, proteínas de alta calidad y grasas (Fao, 2021).

Colombia ocupa el cuarto lugar en producción de leche en América latina, aproximadamente el 41% del total de ganado se dedica a la producción de leche, esta producción contribuye positivamente a la economía tanto rural como urbana (Reyes, 2011). En 2020, Fedegan realizó una estimación de producción de leche cruda de 7.393 millones de litros, de los cuales 3.437 son recolectados en los diferentes centros de acopio que existen en el país. La leche cruda que llega a cada uno de estos centros de acopio es procesada por medio de tratamientos con calor, como termización, pasteurización y ultra pasteurización con el objetivo de eliminar la carga microbiana que esta pueda contener y ofrecer a la comunidad un producto inocuo y de alta calidad (Fedegan, 2020).

La calidad de leche juega un papel importante para las industrias lácteas puesto que, de esto depende que sus productos y derivados sean inocuos y cuenten con la calidad para los usos previstos. Para controlar la presencia de microorganismos en la leche cruda se establecen buenas prácticas de producción, fabricación, refrigeración y almacenamiento. De igual forma, la legislación Colombiana por medio del Decreto 616 de 2006 establece parámetros de calidad microbiológica para leche pasteurizada, ultra pasteurizada y leche en polvo, ya que, la presencia de altos recuentos de microorganismos mesófilos en la pasteurización pueden liberar enzimas proteolíticas que pueden disminuir la vida útil del producto y afectar las características fisicoquímicas del mismo, además, presenta límites en recuentos en el grupo de coliformes (totales y fecales) los cuales son indicadores de malas prácticas llegando a indicar contaminación fecal (Decreto 616, 2006). Sin embargo, un bajo recuento de microorganismos mesófilos no asegura la ausencia de patógenos o toxinas, así como un elevado recuento no significa que exista flora patógena en el producto, esto depende directamente de la manipulación y el proceso de manufactura de la materia prima (Rodríguez et al., 2015).

Algunos microorganismos encontrados en la leche y sus entornos incluyen, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, la presencia de estos microorganismos tanto en el producto como en las superficies, ambientes entre otros, pueden afectar la calidad de la leche y promover a su deterioro por medio del desarrollo de lipasas y proteasas características de algunos microorganismos (Aguilera et al., 2014). La presencia de esporas

bacterianas son un contaminante común de productos alimenticios, en especial productos lácteos, debido a que, estas esporas surgen como método de supervivencia al calor, denominadas comúnmente como esporas altamente resistentes al calor “HHRs” (por sus siglas en inglés: highly heat-resistant spores), contaminando el producto, formando biofilms que a su vez van contaminando los equipos implicados en la fabricación y por ende el producto final (Perín et al., 2019).

Los tratamientos térmicos de alta temperatura durante cortos periodos de tiempo, seguidos de un choque térmico a bajas temperaturas están diseñados para eliminar la carga microbiana presente y prolongar la vida útil de los productos terminados, en el caso de los productos lácteos se establecen varios procesos tales como: termización, en la cual la leche se lleva a una temperatura de 65 a 68°C durante 15 segundos, pasteurización 75°C por 15 segundos y un proceso de UHT (Ultra High Temperature) que se lleva a cabo a temperaturas entre 130 a 150°C durante 2 a 4 segundos por proceso térmico de fluido continuo, posteriormente en cada uno de estos procesos térmicos la leche se enfría inmediatamente a temperaturas por debajo de 32°C y se envasa en condiciones asépticas utilizando envases estériles y herméticos (Cole y Goetze, 2021).

La industria láctea en Colombia está enfocada en ofrecer a la comunidad productos de alta calidad e inocuos, para esto, debe cumplir con estándares de calidad establecidos no sólo con la materia prima y el producto final sino con todo lo directamente relacionado en la cadena de producción como insumos, instalaciones, equipos, personal colaborador, superficies, ambientes entre otros, de tal forma que evidencie las buenas prácticas de manufactura y producción del mismo.

1. Objetivos

1.1 General

Evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda, termizada, producto final UHT y los factores que intervienen en el proceso de producción en la empresa de lácteos Freskaleche S.A.S sede Aguachica, Cesar.

1.2 Específicos

- ✓ Analizar la calidad microbiológica de la leche cruda, termizada y producto final UHT.
- ✓ Determinar la presencia de esporas altamente resistentes al calor “HHRS” en el producto final UHT.
- ✓ Verificar la calidad microbiológica en aguas, ambientes, superficies y manipuladores el área de producción de la empresa.

2. Justificación

La industria láctea es una de las más importantes en nuestro país y cuenta con un gran número de empresas dedicadas a la producción de una variedad de productos y derivados lácteos, realizando actividades que van desde la recepción de materia prima, producción, envasado y distribución de los mismos, llegando así a un gran número de consumidores en todo el país. Cada vez se hace más necesario garantizar la calidad e inocuidad de los productos, generando satisfacción, beneficio y confiabilidad por parte de los consumidores. Existe una variedad de microorganismos que van desde psicrófilos, mesófilos y recientemente se ha evidenciado la presencia de microorganismos que sobreviven la ultra pasteurización denominados termorresistentes que a lo largo de la cadena de producción pueden afectar y alterar la inocuidad del producto final. No obstante, estos microorganismos no solo se presentan en la leche cruda, también hay factores a tener en cuenta que pueden generar contaminación a lo largo del proceso, cómo lo son tanques, carrotanques, máquinas, contenedores, ambientes, superficies, aguas, insumos y hasta el personal manipulador del mismo. Freskaleche cuenta con un amplio portafolio de productos disponibles en el mercado, todos estos de alta calidad, cumpliendo con los parámetros físicos y microbiológicos establecidos en el Decreto 616 de 2006, decreto 60 de 2002 para la línea de leche en polvo empaque industrial y el sello de Quality Check en leche UHT. Para garantizar el cumplimiento de estos requisitos legales es necesario llevar a cabo una serie de análisis y seguimientos microbiológicos tanto a los factores expuestos anteriormente cómo al producto final apoyados por los programas pre-requisitos como buenas prácticas de manufactura, uso de aguas tratadas y programas de limpieza y desinfección.

3. Marco referencial

3.1 Generalidades de la Leche

La leche es considerada un producto integro, proveniente del ordeño total de hembras lecheras, sanas, bien alimentadas. Dentro de sus características generales presenta un color blanco, opaco, sabor dulce, pH cercano a la neutralidad (6.6 a 6,8), compuesta por 87% agua, 4,6% lactosa, 4,0% grasa, 3,25% proteínas y 1% minerales. Estas características la convierten en un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias. La diversidad de microorganismos que aquí se puedan encontrar depende directamente de los procesos de limpieza y desinfección que se utilicen desde el momento del ordeño hasta las condiciones de transporte y almacenamiento que se proporcione (Perín et al., 2019).

3.2 Microorganismos presentes en la leche cruda

Los microorganismos presentes en la leche cruda ya sea de forma directa o indirecta están compuestos por un amplio rango de bacterias tanto gram negativas como gram positivas, dentro de las que se resaltan los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* (Calvo, 2018). Adicionalmente, pueden encontrarse microorganismos patógenos, como *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Brucella abortus* entre otros, responsables de brotes de enfermedades en algunos casos con grandes complicaciones pudiendo causar hasta la muerte (Mungai et al., 2015).

La microbiota por la cual está compuesta la leche impacta directamente en el desarrollo del producto final elaborado (Leche UHT, yogurt, queso, entre otros) ya que, muchos de estos microorganismos pueden llevar a cabo la producción de lactato como producto de la fermentación de la leche, afectando las propiedades organolépticas y sensoriales de los productos finales mencionados. Igualmente, se pueden presentar impactos negativos en la calidad y vida útil de la leche como la presencia de microorganismos psicrófilos o psicrotolerantes los cuales tienen la capacidad de desarrollarse y proliferar en temperaturas de refrigeración provocando el deterioro de la misma (Quigley et al., 2013). Para llevar a cabo el recuento de la

carga microbiana presente en la leche se han descrito tecnologías novedosas que contribuyen a obtener resultados en menor tiempo y minimizando costos. El sistema de bioluminiscencia LMS-II 3M, es una tecnología de bioluminiscencia basada en la detección de ATP (Adenosina Trifosfato), que está presente en todas las células vivas utilizando como indicador de contaminación biológica. Este sistema está basado para excluir las fuentes de ATP no microbianas, por medio de la inyección de 3 componentes: 1 ATPasa para romper la pared celular de los microorganismos presentes en las muestras; 2 Extractante para liberar el ATP; 3 Luciferasa, enzima que reacciona con el ATP transformando la luciferina en oxiluciferina, proteína que tiene características bioluminiscentes permitiendo cuantificar por medio de unidades relativas de luz (RLU) (Obregón, 2014).

El proceso en la cadena láctea está compuesto por cuatro aspectos principales: producción de alimentos y condiciones de vida de los animales que forman parte de la granja lechera; recolección (ordeño) y procesamiento de la leche; comercialización de producto terminado y transporte tanto de materias primas como de productos terminados. La contaminación por microorganismos, toxinas, residuos químicos, antibióticos entre otros, puede darse en cualquiera de estas etapas, teniendo como factores principales la alimentación y el cambio climático (Babalola, 2021). A medida que pasa el tiempo el cambio climático está provocando condiciones de alta temperatura, humedad, precipitación eso hace que el ganado lechero sea susceptible a infección por patógenos y al estrés térmico, afectando tanto la cantidad como la calidad de la leche. El cambio climático crea las condiciones óptimas para el desarrollo de hongos productores de micotoxinas en cosechas de granos que posteriormente se convierten en el alimento del ganado (Lacetera, 2019).

Dentro de las enfermedades a las que pueden estar expuestas el ganado lechero está la mastitis ambiental, aquí las puntas de los pezones pueden contaminarse con microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente donde vive el ganado (corrales, pasto, sitio de ordeño, entre otros), estos microorganismos pueden sobrevivir y multiplicarse generando una mayor contaminación. Generalmente la mastitis involucra géneros de microorganismos como bacterias coliformes, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. La leche producto del ordeño de vacas con mastitis se convierte en una amenaza para la seguridad e inocuidad alimentaria, por lo que generalmente es rechazada en los centros de acopios (Babalola, 2021). En la figura 1 se presentan las diferentes fuentes de contaminación que pueden entrar en contacto a lo largo de la cadena láctea.

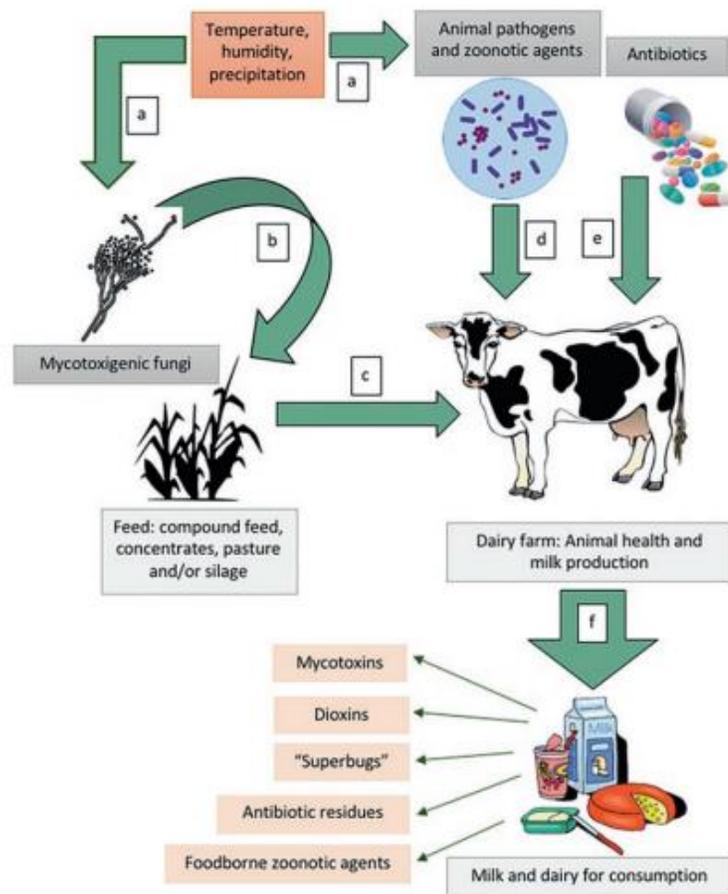


Figura 1. Impacto del cambio climático y la alimentación en la contaminación por microorganismos, residuos químicos y antibióticos a largo de la cadena de producción láctea.

Fuente: (Babalola, 2021).

Otra de las fuentes de contaminación de la leche está en el segundo aspecto que es la recolección de la leche, y es que el sistema de ordeño independientemente que sea manual o automatizado acarrea una gran cantidad de microorganismos de diferentes fuentes, en primer lugar, la superficie del pezón que puede contener una variedad de microorganismos dependiendo de ambiente donde se encuentren ubicados, clasificados a nivel de filo en *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Las prácticas inadecuadas a la hora del ordeño (lugar de ordeño, limpieza de manos, recipientes y utensilios etc) y/o deficiencias en los procesos de limpieza y desinfección en máquinas de ordeño pueden contribuir a una mayor contaminación en donde muchos de estos microorganismos llegar a proliferar directamente en la leche. Por ende, la implementación de normas de higiene contribuye a una

reducción de la carga microbiana en el ganado lechero y por consiguiente en la leche cruda (Quigley et al., 2013).

3.3 Epidemiología

Toda la microbiota presente en la leche cruda especialmente la microbiota patógena puede tener implicaciones en la salud de sus consumidores. Una recopilación realizada por Newkirk et al., 2011 estableció que en el periodo de 1990 a 2006 se reportaron 83 brotes transmitidos por leche líquida de los cuales 37 estaban relacionados al consumo de leche pasteurizada y 46 a leche cruda teniendo como microorganismos responsables a *Campylobacter* spp, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp (Newkirk et al., 2011). El Centro de Control de Enfermedades (CDC) reportó que durante los años 2007 a 2012 informó un total de 81 brotes asociados al consumo y comercialización de leche cruda de diferentes fuentes en Estados Unidos, el patógeno más común fue *Campylobacter* spp responsable de 62 brotes, *E. coli* productor de la toxina shiga 13 brotes, *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium con 2 brotes y *Coxiella burnetii* responsable con 1 de los 81 brotes y tres brotes incluían múltiples patógenos. Todos estos brotes resultaron en 979 enfermedades, 73 hospitalizaciones y 0 muertes (Mungai et al., 2015).

En Colombia durante el periodo de 2008 a 2010 se reportaron 2 brotes por consumo de leche cruda, involucrándose a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo como responsables de los mismos. En este mismo año, se reportaron 147 brotes asociados al consumo de queso, involucrándose como responsable de estos a *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Bacillus cereus*, *Shigella* spp. y *Listeria monocytogenes* (Instituto Nacional de Salud [INS], 2011).

Estos brotes asociados generalmente al consumo de leche cruda representan una gran problemática de salud pública en todo el mundo, requiriéndose un mayor control en las prácticas de ordeño, almacenamiento y transporte de la misma para disminuir la probabilidad de contaminación con microorganismos que puedan afectar la salud de las personas (Mungai et al., 2015).

Sin embargo, dentro de la gran variedad de microorganismos presentes en la leche cruda se encuentran microorganismos los cuales son clasificados como tecnológicamente relevantes puesto que, llevan a cabo fermentaciones naturales. Muchos de estos microorganismos son aislados de la misma leche cruda para crear

los famosos cultivos iniciadores, los cuales son agregados conscientemente a la leche para compensar la posible eliminación de poblaciones de microorganismos, conferir características sensoriales deseadas a los productos finales como la elaboración de queso, yogurt, Kumis entre otros y contribuir a la flora intestinal y su metabolismo funcionando como probióticos. Dentro de los microorganismos tecnológicamente relevantes se destacan los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, algunos *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Leuconostoc* (Quigley et al., 2013).

En Colombia además del Decreto 616 de 2006 que está dirigido especialmente a los requisitos que debe cumplir la leche para consumo humano, presenta la NTC 399 de 2002 que establece los requisitos microbiológicos que debe cumplir la leche cruda que es recolectada en los centros de acopio, en la que acepta un máximo de 700.000 UFC/ml en el recuento de aerobios mesófilos como indicador de leche de buena calidad para sus diferentes usos (Norma Técnica Colombiana [NTC] 399, 2002).

3.4 Procesos industriales de la leche

La mayoría de los procesos industriales utilizan diferentes tratamientos térmicos, los cuales contribuyen a la constante mejora del producto y su vida útil, ofreciendo calidad e inocuidad en cada uno de estos. En la industria láctea se usan procedimientos como la pasteurización que consiste en la eliminación de microorganismos patógenos y reducción del número de microorganismos que puedan causar deterioro por medio de tratamiento de la leche a una temperatura de 72 a 75°C por 15 segundos y la Ultrapasteurización o Ultra Alta Temperatura que involucra temperaturas mayores, consiste en someter la leche a una temperatura de 130°C por 20 segundos logrando eliminar aquellos microorganismos que pudieran sobrevivir a la pasteurización. Sin embargo, estos tratamientos sólo destruyen las formas vegetativas de los microorganismos, lo que quiere decir que los microorganismos con capacidad de esporular pueden resistir estas temperaturas llegando, quedando en el producto, causando deterioros y pérdida de calidad de los productos finales (Deeth y Lewis, 2017).

Actualmente, se está presentando una problemática a nivel nacional y es la presencia de bacterias esporoformadoras resistentes a procesos de altas temperaturas, generalmente pertenecientes al género *Bacillus*, y clasificado como una nueva especie *Bacillus sporothermodurans* cuya principal característica es la

producción de esporas resistentes a Ultra Alta Temperatura, denominadas “highly heat-resistant spores (HHRS)” (Castañeda, 2015). Según la NTC 4433, la leche UHT debe cumplir con ciertos requisitos microbiológicos como esterilidad comercial: después de 10 días de incubación del producto, este no debe presentar crecimiento microbiano a 55° y 35°C (Norma Técnica Colombiana [NTC] 4433, 2015), por medio de esta prueba se pretende identificar si la presencia de contaminantes corresponde a esporas HHRS y con ayuda de análisis moleculares a *Bacillus sporothermodurans*.

3.5 Control de calidad en la cadena láctea

Para poder garantizar buenas prácticas de manufactura a lo largo de la cadena de producción láctea y una excelente calidad de los productos finales es necesario tener en cuenta todos los aspectos que pueden entrar en contacto en la planta de producción en general, ya que la contaminación puede tener su origen inicialmente en leche cruda o puede ser introducida por medio de materias primas, agua, personal colaborador, fuentes ambientales o equipos involucrados (Skara y Rosnes, 2016).

El agua potable que abastece toda la planta (filtros, tuberías, mangueras entre otras) principalmente el agua destinada al consumo humano debe cumplir con las características microbiológicas estipuladas en la Resolución 2115 de 2007, esta norma establece los requisitos que debe cumplir el agua destinada para consumo humano (Resolución 2115,2007) garantizando su inocuidad y la calidad de la misma en los procesos de limpieza y desinfección empelados. El análisis de aguas por filtración por membrana es un procedimiento eficiente para el recuento de microorganismos presentes en las muestras a analizar. En este procedimiento se logra recolectar microorganismos con tamaños mayores al poro de la membrana que es de 0,45 µm generalmente, por medio de una bomba eléctrica de vacío, ejerciendo una presión sobre las muestras haciendo que esta se filtre. Los microorganismos que quedan retenidos en la membrana se llegan a un medio de cultivo ideal que permite su crecimiento y posterior recuento (Navarro, 2007).

Aparte del control microbiológico realizados a las aguas, los riesgos de contaminación transmitidos a los alimentos tienen como responsables el personal que está en constante contacto con estos, ya que, se convierte en el medio de conexión entre el microorganismo y el alimento. Las enfermedades comúnmente

transmitidas por alimentos y los cuales son clave en análisis de manipuladores son el grupo de las enterobacterias, especialmente *E. coli* que causa intoxicación, diarrea, vómito y malestar general, *E. coli* hace parte del tubo digestivo y eliminada al exterior por medio de las heces, es común encontrarla en el ambiente, aparte de que puede sobrevivir por largo tiempo en el agua y el ambiente, lo que la convierte en un indicador de contaminación fecal (Valdiviezo et al., 2006). Además, la presencia de *S. aureus* en alimentos también ha estado fuertemente marcada en molestias gastrointestinales, náuseas y vómitos, este microorganismo es ubicuo, está presente en el ser humano, el ambiente, el agua, entre otros. Estas enfermedades están clasificadas como las más comunes transmitidas por alimentos, por su facilidad permanecer en el ambiente y su capacidad de proliferar en los alimentos, convirtiéndose en los principales análisis realizados a manipuladores al ser los directamente involucrados en la elaboración de alimentos (Zendejas et al., 2014)

Los aspectos mencionados anteriormente deben estar rigurosamente controlados en el área de producción puesto que es aquí donde se lleva a cabo las principales etapas de la cadena láctea, por ende, debe garantizarse que la planta de producción tenga un control microbiológico ambiental en general y especialmente, que esté libre de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patógena en sus superficies, y equipos. En esta área, cualquier tipo de acción correctiva o medida preventiva debe ser rápida y eficaz, para controlar y evitar una propagación de contaminación, minimizando el riesgo para los consumidores y prevenir problemas de salud pública. Ciertos patógenos o microorganismos y sus toxinas pueden estar presentes no solo en la leche cruda sino en aspectos mencionados anteriormente como materias primas, equipos, superficies etc, estos a su vez pueden llegar a contaminar los productos lácteos provocando brotes y enfermedades. Para minimizar esta problemática, es necesario controlar todos estos aspectos, incluidas las temperaturas de pasteurización y Ultrapasteurización, así como recalcar las buenas prácticas de fabricación, manipulación, almacenamiento de productos y sus derivados, protocolos de limpieza y desinfección de instalaciones, ambientes, superficies y equipos y utensilios evitando el crecimiento y supervivencia de cualquier tipo de microorganismo que pueda afectar la salud. (Dairy Pathogen Manual, 2016).

En la actualidad, existen tecnologías para la detección molecular de patógenos que en sus inicios era exclusivo para fines médicos, sin embargo, estas tecnologías están siendo adoptadas por empresas industriales como panadería, bebidas, huevos frutas y verduras, productos cárnicos, nutracéuticos y lácteos ya que ofrece

una alta especificidad y sensibilidad obteniendo resultados en máximo 75 minutos. El Sistema de Detección Molecular (MDS) de la casa comercial 3M presenta una novedosa técnica que emplea la amplificación isotérmica de ADN mediada por bucle (LAMP) en conjunto con la detección por bioluminiscencia, utiliza un solo enriquecimiento y el mismo protocolo es apto para el análisis de diversos patógenos (Luca, 2018). LAMP es reconocida como una técnica altamente robusta, eficaz, sensible, específica y sencilla que utiliza ADN polimerasa Bst con desplazamiento de cadena, además utiliza entre 4 y 6 cebadores para generar una amplificación continua de ADN todo esto en una sola única temperatura generalmente de 60 a 65°C a diferencia de la PCR en la que la extensión de ADN está limitada por un periodo específico en cada ciclo de temperatura. El MDS 3M presenta kits para el análisis de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 (incluida H7), *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* y *Campylobacter*, tanto en muestras de alimentos como muestras ambientales (Hu et al., 2017).

No obstante, todas estas tecnologías novedosas están sujetas a validación en cada uno de sus ensayos, para asegurar que es una herramienta que cumple con los estándares para los cuales es utilizada. En esta validación se obtiene como resultado la certificación sobre el cumplimiento o incumplimiento de los requisitos para su uso o aplicación (Quesada, 2019).

4. Área de estudio

La pasantía empresarial se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología en la Planta de lácteos Freskaleche S.A.S regional Este, filial de Productos Naturales de la Sabana S.A.S.

Compañía dedicada a ofrecer productos lácteos y alimentos procesados, que busca garantizar la satisfacción de las necesidades de todas sus partes interesadas, la protección del medio ambiente y la seguridad y salud de todos los colaboradores, contratistas y visitantes.



Figura 2. Vista previa instalaciones Freskaleche S.A.S

Fuente: (Freskaleche, 2021)

4.1 Marco legal

4.1.1 Ministerio de la Protección Social

Decreto 616 de 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.

Este decreto se expidió el 28 de febrero del 2006 establece los requisitos que debe cumplir la leche de animales bovinos, bufalinos y caprinos, destinada para el consumo humano con el objetivo de proteger la vida y la integridad humana. Como se menciona anteriormente, se aplica en leche obtenida de bovinos, bufalinos y caprinos; en todos los establecimientos donde se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice y expendia leche destinada para el consumo humano; y a actividades de inspección, vigilancia y control desde la obtención hasta el expendio. En este decreto se incluye un plan de saneamiento en los hatos de ordeño que asegure una disminución de los riesgos de contaminación de la leche, salud e higiene del personal de ordeño, programas de capacitaciones, control en las

plantas, prohibiciones, especificaciones técnicas de la leche, condiciones de higienización y otras disposiciones que aseguren la calidad de la leche y sus productos derivados (Decreto 616, 2006).

Resolución 2115 de 2007: Este documento señala las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Son los análisis microbiológicos realizados al agua de consumo humano para evaluar la presencia o ausencia, tipo y cantidad de microorganismos (Resolución 2115, 2007).

4.1.2 Norma Técnica Colombiana NTC

NTC 4433 de 2015 Método para evaluar esterilidad comercial en alimentos.

Esta norma describe métodos empleados y estandarizados para evaluar esterilidad comercial en alimentos, los métodos son usados para determinar si los alimentos envasados herméticamente, cumplen con los requisitos de la esterilización comercial, donde son catalogados como estériles. La esterilidad comercial de un alimento tratado térmicamente es una condición que adquiere aplicando el calor suficiente, sólo o combinado con otros tratamientos, para liberar el alimento de patógenos y de otros microorganismos capaces de reproducirse en él según las condiciones ambientales en las que se mantenga durante su distribución y almacenamiento (NTC 4433, 2015).

NTC 6257 de 2018 Método horizontal para la detección de *Bacillus sporothermodurans* en leche UHT. Esta norma proporciona requisitos generales sobre los métodos para la detección e identificación de *Bacillus sporothermodurans* y de spora termorresistente en leche UHT (Norma Técnica Colombiana [NTC] 6257, 2018)

4.1.3 Norma Técnica NTC-ISO/IEC colombiana

NTC 17025 de 2017: requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Este documento especifica los requisitos generales para la competencia, la imparcialidad y la operación coherente de los laboratorios. Este documento es aplicable a todas las organizaciones que desarrollan actividades de laboratorio,

independientemente de la cantidad de personal. Los clientes de laboratorio, las autoridades reglamentarias, las organizaciones y los esquemas utilizados en la evaluación de pares, los organismos de acreditación y otros utilizan este documento para confirmar o reconocer la competencia de los laboratorios (Norma Técnica Colombiana [NTC] 17025, 2017).

5. Metodología

Los procedimientos presentados en su mayoría son realizados según procedimientos internos establecidos por la empresa.

5.1 Análisis de leche cruda

De las muestras que llegan diariamente a la planta correspondientes a los diferentes acopios que se encuentran en la zona y de los silos de la planta, se toma una muestra de aproximadamente 30 ml para análisis microbiológico, partiendo de esta muestra, se realizan diluciones hasta 10^{-5} , de esta última se toma 1ml y se siembra en petrifilm AC (petrifilm de aerobios mesófilos), se incuba a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

De la dilución 10^{-1} : se siembra 1mL en petrifilm AC, se incuba a refrigeración 5°C por 7 días.

5.2 Análisis de leche termizada

De igual forma, la leche que ya ha tenido un tratamiento previo (termización) se toma una muestra de 30ml aproximadamente para análisis microbiológico, de las cuales se hará dilución 1:10 (10^{-1}) para su análisis, de la muestra inicial (directa) se toma 1ml y se siembra en petrifilm AC, se incuba a 5°C por 7 días para análisis de microorganismos psicrófilos.

De la dilución 10^{-1} se siembra 1ml en petrifilm EB (Enterobacterias), se incuba a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

5.3 Análisis de HHRs en leche cruda.

De cada muestra, se agregan 10ml en un tubo de ensayo y se llevan al autoclave a una temperatura de 121°C por 3 minutos, se enfría a temperatura ambiente y se incuba a $35 \pm 2^{\circ}$ por 7 días.

Pasado este tiempo, se homogeniza la muestra por medio de vórtex y se siembra en superficie (0.1ml) en caja de Petri con BHI, se incuba a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas (el crecimiento puede verse reflejado a las 24 horas). Posteriormente, de las

muestras que presentan crecimiento característico de *B. sporothermodurans* se realiza tinción de gram y prueba de oxidasa y catalasa para tener una caracterización presuntiva.

5.4 Análisis de Leche UHT.

5.4.1 Análisis a las 48 horas

Transcurridas 48 horas de producción e incubación en cuartos de almacenamiento de cada uno de los productos, Leche: Semi F, Semi A, Ent F, Ent A, Des F, Des A, Crema A, y Avena F, se toman varias presentaciones por lotes, de acuerdo a los tiempos de inicio de producción (IP), cambios de rollo (CR), final de producción (FP). Posteriormente, se abren las bolsas previamente desinfectadas y se toma 50µl de cada una y se depositan en pozos y se llevan al LMS II para determinar su ATP microbiano por bioluminiscencia. Las presentaciones que arrojen unidades de luz altas (color rojo) se siembran en superficie en medio BHI para confirmación de recuento microbiano (Obregón, 2014).

5.4.2 Análisis a los 10 días (Esterilidad Comercial)

Este procedimiento se lleva a cabo según la norma NTC 4433, de la siguiente manera:

Se toman 2 bolsas de leche de cada presentación y se incuban a 35 y 55°C respectivamente. Pasado este tiempo, se toma cada muestra y se siembra 1ml en 8 tubos de Caldo BHI con almidón. El mismo procedimiento para las dos temperaturas. Posteriormente, se incuban 4 tubos en aerobiosis y 4 en anaerobiosis a 35°C por 72 horas.

Transcurridas las 72 horas, se realiza frotis y tinción de gram de cada tubo para observar su morfología y se interpretan los resultados. Si se evidencia crecimiento confirmar en agar nutritivo a 35°C +/- 2°C y 55°C +/- 2°C por 24h en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Por último, se toma pH de las muestras en cada temperatura para evaluar su comportamiento.

5.5 Análisis de Agua potable

Este análisis se lleva a cabo en primera instancia a la planta de tratamiento de agua potable con la que cuenta la empresa, posteriormente a los filtros de agua, enjuagues de tanques, carrotanques, mulas, bancos de hielo y baño serológico, por medio de dos procedimientos:

5.5.1 Siembra convencional

Enterobacterias y Aerobios mesófilos: siembra de 1ml de la muestra en petrifilm EB y AC respectivamente, se incuba a 35° +/- 2°C por 24 horas para Enterobacterias y 48 horas para Aerobios mesófilos.

5.5.2 Filtración por membrana

Análisis de Aerobios mesófilos, Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*

Teniendo el equipo de filtración previamente estéril y armado, se ponen los filtros de membrana sobre la superficie del filtro de goma, posteriormente se pone el embudo, se ajusta y se depositan 100ml de muestra, se abren las llaves y se enciende la bomba de filtración, cuando la muestra baje completamente por el filtro, se cierran las llaves y con ayuda de pinzas estériles se retira el filtro y se coloca en petrifilm de EB, AC y en caja de Petri con medio de cultivo Cetrimide, se incuba a 35° +/- 2°C por 24 y 48 horas respectivamente. El medio de cultivo Cetrimide se incuba a 42°C por 48 horas (Navarro, 2007).

5.6 Análisis patógenos *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*

Este procedimiento se lleva a cabo en toda la planta, realizando muestreos tanto en equipos, superficies, sifones, lavabotas, bodegas, containers y demás instalaciones de la planta de trabajo. El muestreo se realiza por duplicado para el análisis de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*. por medio de frotis sobre cada una de las superficies con las esponjas con mango de 3M las cuales contienen solución amortiguadora neutralizante (figura 3). Luego, se separan las muestras tanto para

Salmonella como *L. monocytogenes*. Para el análisis de *Salmonella* spp, se adiciona 100ml de agua peptona, se incuba a 35°C por 26 horas. Y para el análisis de *L. monocytogenes* se adiciona 100 ml de caldo base Demi-Fraser que contiene 2.5ml de suplemento para *Listeria*, se incuba a 42°C por 26 horas.

Transcurrido este tiempo, se adicionan 20µl (utilizando puntas con filtro) a los tubos que contienen solución de lisis (proporcionado por el kit de cada microorganismo), se llevan una plancha de calentamiento, a 100 +/- 1°C por 15 minutos, después se pasan a temperatura ambiente 5 minutos. Luego se toman 20µl de cada solución y se pasan tubos que contienen un pellet (con 6 primers para unirse al ADN) para la amplificación y detección. Por último, se corren las muestras previamente configuradas en el MDS de 3M para su análisis (Luca, 2018).



Figura 3. Kit para patógenos 3M. MDS

Fuente: (Luca, 2018)

5.7 Análisis de ambientes

Este análisis se lleva a cabo por la técnica de sedimentación utilizando agar SPC y Rosa de bengala, para determinación de aerobios mesófilos y mohos y levaduras, respectivamente. Se ponen las 2 cajas abiertas con el respectivo medio de cultivo, se dejan en exposición durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se incuban a

35 +/- 2°C por 48 horas para aerobios mesófilos y 30°C por 4 días para mohos y levaduras.

En caso de análisis del aire comprimido de cada máquina, la exposición es aproximadamente de 1min directamente en la caja.

5.8 Análisis de manipuladores.

Este análisis se realiza de acuerdo a normativas internas de la empresa.

El análisis de manipuladores se lleva a cabo por cronograma previamente establecidos para su cumplimiento a lo largo del mes, de tal forma que se pueda realizar a todo el personal de la empresa en sus diferentes turnos. Se realizan los siguientes análisis:

Análisis Enterobacterias

Este muestreo se lleva a cabo por medio de contacto directamente en la caja de Petri con agar VRBG, en el cual el colaborador pone cada uno de sus dedos sobre medio, se incuba a 35°C por 24 horas.

Análisis Staphylococcus aureus

Se realiza el procedimiento mencionado anteriormente, pero, utilizando agar Baird Parker. Se incuba a 35°C por 48 horas y se observan los resultados.

6. Cronograma de actividades

Semana	JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Actividad																												
Revisión bibliográfica																												
Capacitación de ingreso a la planta																												
Revisión de manuales y documentación del laboratorio de microbiología																												
Redacción de actividades a realizar.																												
Seguimiento de procedimientos y resultados																												
Registro de resultados																												
Entrega de avances del informe																												
Presentación de informe final para su aval por el tutor.																												
Entrega informe final a la coordinación de laboratorio de la empresa, para obtener su aval.																												
Entrega del informe final a la Universidad.																												

7. Resultados y análisis

Los datos que se presentan a continuación contienen resultados hipotéticos debido a las políticas de privacidad establecidas por la empresa.

7.1 Análisis de leche cruda de los acopios de la zona y silos pertenecientes a la planta.

La lectura de los petrifilm de cada uno de los análisis se realizó por medio del lector de placa petrifilm 3M, el cual me realiza un conteo automatizado, disminuyendo el margen de error en comparación al conteo manual.

En los meses de Julio a diciembre se recolectaron datos de los recuentos de aerobios mesófilos de los acopios de la zona, así como de los silos (tanques) de la planta, haciendo un promedio por mes para establecer el comportamiento de la carga microbiana por mes.

La tabla 1 presenta el promedio de los recuentos obtenidos en los análisis de aerobios mesófilos realizados a las muestras provenientes de los acopios aledaños a la planta.

Tabla 1. Promedio de los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos en los meses Julio a noviembre.

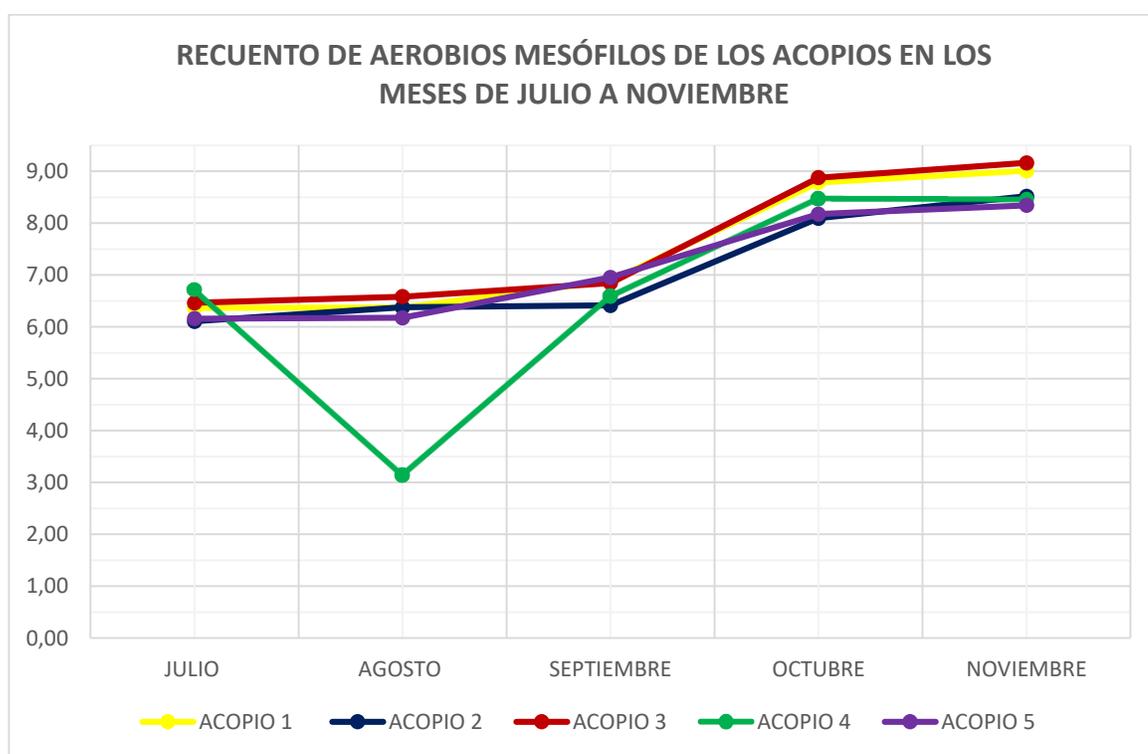
ACOPIO/ME S	JULIO	AGOST O	SEPTIEMBR E	OCTUBR E	NOVIEMBR E
1	2,34E+0 6	2,36E+0 6	7,76E+06	6,11E+08	1,02E+09
2	1,29E+0 6	2,39E+0 6	2,59E+06	1,24E+08	3,30E+08
3	2,91E+0 6	3,84E+0 6	7,03E+06	7,54E+08	1,46E+09
4	5,14E+0 6	1,40E+0 3	3,88E+06	2,96E+08	2,85E+08
5	1,45E+0 6	1,50E+0 6	9,00E+06	1,50E+08	2,20E+08

6	**	**	9,50E+06	5,78E+08	4,31E+08
7	**	**	**	**	1,05E+09

* No se recolectó leche.

** Proveedor nuevo

De los recuentos anteriormente presentados se estableció una comparación entre ellos para establecer el comportamiento de la carga microbiana presente en la leche cruda (gráfica 1) a excepción de los acopios 7 y 8 que son proveedores recientes, por ende, se obtienen datos a partir de los meses de septiembre y noviembre respectivamente.



Gráfica 1. Comportamiento microbiano de leche cruda de los acopios aledaños a la zona identificando cada acopio por medio de un color. Estos datos se presentan en forma de logaritmo.

La gráfica anterior se evidencia un comportamiento relativamente similar a lo largo de los meses entre los acopios, presentándose un aumento constante a partir del mes de septiembre. Sin embargo, el acopio 4 presenta un bajo recuento en el mes de agosto $1,4 \times 10^3$ ufc/ml. La leche cruda al contener una gran cantidad de proteínas, grasas, carbohidratos, entre otros, y un pH llegando a la neutralidad, forma un

ambiente propicio para el desarrollo y proliferación de una variedad de microorganismos. Todo esto como consecuencia de una variedad de factores, como condiciones sanitarias del rebaño, higiene ambiental, equipo de ordeño utilizado, manipulación, refrigeración y procesamiento de la leche (Quigley et al., 2013).

Teniendo en cuenta los resultados expresados anteriormente, se evidencian altos recuentos de aerobios mesófilos que van desde $1,29 \times 10^6$ hasta $3,3 \times 10^8$ ufc/ml. A partir del mes de septiembre, se observa que un aumento considerable en todos los acopios. Varios estudios revelan que la microbiota bacteriana en la leche cruda está sujeta a cambios por factores ambientales, el aumento o disminución de temperatura y humedad juegan un papel importante en los recuentos de la misma, (Li et al., 2018) .Aguachica, al ser una zona bastante calurosa ($30-35^{\circ}\text{C}$), presenta una temperatura óptima para el crecimiento microorganismos, además presenta varias temporadas de altas temperaturas seguidas de lluvias constantes, aumentando la humedad de la zona, brindando las condiciones para que se pueda presentar un aumento de microbiota en la leche.

Según la NTC 399 de 2002 la mayoría de los recuentos reportados se encuentran por fuera del rango aceptado (<700.000) incumpliendo con los requisitos microbiológicos que debe cumplir la leche cruda para su industrialización, sin embargo, en la primera etapa de recibo en acopio donde se realizan pruebas de conservantes, neutralizantes, adulterantes, pruebas de sólidos totales, acidez, crioscopia entre otros, cumpliendo satisfactoriamente con los requisitos expedidos en esta normativa, por lo que es aceptada y pasa a ser transferida a los silos para su posterior procesamiento (NTC 399, 2002).

Recuento de microorganismos psicrófilos

La refrigeración de la leche cruda debe realizarse inmediatamente después del ordeño a temperaturas de 4°C con el fin de controlar la multiplicación de la microbiota hasta el tratamiento térmico. Este tipo de conservación no debe aplicarse sola, puesto que, muchos de los microorganismos que inicialmente se encuentran en la leche, tienen la capacidad de multiplicarse incluso cuando se someten a temperaturas de refrigeración, estos microorganismos conocidos como psicrófilos son considerados como uno de los problemas de contaminación microbiana de la leche cruda (Perín et al., 2019)

En los análisis realizados en el segundo semestre la mayoría de estos fueron <100 UFC/ml ya que estos se realizaban de forma diluida (10^{-2}) por consiguiente se optó por bajar la dilución a 10^{-1} y observar el comportamiento de los datos en el mes de octubre y noviembre, observándose en algunas ocasiones recuentos entre 10 y 50 ufc/ml. Estos bajos recuentos en los silos de almacenamiento minimizan la contaminación y la posible formación de biofilms. Asimismo, flujo de leche en la planta es constante por lo que la leche cruda que ingresa no es almacenada por mucho tiempo, normalmente estos silos se desocupan todos los días evitando el aumento o formación de microorganismos resistentes a estas condiciones. La normativa colombiana no presenta parámetros en el análisis de microorganismos psicrófilos en leche cruda, sin embargo, este análisis se realiza como con el objetivo de llevar a cabo un control interno y medir la presencia de los mismos en la materia prima inicial y verificar su posible incidencia en los diferentes tratamientos térmicos aplicados.

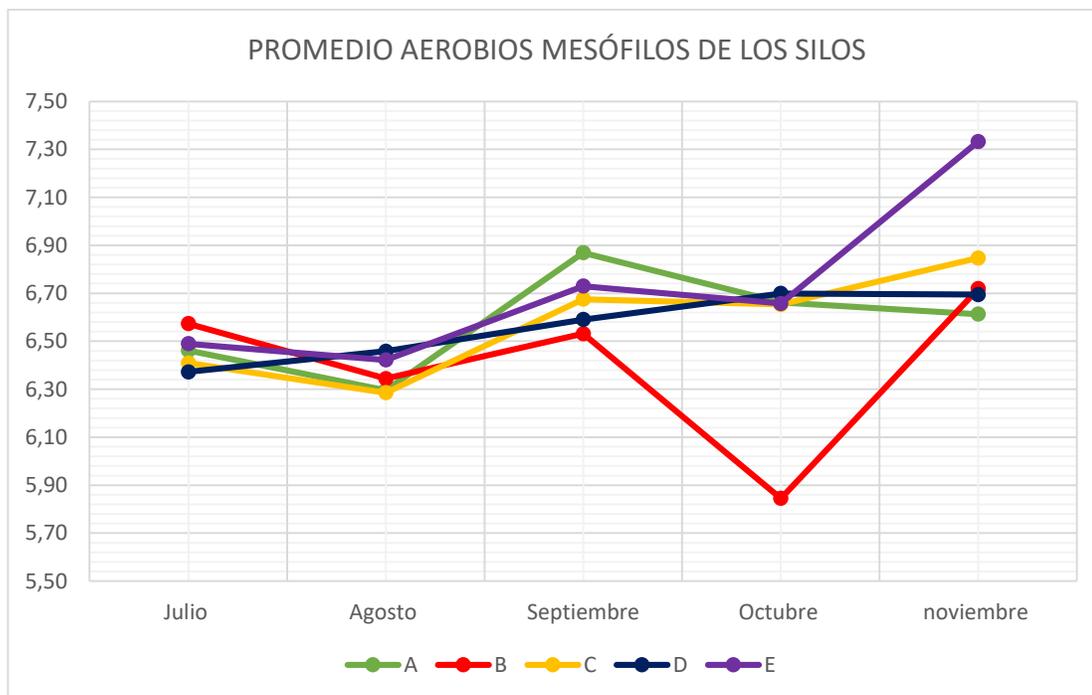
7.1.2 Recuentos de aerobios mesófilos en los silos de la planta.

Según los recuentos en placa obtenidos, se realizó el promedio de los recuentos de aerobios mesófilos por mes de cada uno de los silos de la planta analizados (tabla 2.).

Tabla 2. Promedio de recuentos mensuales de aerobios mesófilos en los silos de leche cruda de la planta.

SILO/ME S	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBR E	OCTUBR E	NOVIEMBR E
A	2,89E+06	1,98E+06	7,39E+06	4,59E+06	4,10E+06
B	3,74E+06	2,21E+06	3,40E+06	7,00E+05	5,23E+06
C	2,57E+06	1,93E+06	4,73E+06	4,50E+06	7,03E+06
D	2,36E+06	2,88E+06	3,89E+06	5,00E+06	4,95E+06
E	3,09E+06	2,64E+06	5,37E+06	4,54E+06	2,15E+07

La gráfica 2 presenta los datos de los promedios obtenidos de los recuentos de cada silo de leche procesada, estos datos se encuentran en forma de logaritmo.



Gráfica 2. Promedio de Aerobios mesófilos de los silos de leche cruda durante los meses de julio a noviembre, representados por colores.

Por medio de esta gráfica podemos observar que todos los silos presentan recuentos relativamente similares, sin embargo, el silo B (rojo) en el mes de octubre, presentó un bajo recuento de Aerobios mesófilos ($7,0 \times 10^5$ ufc/ml), el silo D (azul), presentó un aumento constante hasta el mes de octubre ($5,0 \times 10^6$ y $4,95 \times 10^6$ respectivamente), por último, el silo E (morado) en lo transcurrido del mes de noviembre, presentó un aumento ($2,1 \times 10^7$ ufc/ml). Los silos de la planta almacenan diariamente una gran cantidad de litros de leche cruda (hasta 500m^3) aquí es donde toda la leche recolectada de los acopios y rutas se mezclan, estos silos mantienen una temperatura de enfriamiento de hasta 12°C para una mejor conservación de la misma. Esto hace que la presencia de microorganismos varíe de un silo a otro. Cuando se presentan altas concentraciones de los indicadores de higiene demuestran prácticas inadecuadas de obtención, transporte y almacenamiento. Dentro de estos indicadores se encuentran los aerobios mesófilos que crecen a temperaturas que oscilan entre 25 y 40°C , temperatura que resulta siendo óptima para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, dentro de los que se encuentran patógenos y microorganismos de deterioro (Perín et al., 2019).

Estos resultados, no cumplen con los requisitos en el análisis de aerobios mesófilos estipulados en el Decreto 616 de 2006 puesto que, el máximo de UFC/ml que

permite esta normativa es de 4×10^4 a 8×10^4 UFC/ml (1/3 muestras analizadas). Por consiguiente, se requiere una mayor supervisión en las temperaturas de termización y pasteurización utilizadas con el fin de minimizar la carga microbiana presente (Decreto 616, 2006).

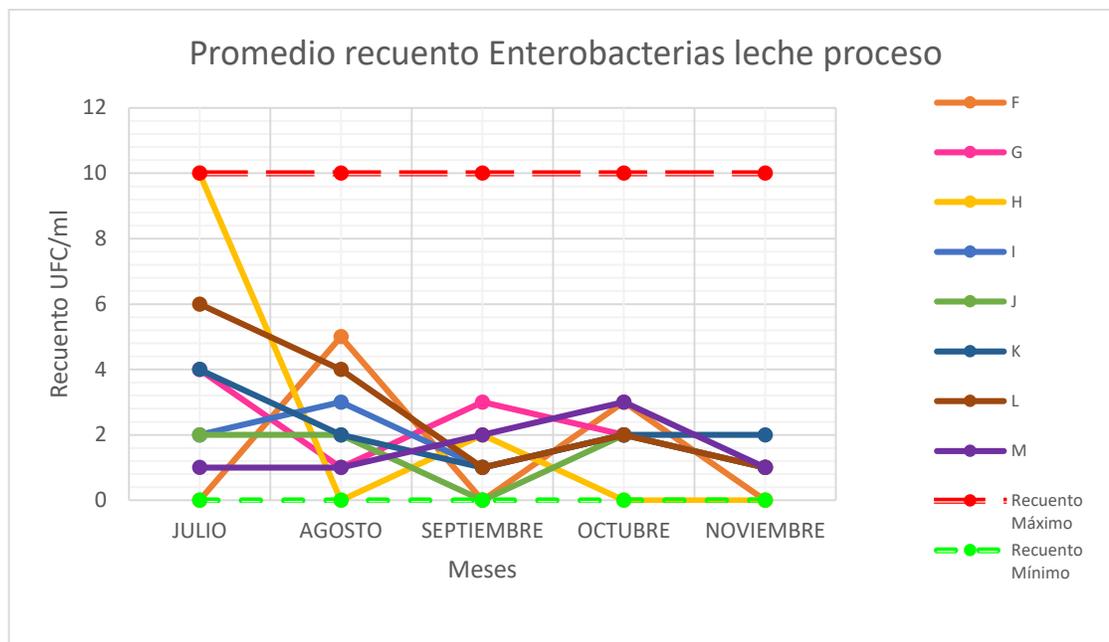
7.2 Recuento de Enterobacterias en los silos de leche procesada

Los resultados de los análisis realizados a la leche procesada en cada uno de los silos, se promediaron para establecer el comportamiento de este indicador de forma mensual. Los datos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Promedio de UFC/ml de cada uno de los silos de leche procesada de la planta en los meses de julio a noviembre.

UFC/ml					
SILO/MES	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE
F	0	5	0	3	0
G	4	1	3	2	1
H	10	0	2	0	0
I	2	3	1	2	1
J	2	2	0	2	1
K	4	2	1	2	2
L	6	4	1	2	1
M	1	1	2	3	1

Los datos presentados anteriormente, con el objetivo de observar con mayor facilidad el comportamiento de los datos en los meses reportados.



Gráfica 3. Promedio de recuento de Enterobacterias presente en los silos de leche procesada. Naranja: silo F; Gris: silo G, amarillo: silo H; azul: silo I; verde: silo J; rosado: Silo K; café: silo L; rojo: silo M.

En de los parámetros internos de la empresa, se realiza el análisis de enterobacterias con un límite de aceptable <10 UFC/ml, a diferencia de la normativa que puntualiza el análisis de coliformes totales y fecales (4×10^4 a 8×10^4 UFC/ml) como indicadores de contaminación (Decreto 616,2006), con el fin de ampliar los indicadores y evaluar las condiciones microbiológicas de procedimientos inadecuados o deficiencias de saneamiento en la producción (Cordier, 2006).

En los recuentos de Enterobacterias presentados en la gráfica anterior (grafica 3), se observa que al transcurrir de los meses estos van disminuyendo notablemente, muchos de estos presentando recuentos <10 ufc/ml, se puede apreciar que el silo H presentó una disminución notoria puesto que, su recuento inicial fue de 10ufc/ml y en los meses de agosto octubre y noviembre no presentó recuento (<10 ufc/ml). Por otra parte, el silo K, disminuyó en el mes de agosto y se mantuvo constante hasta la fecha. Los recuentos presentados no superan las 10 ufc/ml encontrándose dentro de los parámetros internos manejados por la empresa.

La leche de proceso o procesada es aquella leche que sufre un proceso de termización como método de conservación y se lleva a cabo calentando la leche de 62 a 65° durante 15 a 20 segundos. Con esta termización se pretende inhibir o

reducir la actividad enzimática de los microorganismos presentes sin que la leche presente muchos cambios químicos, para esto se requiere que la leche cruda sea de buena calidad (Fernández, 2015). A lo largo de los meses se puede evidenciar la disminución en el recuento de Enterobacterias presentes, sin embargo, ninguno de estos recuentos se encuentra por fuera de los parámetros internos establecidos por la empresa (<10 UFC/ml). A medida que se presentan recuentos de este tipo, se realizan reportes a los supervisores con el objetivo de que estén controlando de manera periódica tanto los procesos de limpieza y desinfección como las temperaturas utilizadas en cada proceso de termización.

7.3 Esporas HRS en leche cruda.

Se analizaron muestras de leche cruda de las rutas pertenecientes a la zona y de los acopios 1,2, 3 y 4, determinándose la presencia/ausencia de esporas altamente resistentes al calor “HRS” en estos centros de acopio.

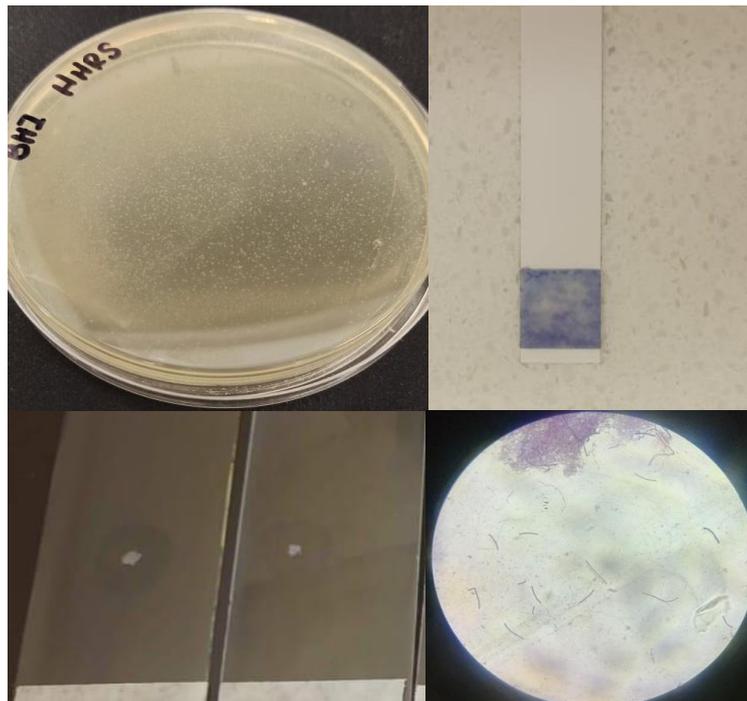


Figura 4. Tinción de Gram, prueba de oxidasa y catalasa realizada a las colonias típicas de **HRS** en medio BHI.

Fuente: Autora

Crecimiento en Medio BHI

El medio de cultivo BHI es apto para el crecimiento de una variedad de organismos, que incluyen microorganismos, hongos filamentosos y levaduras (Dickinson, 2013) Gracias a sus componentes en su mayoría de origen animal infusión de cerebro y corazón, peptona de tejido animal, peptona de caseína, cloruro sódico, glucosa, fosfato disódico de hidrógeno y agar-agar, permiten el crecimiento y desarrollo de esporas altamente resistentes a la ultrapasteurización HHRS (por sus siglas en inglés highly heat-resistant spores) aunque su visibilidad es un poco limitada en el medio, pues sus colonias crecen circulares, pequeñas y traslucidas.

Tinción de Gram, Prueba de oxidasa y catalasa.

Por medio de tinción de Gram se observan bacilos Gram positivos, su color violeta se debe a que la pared celular de este microorganismo está compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano que es muy afín con el cristal violeta (López et al., 2014).

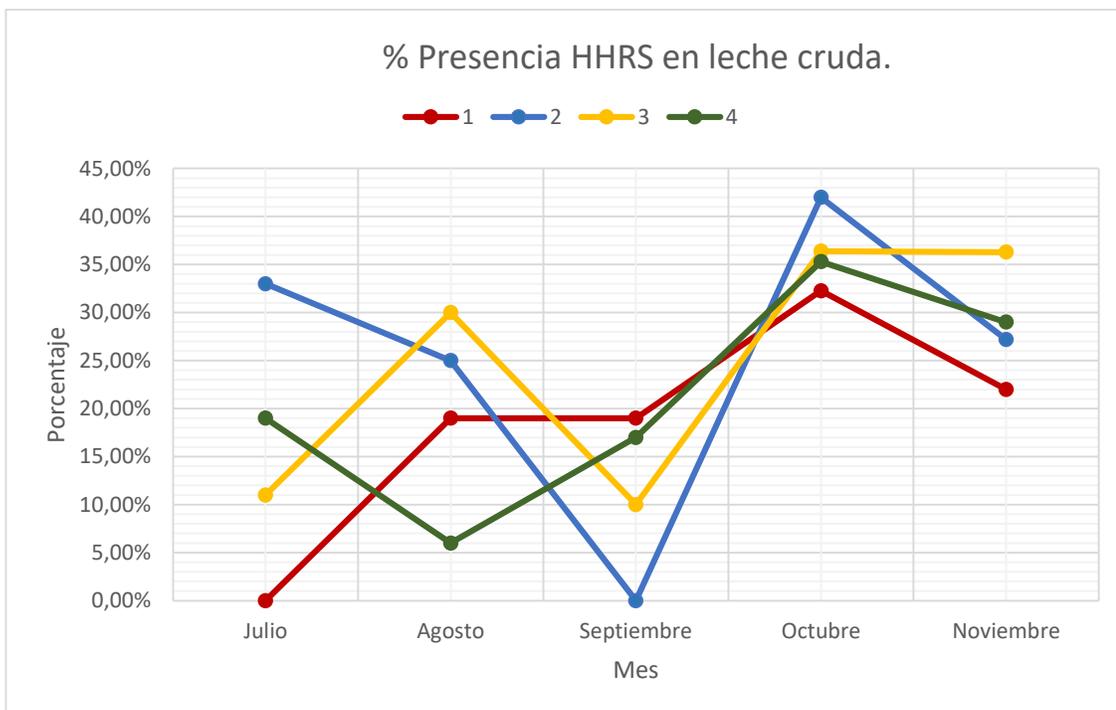
Para realizar la prueba de catalasa, se agrega una gota (20µl) de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos, se toman las colonias características presentes en medio BHI evidenciadas anteriormente, y se mezclan con el peróxido de hidrógeno. La formación de pequeñas burbujas indica la presencia de la enzima catalasa que descompone el peróxido en agua y oxígeno. Posteriormente, la prueba de oxidasa se evalúa por medio de una prueba comercial (tira de oxidasa), esta prueba determina la presencia de la citocromo C oxidasa, que oxida al N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina generando el azul-violeta característico en las tirillas de reacción (Fernández et al, 2010).

Posteriormente, en la tabla 4 se presentan el número de muestras analizadas por acopios y los porcentajes mensuales con presencia de HHRS.

Tabla 4. Presencia **HHRS** en leche cruda de los acopios de la zona en los meses de julio a noviembre.

	MUESTRAS ANALIZADAS	RESULTADOS CON PRESENCIA	%
	JULIO		
1	36	0	0
2	12	4	33
3	18	2	11
4	16	3	19
	AGOSTO		
1	37	7	18,92
2	12	3	25
3	10	3	30
4	18	1	5,56
	SEPTIEMBRE		
1	37	7	18,92
2	12	0	0
3	10	1	10
4	18	3	16,67
	OCTUBRE		
1	31	10	32,26
2	12	5	42
3	10	1	10
4	18	3	16,67
	NOVIEMBRE		
1	32	7	21,88
2	11	3	27,27
3	11	4	36,36
4	21	6	28,57

En la gráfica 4 se evidencia el análisis por medio de gráfico de líneas de cada uno de los porcentajes presentados anteriormente.



Gráfica 4. Promedio de presencia de HHRS en leche cruda de los acopios. Rojo: Acopio 1; Azul: Acopio 2; Amarillo: Acopio 3; Verde: Acopio 4.

Por medio de esta gráfica se puede apreciar que estos datos son bastante variables, no existe concordancia entre los mismos. En el acopio 1 no se obtuvo presencia de HHRS en el mes de julio, mientras que, en septiembre no se obtuvo presencia en el acopio 2. Sin embargo, este último es uno de los acopios que presenta mayor variación en cada uno de los meses, ya que presenta el porcentaje más alto de los 5 meses comparado con los demás acopios.

7.4 HHRS en leche de proceso.

Cómo se mencionó anteriormente, el objetivo de la leche procesada es disminuir la carga microbiana presente y la inactivación de enzimas prolongando su tiempo de almacenamiento para su posterior uso. Sin embargo, esta temperatura no destruye la formación de esporas.

La tabla 5 presenta el promedio global por mes de presencia de HHRS en las muestras analizadas en los silos después de la termización.

Tabla 5. Porcentaje de presencia de HHRS en muestras de leche termizada.

Mes	Muestras analizadas	Muestras con presencia	% Presencia
Julio	22,0	5,0	22,7%
Agosto	39,0	6,0	15,4%
Septiembre	69,0	17,0	24,6%
Octubre	52,0	19,0	36,5%
Noviembre	35,0	11	31,43%
Promedio	43,4	11,6	26,14%

De acuerdo con la tabla 5, los porcentajes no son similares entre sí, el mes de agosto fue el mes que presentó un menor porcentaje de presencia en las muestras analizadas y el mes de octubre presentó el porcentaje más alto. Los datos analizados arrojaron una desviación estándar de 0,08 y una varianza de 0,01.

El análisis de presencia de HHRS en leche cruda y de proceso se realiza para establecer el comportamiento de estas esporas en la materia prima inicial (sin tratamiento alguno) y en cada una de las etapas de procesamiento térmico a las que se somete la leche hasta llegar al producto final de la cadena ya que no existe una normativa que regule la presencia del mismo en estas condiciones.

7.5 Análisis de producto UHT

7.5.1 Análisis de 48 horas

Teniendo en cuenta los resultados arrojados por el LMS-II y las confirmaciones en medio BHI se estableció el porcentaje presuntivo de **HHRS** en producto UHT, estos datos se expresan en la tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje presencia esporas HHRS en leche UHT.

MES	EQUIPO	MUESTRAS ANALIZADAS	MUESTRA S CON PRESENCIA	% PRESENCIA	% ACUMULADO MES
Julio	1	1818	176	9,68%	13%
	2	240	38	15,83%	
agosto	1	1805	785	43,49%	32%
	2	214	98	45,79%	
Septiembre	1	1834	533	29,06%	30%
	2	210	64	30,48%	
Octubre	1	1869	769	41,14%	41%
	2	233	95	40,77%	
Noviembre	1	1100	435	39,55%	37%
	2	135	46	34,07%	
PROMEDIO					31%

Desviación estándar 0,11; Varianza 0,01.

La presencia de HHRS en la leche UHT en los 5 meses reportados se encuentra en el rango de 30 a 40%, en ninguno de los meses superó el 50%, por el contrario, en el mes de julio se presentó un bajo porcentaje (13%) comparado con los otros meses.

Por último, se realizó una comparación de los consolidados del mes de leche cruda, termizada y UHT. Este consolidado se presenta en la gráfica 5.

7.5.2 Esterilidad Comercial

Teniendo en cuenta la confirmación por medio de los recuentos en agar nutritivo se obtuvieron los siguientes resultados de esterilidad comercial.

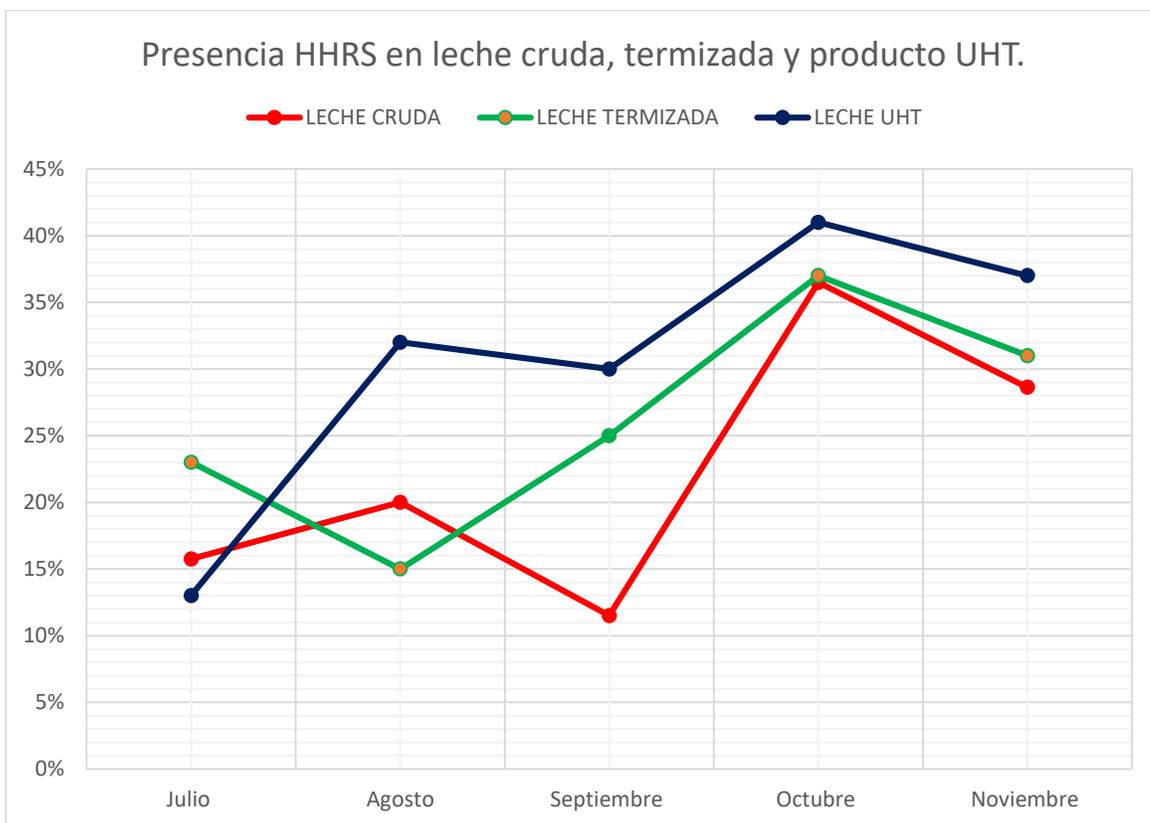
Tabla 7. Porcentajes mensuales de esterilidad comercial en aerobiosis y anaerobiosis (utilizando el aceite comercial).

Mes	Aerobiosis		Anaerobiosis	
	35°	55°	35°	55°
Julio	10%	0%	0%	0%
Agosto	29%	0%	0%	0%
Septiembre	18%	0%	0%	0%
Octubre	30%	0%	0%	0%
Noviembre	32%	0%	0%	0%
Promedio	23,8%	-	-	-

La prueba de esterilidad comercial permite identificar si los bacilos presentes crecen de forma oxigenica o anoxigenica, su principal desventaja es que su procedimiento requiere de mucho tiempo (18 a 23 días) (Bernier et al., 2012). En las muestras analizadas en este periodo, los porcentajes de presencia se presentaron a 35°C estos datos están directamente relacionados con la presencia de esporas HHRS en producto final UHT. La ausencia en anaerobiosis tanto a 35° y 55° evidencia que tanto el uso de aceite mineral logra impedir el crecimiento de bacilos esporoformadores aerobios facultativos, sin embargo, esto puede someterse a errores dependiendo de la cantidad, forma de incubación y efectividad del mismo. En los casos de que una esterilidad es no satisfactoria antes de los 10 días se presentarían quejas en el mercado, devoluciones de los cedis y se evidencia producción con pérdida de esterilidad, en el cual se procede a activar el programa recal, recoger el producto y se hace un diagrama causa raíz para determinar la causa de la perdida de esterilidad. Es por esto que se hace necesario recalcar los seguimientos a los procesos de limpieza y desinfección en la planta.

La NTC 4433, por medio de la evaluación de la esterilidad de los alimentos establece que los alimentos que han sido tratados térmicamente con el fin de eliminar la carga microbiana (incluso patógena) presente en el mismo, se mantenga estéril desde su producción, distribución y posterior consumo. Los resultados presentados en la tabla 7, evidencian que en aerobiosis a 35°C se presentan productos no satisfactorios, por lo que los lotes reportados en cada caso deben ser recogidos y descartados. Aunque esta normativa no es específica para evaluar la presencia de HHRS en producto UHT si permite su identificación por medio de microscopía y análisis moleculares posteriores (NTC 4433, 2015).

Comparación de la presencia de HHRS en leche cruda, termizada y producto UHT.



Gráfica 5. Consolidado de leche cruda, termizada y UHT con presencia presuntiva de **HHRS** en los meses de Julio a noviembre. Rojo: Leche cruda; Verde: Leche termizada; Azul: Leche UHT.

Por medio del consolidado mensual se pudo establecer una comparación del comportamiento de las esporas **HHRS**, dónde se evidencia el aumento en el porcentaje a medida que a la leche se le realiza un tratamiento mayor.

La presencia de esporas en leche constituye un problema en la industria láctea, ya que estas esporas sobreviven temperaturas de pasteurización causando deterioro a la leche. Estas esporas surgen como consecuencia de la supervivencia de microorganismos, los cuales, al ser sometidos a altas temperaturas, pH y/o actividad del agua, entran en un estado de estrés en el cual su mecanismo de defensa es la germinación de esporas logrando crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Basándonos en el consolidado obtenido, en los últimos meses la presencia de esporas termorresistentes no sobrepasa el 30%. Según Calvo, 2018,

expresa que el recuento de HHRS en leche cruda es bajo 10^1 - 10^2 ufc/ml, pero, pueden llegar a aumentar su concentración debido a su capacidad de crecer en la línea de proceso formando biofilms, logrando en muchas ocasiones llegar al producto final, causando un problema en las propiedades organolépticas del mismo. Por consiguiente, los porcentajes de esporas HHRS en leche termizada y producto final UHT aumentan debido a que se inhibe la flora acompañante, quedando las esporas resultantes del proceso de supervivencia las cuales a su vez se adhieren a las superficies de acero inoxidable formando biofilms (Calvo, 2018). El crecimiento en medio BHI, su tinción de gram y prueba de oxidasa y catalasa positivas son resultados presuntivos de posible presencia de *Bacillus sporothermodurans*, sin embargo, para su confirmación es necesario análisis moleculares basados en el ARN 16s (Bernier et al., 2012).

En la actualidad no existe una normativa dirigida a la presencia de *B. sporothermodurans* y HHRS, sin embargo, por medio de la NTC 4433 se exige la completa ausencia de carga microbiana en producto UHT para que este sea satisfactorio y apto para su distribución y consumo (NTC 4433, 2015). Es de vital importancia cumplir los procedimientos y limpieza y desinfección, así como un control estandarizado de temperaturas con el fin de minimizar la presencia de estas esporas y en su defecto la presencia del microorganismo en cuestión.

7.6 Análisis de aguas, patógenos, ambientes y manipuladores en la planta.

Conocer y supervisar la calidad microbiológica del agua, ambientes, superficies y manipuladores es fundamental en la industria alimentaria para asegurar tanto la calidad como la inocuidad de los alimentos que allí se elaboran (Wester, 2018). Los análisis complementarios realizados en el periodo laborado se encuentran al 100% en su cumplimiento, demostrando que se cumple con los protocolos de limpieza y desinfección en todas las áreas que componen la planta (equipos, superficies y demás materiales requeridos a lo largo de la cadena láctea) garantizando la ausencia de flora patógena en las superficies analizadas.

El análisis de agua cumple con los requisitos establecido en la Resolución 2115 de 2007, que establece que para el análisis de coliformes totales y *E. coli* 0 UFC/ml (Resolución 2115, 2007), teniendo en cuenta que para este caso se realizó análisis de enterobacterias, en el cual no se presentó crecimiento en este medio. Por otro

parte, los análisis adicionales realizados (Aerobios mesófilos y *Pseudomonas aeruginosa*), no presentaron crecimientos en los respectivos medios de cultivo, por lo que se determinó que el agua es apta tanto para consumo humano, como para los posteriores usos requeridos. Adicionalmente, personal colaborador no presentó recuento en análisis de manipuladores gracias a que, periódicamente se realizan actividades de lavado y desinfección de manos, desde que se ingresa a la planta y a cada una de las dependencias con el fin de contribuir a minimizar los factores de contaminación. Este cumplimiento es un buen indicador en garantía de calidad del producto final UHT.

Cabe resaltar que el análisis de patógenos realizado por medio del Sistema de Detección Molecular (MDS) 3M se encuentra en proceso de validación, de tal forma que se pueda garantizar la confiabilidad de los resultados que allí se reportan. Para esto inicialmente se realiza capacitación al personal a cargo del laboratorio para conocer los procedimientos, materiales y demás utensilios requeridos y posteriormente llevar a cabo la verificación, registrando los resultados obtenidos para corroborar si se cumple o no con la validación.

8. Conclusiones

Se llevó a cabo la evaluación de la calidad microbiológica de la empresa de lácteos Freskaleche S.A.S sede Aguachica, Cesar, por medio de la normativa vigente en Colombia como la normativa interna de la empresa.

Teniendo en cuenta los análisis microbiológicos realizados a la leche cruda, termizada y producto final UHT, y de acuerdo a las exigencias presentadas por la legislación colombiana se determinó que muchas de estas muestras no cumplen con los requisitos microbiológicos presentados en cada una de ellas, recalándose la importancia de tener buenas prácticas de manufactura, producción y supervisión en cada una de las etapas de la cadena láctea.

Posteriormente, se determinó la presencia de HHRS en muestras de leche cruda, termizada y producto final UHT, estableciéndose una comparación de estas esporas en cada una de las etapas y tratamientos térmicos realizados. Por medio de la prueba de esterilidad comercial se evaluó la presencia de HHRS en producto UHT clasificando los productos que presentaron crecimiento como productos con esterilidad comercial No satisfactoria y tomándose las respectivas acciones correctivas. Sin embargo, se requiere de análisis moleculares para determinar si las esporas que presentan características de *B. sporothermodurans* pertenecen realmente a este microorganismo.

Por último, se verificó la eficacia de los protocolos de limpieza y desinfección de ambientes, superficies y manipuladores en el área de producción de la empresa. Utilizándose en el análisis de ambientes la técnica innovadora de Sistema de Detección Molecular (MDS) 3M. Estos análisis permitieron confirmar el cumplimiento de cada uno de los protocolos utilizados para minimizar las posibles fuentes de contaminación y contribuir a calidad e inocuidad de los productos.

9. Recomendaciones o sugerencias

Realizar una comparación de los datos fisicoquímicos reportados en acopio al momento del recibo de leche y los resultados de los análisis microbiológicos para poder establecer las características y/o posibles variaciones que puedan presentarse en cada uno de los requisitos analizados verificando la calidad de la leche recolectada.

En el análisis de producto final UHT, y la presencia de *B. sporothermodurans* que ha tomado en los últimos años debido a su implicación en el deterioro del producto, se hace necesario la gestión de análisis externos moleculares para la confirmación por medio de secuenciación de ARN 16s la presencia de este microorganismo, debido a que, existe una variedad de esporas del género *Bacillus* que pueden presentarse en la leche como producto de la supervivencia de microorganismos a estados de estrés (Calvo 2018).

Indagar y ensayar métodos alternativos para llevar a cabo la condición anaerobiosis tanto en tubos como en cajas en el análisis de esterilidad comercial. Adicional a esto, realizar comparaciones con el uso de aceite comercial para verificar la efectividad de cada uno de los métodos.

Por último, se recomienda realizar análisis complementarios al personal colaborador de la empresa, como análisis de muestras nasales para determinar presencia/ausencia de *S. aureus* en las mismas y poder descartar una posible fuente de contaminación o tomar las debidas acciones correctivas.

10. Glosario

Avena F: Avena de marca F.

CR: Cambios de rollo de polietileno.

Crema A: Crema de leche marca A.

Des A: Leche deslactosada marca A.

Des F: Leche deslactosada marca F.

Ent A: Leche entera marca A.

Ent F: Leche entera marca F.

FP: final de la producción.

HHRS: highly heat-resistant spores (esporas altamente resistentes a los tratamientos de ultrapasteurización)

IP: inicio de la producción

LMS II: Sistema de luminiscencia microbiana. Sistema rápido de detección microbiana mediante bioluminiscencia para detectar la presencia de ATP microbiano en productos lácteos y jugos esterilizados.

Medio de cultivo: técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

MDS: Sistema de detección molecular 3M: este método se basa en una combinación única de tecnologías: amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)¹ y detección por bioluminiscencia.

Semi A: Leche semidescremada marca A.

Semi F: Leche semidescremada marca F.

Tinción gram: procedimiento que se lleva a cabo para identificar la estructura microscópica de un microorganismo, donde se identifica como gram positivas a aquellas que se visualizan de color morado y gram negativas a aquellas que se visualizan de color rojo o rosado.

11. Referencias

- Aguilera, A., Urbano, E., y Jaimes, C. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*. (pp. 83-93). [Archivo PDF]. file:///D:/ARCHIVOS/ANDREINA/Downloads/Dialnet-BacteriasPatogenasEnLecheCruda-5191851.pdf
- Babalola, O. (Ed.). (2021). *Food Security and Safety*. Springer.
- Bernier, I., Cardena, E., y Piñero, O. (2012). Bacillus sporothermodurans anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 21(27). <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/144/138>
- Calvo Gomez, M. (2018). *Identificación de microorganismos termodúricos provenientes de leche cruda, productores de enzimas de deterioro y evaluación de su actividad en biofilms*. [Tesis de grado Universidad de la República de Uruguay]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21393/1/uy24-19243.pdf>
- Castañeda, S. (2015). Caracterización de la microbiota de leche ultra alta temperatura (UAT, UHT) analizada en Bogotá. *Investigaciones en Seguridad Social y Salud*, 17 (2). <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964508/revista-inv-seg-social-17-2-leches-uht.pdf>
- Cole, S., y Goetze, A. (2021). Pasteurized Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (444-450). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00142-2>
- Cordier, J. (2006). Enterobacteriaceae. *Emerging Foodborne Pathogens*. (pp. 450-475). <https://www.sciencedirect.com/unipamplona.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/B9781855739635500174>

- Dairy Pathogen Manual. (2016). *Pathogens and microbiological limits*.
<https://www.dairysafe.vic.gov.au/publications-media/regulations-and-resources/guidelines/417-pathogen-manual/file>
- Deeth, H., y Lewis, M. (2017). *Heat Treatments of Milk – Thermisation and Pasteurisation*. High Temperature Processing of Milk and Milk Products.
<https://doi.org/10.1002/9781118460467.ch2>
- Decreto 616 [Ministerio de la Protección Social]. (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, comercializa, expendia, importe o exporte en el país. 28 de febrero de 2006.
- Dickinson, B. (2013). *BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar*.
<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
- FAO. (2021). *Producción y productos lácteos: Composición de la leche*
<https://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- FEDEGAN. (2020). *Producción de Leche en Colombia 2020*.
<https://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>
- Fernandez, A., García, C., Saénz, J., y Valdezate, S. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Procedimientos en Microbiología Clínica.
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Fernandez, E. (2015). *Influence of heat treatment of milk in the development of dairy products*. [Tesis de grado Universidad Nacional de Trujillo].
<https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4291/FERNANDEZ%20CASTILLO%20ESMERALDA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Freskaleche. (2021). *Sabor y Nutrición*. <https://www.freskaleche.com.co/>
- Hu, L., Ma, L., Zheng, S., He, X., Wang, H., Brown, E., Hammack, T., y Zhang, G. (2017). Evaluation of 3M Molecular Detection System and ANSR Pathogen

Detection System for rapid detection of *Salmonella* from egg products. *Poultry Science*. (pp. 1410-1418). <https://doi.org/10.3382/ps/pew399>

Instituto Nacional de Salud. (2011). *Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia*. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-biologicos-en-leche.pdf>

Lacetera, N. (2019). Impact of climate change on animal health and welfare. *Animal Frontiers*. (pp. 26-31). <https://academic.oup.com/af/article/9/1/26/5168813?login=true>

Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H., & Liu, Z. (2018). *Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions*. *Scientific Reports*, 8(2371). <https://www.nature.com/articles/s41598-018-20862-8>

López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., y Franco, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. *Investigación en Discapacidad*, 10-18. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2014/ir141b.pdf>

Luca, J. (2018). *El sistema de detección molecular 3M: un medio de control de detección de patógenos presentes en los alimentos*. *3M Science Applied to Life*. <https://multimedia.3m.com/mws/media/1666859O/mds-technical-bulletin-spanish.pdf>

Mungai, E., Barton, C., y Gould, L. (2015). *Increased Outbreaks Associated with Nonpasteurized Milk, United States, 2007–2012*. Centers for Disease Control and Prevention- CDC. https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-0447_article

Navarro, M. (2007). *Determinación de escherichia coli y coliformes totales en agua por el método de filtración por membrana en agar chromocult*. Instituto de Hidrología, Metrología y Estudios ambientales – IDEAM. <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E.+coli+en+Agua+Filtraci%C3%B3n+por+Membrana.pdf/5414795c-370e-48ef-9818->

com.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/femsre/article/37/5/664/541439?searchresult=1#90644439

Resolución 2115 [Ministerio de la Protección Social]. (2007). características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. 22 de junio de 2007.

Reyes, G. (2011). *La Industria Láctea en Colombia*. Universidad Estatal de Ohio. *Volumen (15)*. <https://dairy.osu.edu/newsletter/buckeye-dairy-news/volume-15-issue-6/dairy-industry-colombia>

Rodriguez, V., Calderón, A., y Acosta, A. (2015). *Calidad de leches crudas en empresas ganaderas doble propósito en el departamento de Córdoba (Colombia) en condiciones de máxima precipitación*. *Veterinay and Animal Science*, 8. <https://doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.5>

Skara, T., y Rosnes, J. (2016). Emerging Methods and Principles in Food Contact Surface Descontamination/Prevention. *Innovation and Future Trends in Food Manufacturing and Supply Chain Technologies*. (pp. 151-172). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978178242447500006X>

Valdiviezo, N., Villalobos, L., y Martínez, R. (2006). Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumana – Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26 (2). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562006000200006

Wester, P. (2018). Sanitation Preventive Controls and Sanitation Basics. *Hazard Analysis and Risk Based Preventative Controls*. (pp. 85-106). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810500-9.00005-9>

Zendejas, G., Flores, H., y Soto, M. (2014). *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación*. Universidad de la Ciénega. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

12. Anexos

12.1 Recuento de Aerobios mesófilos

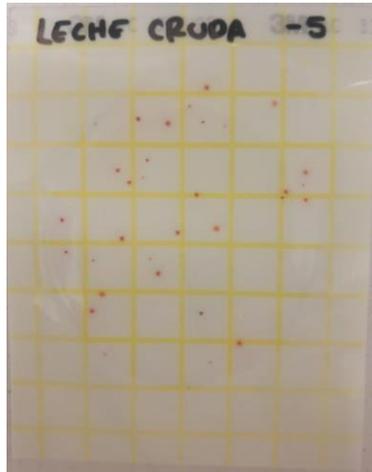


Figura 5. Ejemplo de crecimiento aerobios mesófilos de muestras de leche cruda en petrifilm AC. Dilución 10^{-5} .

12.2 Recuento Enterobacterias

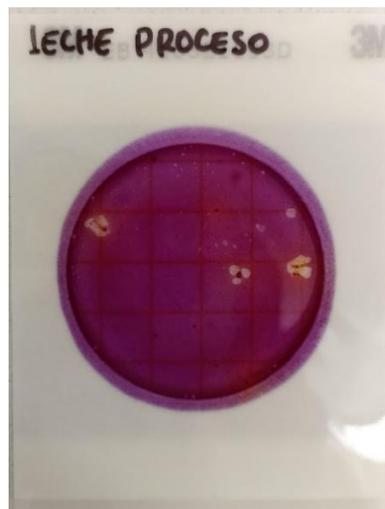


Figura 6. Ejemplo de crecimiento de Enterobacterias en muestras de leche procesada. Dilución 10^{-1} .

12.3 Lector de Placa petrifilm 3M

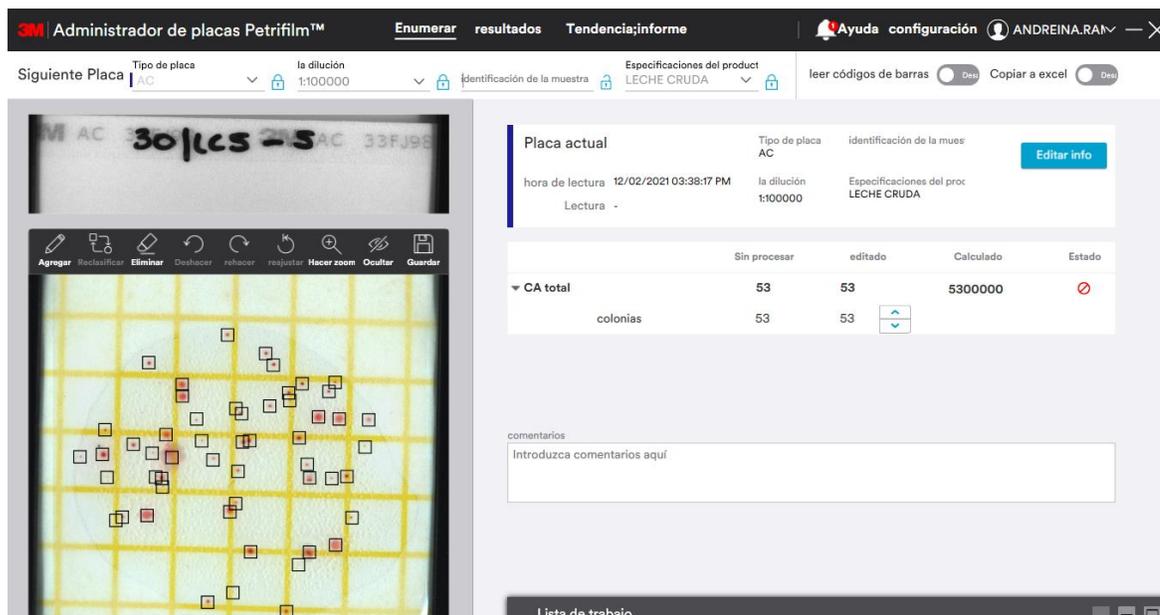


Figura 7. Ejemplo de lectura de recuentos por medio del sistema de lector de placa automatizado de 3M.

12.4 Cronograma de actividades durante la pasantía empresarial

HORA	DESCRIPCIÓN ACTIVIDADES	
	TURNO DE ACTIVIDADES ROTATIVAS ANALISTA/PASANTE	
7AM	DESINFECCIÓN DEL ÁREA	
8AM	Verificación de equipos y rutinas de garantía de calidad, alistamiento de medios de cultivos	
9AM	Análisis de ambientes en las plantas, análisis puntos de aire comprimidos , análisis de HHRs en acopios y rutas de leche caliente en planta, reunión gestión de desempeño, registrar los seguimientos producto terminado UHT, sembrarlos toma de pH y organoléptico	Registro y siembra de muestra: verificaciones de limpieza y desinfección, producto terminado leche en polvo, siembra de manipuladores, siembra seguimientos a procesos, verificación de limpieza y desinfección de uniformes pvz,
10AM		

	48 horas.	siembras de insumos y empaques reunión gestión de desempeño.
11AM	Toma de muestras y análisis de patógenos, análisis HHRS tanques análisis de muestras enviadas de tanques, frotis y manipuladores del acopio 2..	
12M	ALMUERZO	ALMUERZO
1PM	Lectura: reporte de resultados por fuera del área, descartar material	
2 PM		Registro y siembra de muestra:
3PM	Limpiezas de incubadoras, verificación de pipetas, análisis de aguas tratadas por técnica filtración de membrana en los diferentes puntos en planta y de acopio, análisis de alérgenos, análisis de cuarentenas producto terminado	verificaciones de limpieza y desinfección, producto terminado leche en polvo, siembra de manipuladores, siembra seguimientos a procesos, verificación de limpieza y desinfección de uniformes pvz, siembras de insumos y empaques, toma de muestra siembra de muestras de esporas en leche
4PM		