

**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE BACILOS
ESPOROFORMADORES EN PRODUCTOS LÁCTEOS ULTRA ALTA
TEMPERATURA (UHT/UAT) EN FUNZA, CUNDINAMARCA.**

TATIANA ALEJANDRA CÁRDENAS SOLANO

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

2021

**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE BACILOS
ESPOROFORMADORES EN PRODUCTOS LÁCTEOS ULTRA ALTA
TEMPERATURA (UHT/UAT) EN FUNZA, CUNDINAMARCA.**

TATIANA ALEJANDRA CÁRDENAS SOLANO

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGO**

TUTORA ACADÉMICA

RAQUEL AMANDA VILLAMIZAR GALLARDO

**LINA DE LA ROSA HENRIQUEZ
DIRECTORA DEL PROYECTO**

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

2021

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	7
1. Objetivos	9
2. Justificación	10
3. Marco referencial	11
3.1 Ministerio de la Protección Social	11
3.2 NTC Norma Técnica Colombiana	11
3.3 Marco conceptual	12
3.4 Antecedentes	13
4. Metodología	16
4.1. Cálculo y procesamiento de muestras	16
4.2. Siembra en medios	17
4.3. Recuento en placa y caracterización morfológica	17
4.4 . Esterilidad comercial y uso del aceite mineral	18
4.5 Análisis fisicoquímico	18
5. Cronograma	19
6. Resultados y discusión	20
6.1. Recuento en placa	20
6.2 Caracterización morfológica macro y microscópica y pruebas bioquímicas básicas	22
6.3 Curva de crecimiento de las muestras a través del tiempo	24
6.4 Esterilidad comercial y uso de aceite mineral	37
6.5 Resultados fisicoquímicos	40
7. Conclusiones	43
8. Recomendaciones	44
Bibliografía	45
9. Anexos	47
9.1 Actividades desarrolladas en el laboratorio de microbiología Funza, Cundinamarca	47
9.1.1 Análisis diarios	47
9.1.2 Análisis semanales	50

9.1.3 Análisis especiales	53
Anexos 2	57

Lista de tablas

pág.

Tabla 1 Promedio de producción de lotes por mes, en los últimos 6 meses	16
Tabla 2 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche entera referencia A	25
Tabla 3 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche entera referencia B	28
Tabla 4 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche deslactosada	29
Tabla 5 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia Crema de leche UHT	31
Tabla 6 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche entera UHT	33
Tabla 7 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en las referencias de avena sabor canela y leche sabor fresa.....	35
Tabla 8 Resultados obtenidos luego de las pruebas de esterilidad comercial a los lotes seleccionados. A uno de los 3 tubos inoculados en cada condición, se le añadió 2ml de aceite mineral estéril para mejorar la anaerobiosis	38

Lista de figuras

pág.

Figura 1 Crecimiento de colonias, tinción de Gram y resultados de pruebas bioquímicas. A. Colonias en agar TSA. B. Tinción de Gram, bacilos largos Gram positivos, visión 100X C. Prueba oxidasa positiva. D. Prueba catalasa positiva....	23
Figura 2 Crecimiento de colonias, tinción de Gram y resultados de pruebas bioquímicas. A. Colonias en agar BHI. B. Tinción de Gram, bacilos largos Gram positivos, visión 100X. C. Prueba oxidasa positiva. D. Prueba catalasa positiva...	24
Figura 3 Tinción de Gram de muestras sembradas en los tubos de caldo BHI con almidón para prueba de esterilidad comercial, vistas bajo el microscopio a 1000X. A muestras incubadas a 35°, bacilo Gram positivo. B. Muestras incubadas a 35°C en anaerobiosis sin aceite mineral. C. Muestras incubadas a 35°C en anaerobiosis con 2 ml de aceite mineral. D. Muestras incubadas a 55°C, donde no hay evidencia del bacilo.	39
Figura 4 Tubos con caldo BHI adicionado de almidón para prueba de esterilidad comercial. Tubo A Control positivo incubado a 35°C en aerobiosis. Tubo B. Control positivo con 2ml de aceite mineral incubado a 35°C en anaerobiosis. Tubo C. Control positivo incubado a 35°C en anaerobiosis. Tubo D. Control negativo incubado a 35°C	40
Figura 5 Prueba de termófilos, no se observa crecimiento microbiano	47
Figura 6 Petrifilm AQHC inoculado con 1ml de agua de arranque.....	48
Figura 7 Cajas de Petri con PCA, para control positivo y para control de esterilidad	49
Figura 8 Cajas de Petri con BHI para control positivo y control de esterilidad	49
Figura 9 Cajas de Petri con Chromocoult para control positivo, control negativo y control de esterilidad.....	50
Figura 10 Cajas de Petri con YGC para control positivo, control negativo y control de esterilidad.....	50
Figura 11 Frasco Colilert con el agua a analizar y el reactivo para evaluar la presencia de E. coli.....	53
Figura 12 Petrifilm AQHC con membrana de filtración por membrana	54

Lista de gráficas

pág.

Gráfica 1 Cinética de crecimiento de los 23 lotes analizados en el medio de cultivo TSA.....	21
Gráfica 2 Cinética de crecimiento de los 23 lotes analizados en el medio de cultivo BHI.....	22
Gráfica 3 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia EUM.....	26
Gráfica 4 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia EUM	27
Gráfica 5 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia EUARA	28
Gráfica 6 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia EUARA	28
Gráfica 7 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia DLU.....	30
Gráfica 8 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia DLU.	30
Gráfica 9 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia CLU.....	31
Gráfica 10 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia CLU.	32
Gráfica 11 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia EU.....	33
Gráfica 12 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia EU	34
Gráfica 13 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia AU y LSUF	35
Gráfica 14 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia AU y LSUF	36
Gráfica 15 pH calculado en las muestras pasados los días de incubación.....	41
Gráfica 16 % de ácido láctico calculado en las muestras pasados los días de incubación.....	41
Gráfica 17 Valor de aceptabilidad de las muestras sometidas a pruebas sensoriales luego de los análisis los días de incubación	42

Introducción

La leche es un producto natural producido por mamíferos, que sirve como alimento de sus hijos neonatos por un período de tiempo; su composición química le confiere un valor en la dieta del hombre, la leche de vaca es la más usada alrededor del mundo para solventar el consumo humano, por lo que se han desarrollado tecnologías para la explotación y producción de sus derivados. (Díaz, 2005)

En Colombia, según FEDEGAN, la actividad ganadera se estimaba en 25 millones de cabezas de ganado para el 2020, con una producción neta de leche de 7.393 millones de litros, de los cuales sólo 3.347 millones de litros son recaudados en centros de acopio y aproximadamente 900 millones de litros son sometidos a un tratamiento térmico UHT. Entre abril y agosto se obtienen los mayores volúmenes de producción, y entre noviembre y marzo se registra un descenso sensible, debido a las condiciones medioambientales. (FEDEGAN, 2020). La leche recibida en los centros de acopio, se someten a procesos térmicos como termización, pasteurización y ultra pasteurización.

Según el Plan de Nutrición y comunicación de Productos Lácteos 2011-2014 cofinanciado por MAGRAMA y la Unión Europea, se señala que la termización es un proceso de conservación, donde la leche es sometida a 57° - 68° C por 15 segundos para eliminar algunos microorganismos patógenos (FENIL, 2011); la pasteurización es un proceso donde se eleva la temperatura a 72°C, con un tiempo de sostenimiento de 15 segundos y reduce la mayoría de los microorganismos que no fueron eliminados durante la termización, por medio de intercambiadores de calor, la leche recorre el pasteurizador y el elemento calefactor, que puede ser agua o vapor de agua, circula por los espacios entre los intercambiadores generando así el proceso térmico (Díaz, 2005); y finalmente, la ultrapasteurización o uperización, también conocida por las siglas UHT (Ultra High Temperature) y UAT (Ultra Alta Temperatura), es un proceso donde se somete alimentos como la leche o el zumo a 135°C – 140°C durante 2 a 4 segundos, éste proceso también reduce en gran medida el número de microorganismos presentes sin cambiar sus propiedades nutricionales. Éste método no consigue una esterilización completa (ausencia total de microorganismos) pero sí consigue la esterilización comercial, donde el alimento se somete al calor suficiente para destruir formas de resistencia de ***Clostridium botulinum***, pero hay algunos microorganismos que forman estructuras vegetativas tan resistentes, que no se eliminan con el proceso UHT. (Agrario, 2010)

Las Esporas Altamente Resistentes o HRS por sus siglas en inglés (Highly Resistant Spores) son estructuras de microorganismos termo resistentes, un ejemplo reciente de éstos, es ***Bacillus sporothermodurans***, este bacilo Gram positivo se encuentra potencialmente en granjas lecheras, en tela filtrante, cultivos verdes y forrajes, su

naturaleza ubicua hace que sea básicamente imposible prevenir su presencia en alimentos e ingredientes crudos, las características fisicoquímicas esenciales para su identificación son oxidasa y catalasa positiva, además de que forma colonias puntiformes pequeñas en agar BHI enriquecido con Vitamina B12. Por otro lado, la pasteurización y ultrapasteurización eliminan las células vegetativas pero no las esporas, las esporas sobrevivientes experimentan poca o ninguna competencia germinando y proliferando rápidamente, además de que las esporas tienen características adhesivas facilitando su fijación en tuberías y equipos formando biopelículas. (Scheldeman, Herman, Foster, & Heyndrickx, 2005). Estas bacterias mesófilas, que tiene la capacidad de transformarse en esporas altamente resistentes al calor (HRS), se detectaron por primera vez en la leche tratada con UHT del sur de Europa en 1985 y en la leche tratada con UHT de Alemania en 1990. Hoy en día, el problema está más extendido y se ha observado en otros países europeos y americanos. (Abouelnaga, 2016)

Entre los últimos años, las muestras de leches UHT con prueba de esterilidad comercial y resultados no satisfactorios han aumentado, por la presencia de bacilos Gram positivos como microbiota contaminante aerobia y anaerobia facultativa, los resultados se obtienen a partir muestras UHT incubadas durante 10 días a diferentes temperaturas (NTC 4433); indicando que el producto no cumple con la prueba de esterilidad comercial y no podrá ser comercializada para consumo humano; y de acuerdo con el Decreto 616 de 2006 las leches no satisfactorias son decomisadas y descartadas. (Bernier, Cádena, & Piñeros, 2012)

1. Objetivos

General

Evaluar el comportamiento de bacilos esporoformadores en productos lácteos Ultra Alta Temperatura UHT/UAT en Funza, Cundinamarca.

Específicos

1. Comparar el crecimiento microbiano en los medios de cultivos TSA y BHI identificando el medio óptimo para la recuperación del microorganismo diana.
2. Establecer las características cinéticas y morfológicas del microorganismo en los medios de cultivo TSA y BHI.
3. Analizar los cambios fisicoquímicos que podrían generarse en las muestras lácteas debido a su presencia en ellas.
4. Valorar el uso de aceite mineral para una anaerobiosis total en ensayos de esterilidad comercial

2. Justificación

En la industria láctea hay empresas que dedican su trabajo a la producción, envasado y distribución de productos lácteos, se preocupan por apoyar a los campesinos colombianos y mantener y mejorar la calidad de sus productos. La cooperativa analizada cuenta con un amplio portafolio de productos disponibles, desde lácteos hasta cárnicos de alta calidad, sin embargo, actualmente la industria láctea atraviesa un problema de inocuidad, debido a que se han encontrado microorganismos que sobreviven a temperaturas de ultra pasteurización o termo resistentes que a través de una estructura celular conocida como espora prevalece en el producto, definiendo su presencia como esporas altamente resistentes o HRS por sus siglas en inglés (Highly Resistant Spores).

De los casi 1000 lotes producidos por mes en esta cooperativa, entre 150 y 175 lotes evidencian presencia de HRS en sus productos, desde leche entera, hasta la deslactosada, saborizadas, crema de leche y demás productos. Es por esto que analizar estos productos lácteos para detectar presencia de microorganismos termo resistentes es una prioridad, teniendo en cuenta que según el Decreto Nacional 616 que determina parámetros fisicoquímicos y microbiológicos mínimos en productos lácteos, se indica que un lote es satisfactorio siempre y cuando esté libre de contaminantes físicos, químicos y biológicos. Este estudio ayudaría a la empresa a identificar un medio de cultivo ideal para la recuperación y recuento de estos microorganismos productores de esporas, además de aceptar o rechazar la hipótesis de que añadir 2ml de aceite mineral estéril a los tubos produce una anaerobiosis total, buscando así mejores opciones que aseguren esta condición de incubación.

3. Marco referencial

3.1 Ministerio de la Protección Social

Decreto 616; 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 expedido 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.

3.2 NTC Norma Técnica Colombiana

NTC 4433 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. Cuando un envase presenta hinchamiento o abombamiento, significa que contiene microorganismos que usan el sustrato disponible del alimento para producir metabolitos secundarios como gases. Estos métodos son manejados por laboratorios externos que analizan muestras procedentes de empresas de

alimentos o aquellas que tienen su propio laboratorio de microbiología. De los resultados depende la liberación o retención de lotes o muestras en cuestión.

NTC 6257 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 espora termorresistente en leche UHT. (ICONTEC, 2018)

3.3 Marco conceptual

AU: Abreviatura de Avena UHT

BHI: Brain, Heart Infusion o Infusión Cerebro Corazón, es un medio de cultivo utilizado para evaluar el crecimiento microbiano

CLU: Abreviatura de Crema de Leche UHT

DLU: Abreviatura de leche Deslactosada UHT

Espora: Estructura formada a partir de un microorganismo como método de resistencia a ambientes hostiles, contienen material genético que puede llegar a transcribirse, traducirse y replicarse cuando las condiciones ambientales mejoren.

Esterilidad: Es una condición microbiológica que define a un alimento como libre de contaminantes que puedan llegar a afectar al producto y consumidor.

EU: Abreviatura de leche Entera UHT

EUM: Abreviatura de leche Entera UHT Referencia A

EUARA: Abreviatura de leche Entera UHT referencia B

HTST: High temperature, Short Time o Alta Temperatura, Corto Tiempo, es un método de pasteurización que consiste en elevar la temperatura y reducir el tiempo de exposición del producto

LTLT: Low Temperature, Long Time o Baja Temperatura, Tiempo Prolongado, es un método de pasteurización que consiste en reducir la temperatura y prolongar el tiempo de exposición del producto

Materia prima: Es un elemento que se transforma y se incorpora en un producto final, es decir, es el punto de partida para la elaboración de un producto.

Pasteurización: Proceso térmico usado para reducir la carga microbiana en algunas materias primas, va desde 63°C por 30 minutos (LTLT), 72°C por 15 segundos (HTHT) y 135°C por 1-2 segundos (UHT)

TSA: Triptic Soy Agar o Agar Tripticasa de Soya, es un medio de cultivo sólido utilizado para evaluar el crecimiento microbiano

UHT: Ultra High Temperature o Ultra Alta Temperatura es un método de pasteurización que usa temperaturas por encima de los 100°C en un lapso de tiempo muy corto para destruir toda forma celular existente.

3.4 Antecedentes

En Bélgica en el año 2006, Scheldeman y colaboradores estudiaron a *Bacillus sporothermodurans* y otros formadores de esporas altamente resistentes al calor en la leche; ellos determinaron que el aislamiento de *B. sporothermodurans* en leche cruda o termizada es mejor cuando se esteriliza en autoclave por 5 minutos o se calienta hasta 100°C por 30 – 40 minutos debido a que reduce la microbiota competitiva. Teniendo en cuenta que la identificación fenotípica se obstaculiza por las malas características de crecimiento y las reacciones negativas en muchas pruebas estándar, la secuenciación de regiones V1 y V2 de los genes de ARNr 16S sirve para identificar al microorganismo. La amplificación y comparación del ADN obtenido de las cepas con el ADN de una cepa de leche cruda estrechamente relacionada resultó ser específico para un subconjunto de *B. sporothermodurans*. Este subconjunto abarcaba todos los aislamientos de UHT y solo unos pocos aislamientos de granjas, denominando HRS - PCR. Se han utilizado varios métodos de tipificación para *B. sporothermodurans*, incluido el ADN polimórfico amplificado al azar, la PCR palindrómica de elementos repetitivos (REP - PCR) con separación en agarosa o en geles de poliacrilamida y ribotipificación, esto con el fin para investigar la ecología de *B. sporothermodurans* y de encontrar las rutas más probables de contaminación y propagación de la leche y los productos lácteos de consumo. Ellos afirman que la mayoría de los aislados de granja lácteos se han obtenido a partir de concentrado de alimentación a temperaturas de incubación de entre 20 y 55° C, pero la mayoría a 37° C, aunque la contaminación también podría resultar del reprocesamiento de lotes contaminados de leche UHT en la fábrica de productos lácteos o del

procesamiento de leche en polvo contaminada. Por otro lado, describen que además de ***B. sporothermodurans***, hay otras especies formadoras de esporas que contaminan esporádicamente la leche UHT, como lo son: ***Geobacillus*** (anteriormente ***Bacillus***) ***stearothermophilus***: ***Brevibacillus borstelensis***: ***B. sphaericus***: ***B. licheniformis***: ***Br. brevis*** y ***Paenibacillus lactis***. Para la determinación de la resistencia a UHT se realizaron experimentos a escala piloto con esporas de ***B. sporothermodurans*** enriquecidas en leche cruda o directamente en leche UHT contaminada y observaron que a las temperaturas más bajas se observa la activación de las esporas, lo que implica que un choque térmico de 10 minutos a 80° C o 30 minutos a 100° C no es suficiente para obtener la germinación completa y el conteo de la población inicial de esporas. Finalmente, concluyen que las esporas altamente resistentes al calor han aparecido como un problema en la industria láctea hace poco tiempo y se introducen por medio de cambios en el alimento o ingredientes de alimentos como el concentrado en el pienso que contienen ingredientes como mandioca, harina de coco, pulpa de cítricos, que probablemente alberguen especies formadoras de esporas nuevas y desconocidas (Scheldeman, Herman, Foster, & Heyndrickx, 2005).

En el 2012, el laboratorio IVONNE BERNIER LTD IBLAB, ubicado en la ciudad de Bogotá Colombia, realizaron un estudio liderado por Ivonne Bernier, Eliana Cárdena y Oscar Piñeros en el cual analizan ***Bacillus sporothermodurans*** anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia, en este estudio incluyen análisis de esterilidad comercial descrito en la NTC 4433 y el total de muestras analizadas fue de 510 de 5 marcas comerciales a nivel nacional, donde tomaron 2 lotes iguales y los incubaron a 35 a 55°C por 10 días para continuar para el proceso de esterilidad comercial. Ellos realizaron una siembra en agar BHI adicionado de agar al 15% y suplementado con vitamina B12 (1mg/L) y a partir de los tubos que presentaban turbidez (indicativo de crecimiento microbiano) realizaban pruebas bioquímicas convencionales como fermentación de azúcares, hidrólisis de almidón y producción de ureasa; posteriormente, a los cultivos puros les extrajeron, purificaron y secuenciaron fragmentos de ADN. De las 510 muestras analizadas, 144 muestras de leche UHT dieron resultado de esterilidad comercial No satisfactoria, es decir, evidencia crecimiento microbiano; 75 muestras (52%) presentaron crecimiento positivo de ***B. sporothermodurans*** en BHI, confirmado por pruebas bioquímicas y PCR; 33 muestras desarrollan microorganismos en anaerobiosis y 9 muestras en aerobiosis estricta. Las cepas aeróbicas y anaeróbicas mostraron que no fermentan azúcares, no hidrolizan la úrea, gelatina ni almidón y eran catalasa y oxidasa positiva. Las cepas estudiadas de ***B. sporothermodurans*** y de otras cepas cercanas genéticamente se agruparon en el mismo clado, y mostraron una similitud mayor al 94% en su gen 16S rRNA. Se concluyó que la detección temprana de ***B. sporothermodurans*** incubando previamente por 40 horas es una alternativa pero no es concluyente, se necesita

realizar más ensayos de laboratorio para que las pruebas sean aprobadas como oficiales para detectar ese microorganismo. (Bernier, Cádena, & Piñeros, 2012)

En el 2018, Sandra Lucía Castañeda realizó otro estudio sobre la Caracterización de leche ultra alta temperatura (UAT/UHT) analizada en Bogotá. Aquí, las muestras de leches UAT ingresaron al Laboratorio de Salud Pública para análisis microbiológico como parte de la vigilancia realizada a los expendios y distribuidores de leches a cargo del Hospital de Fontibón, durante 2010 y 2011. De las 265 muestras de leches que no cumplieron, se conservaron alícuotas de 204 muestras y a partir de estas se realizó la recuperación de las cepas y posterior identificación. El análisis se realizó tomando una alícuota y llevándola a Agar BHI para incubar las cajas a 35°C por 48 horas, también tomaron una segunda alícuota a tubos con caldo BHI e incubándolos tanto a 35° como 55° C por 72 horas para continuar con el proceso de esterilidad comercial. Identificaron el tamaño de las colonias, la tinción de Gram y pruebas como catalasa y oxidasa, añadiendo pruebas bioquímicas especializadas con el test BCL de Biomerieux. De las 204 muestras de leches UAT conservadas, se recuperaron tan solo 36 cepas. Las colonias eran pequeñas puntiformes de 0,1 mm de diámetro, cremosas, de incoloras a color blanco. Morfológicamente eran bacilos Grampositivos, agrupados en filamentos, con reacción de catalasa positiva. Los microorganismos identificados por medio de la metodología test BCL de Biomerieux en el equipo Vitek ®2 Systems pertenecieron al género **Bacillus**. La especie más identificada fue **B. smitii** y ninguna de las cepas se identificó como **Bacillus sporothermodurans**. Concluyendo finalmente que la alta incidencia de resultados de “no satisfactorios” en productos lácteos UAT es causada principalmente por esporas de **Bacillus smitii** que sobreviven durante el tratamiento de ultrapasteurización por una formación de endoespora. (Castañeda, 2015)

4. Metodología

4.1. Cálculo y procesamiento de muestras

Se va a calcular un promedio con las producciones de los últimos 6 meses, el tiempo escogido corresponde al tiempo de duración de las prácticas; analizando el último trimestre del año 2020 (Octubre-Diciembre) y el primer trimestre del año 2021 (Enero-Marzo) de la siguiente manera:

Tabla 1 Promedio de producción de lotes por mes, en los últimos 6 meses

MES		PRODUCCION DE LOTES
OCTUBRE	2020	979
NOVIEMBRE		893
DICIEMBRE		1116
ENERO	2021	826
FEBRERO		966
MARZO		1062
PROMEDIO		974 por mes

*Los datos fueron obtenidos del estadístico **Liberaciones 2020-2021**

Para calcular el total de lotes a examinar, se usará un método estadístico que asegura un 95% de confiabilidad en los resultados obtenidos, con un desfase de precisión del 5% mediante la siguiente ecuación (Aguilar, 2005):

Ecuación 1: Determinación del número de muestras

$$n = \frac{N * Z^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z^2 * p * q}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra

N= lotes producidos por mes

Z = constante ligada a la confiabilidad (1.96)

p = probabilidad de que el microorganismo crezca en condiciones ideales 95%

q= probabilidad de que el microorganismo no crezca 5%

d = desfase de precisión

$$n = \frac{974 * (1.96)^2 * 0.95 * 0.05}{(0.05)^2 * (974 - 1) + (974)^2 * 0.95 * 0.05}$$

$$n = 67.9668 = 68$$

La cantidad de lotes seleccionados diariamente serán aquellos que arrojen presencia de ATP microbiano a través del Celsis Innovate® y se sembrarán tanto en BHI como en TSA para definir, por medio de análisis de componentes, el medio que recupera mejor al microorganismo diana.

De los lotes que se producen al día;

- Tomar una muestra de cada uno y e incubar a 35°C por 48 horas,
- Analizar por Celsis Innovate® (actividad realizada por la analista de microbiología) para observar presencia de ATP microbiano. Este equipo mide por bioluminiscencia la concentración de ATP, inyectando soluciones para romper la pared celular de los microorganismos presentes en la muestras y liberar el ATP, una vez liberado, el equipo agrega luciferina y luciferasa, enzima que reacciona con el ATP transformando la luciferina en oxiluciferina, proteína que tiene características bioluminiscentes.
- De los lotes positivos, pedir a bodega varias muestras para incubar a 35°C y 55°C.
- El segundo análisis microbiano se realizará pasados los 6 días de incubación, el tercer análisis a los 10 días, junto con análisis de esterilidad comercial, el cuarto análisis a los 15 días y a partir de allí, el análisis será mensual (30, 60 y 90 días) hasta completar el tiempo de vida útil del producto para evaluar el crecimiento del microorganismo diana y las características sensoriales y fisicoquímicas de la muestra (olor, color, sabor, pH, acidez y alcohol).

4.2. Siembra en medios

- Pasados los días de incubación establecidos, tomar las muestras correspondientes y sembrar una alícuota de 100 uL en una placa de Petri con agar BHI y otros 100 uL en agar TSA.

4.3. Recuento en placa y caracterización morfológica

Del crecimiento microbiano obtenido, realizar:

- Recuento de las colonias observadas
- Tinción de Gram

- Caracterización de la morfología macro y microscópica
- Pruebas catalasa y oxidasa (Castañeda, 2015).

Repetir el procedimiento para los días 2, 6, 10, 15, 30, 60 y 90.

4.4. Esterilidad comercial y uso del aceite mineral

Para la esterilidad comercial, de los lotes incubados a 35° y 55° C por 10 días;

- Sembrar 1 mL en 12 tubos que contienen 9 mL de caldo BHI con 0,1% de almidón (NTC 4433, 2006)
- Incubar a 35°C por 72 horas; repetir el mismo procedimiento para 55°C.
- De los tubos inoculados, tomar 6 tubos de cada temperatura indicada e incubar en anaerobiosis por medio de una campana de anaerobiosis
- A 2 de esos 6 tubos de anaerobiosis, agregar 2ml de aceite mineral para anular el oxígeno libre en el tubo (Benavides, 2007).

4.5 Análisis fisicoquímico

Luego de sembradas las muestras de estudio;

- Llevarlas al laboratorio fisicoquímico en la planta, para medir el pH, la acidez en % de ácido láctico y pruebas sensoriales, evaluando cambios en las mismas durante la vida útil del producto.

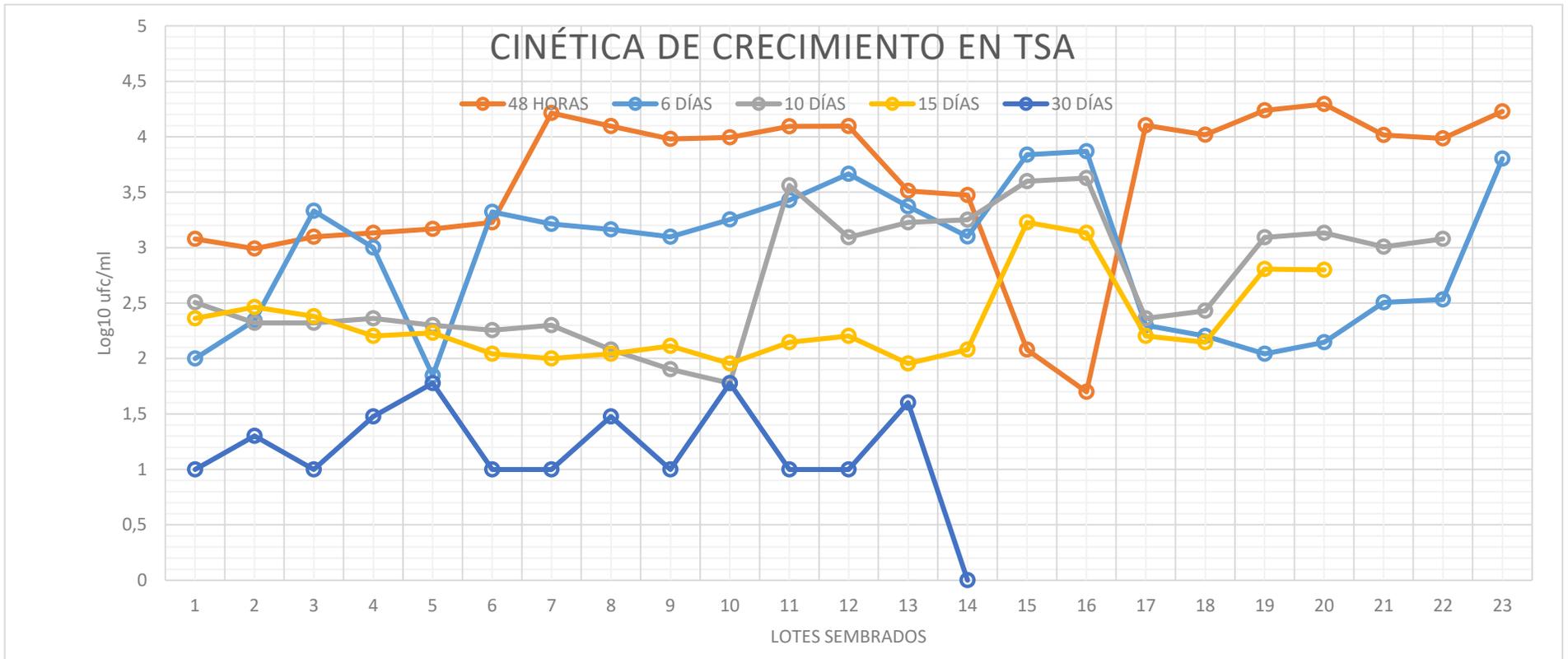
6. Resultados y discusión

6.1. Recuento en placa

Se van a presentar los resultados a partir de los análisis realizados los días estipulados. Debido a que las muestras debían ser pedidas a bodega, éstas demoraban 1 o 2 días posteriores al primer análisis. Así que los días de incubación inician a partir de la fecha de recibo de las muestras.

Los resultados a continuación son hipotéticos.

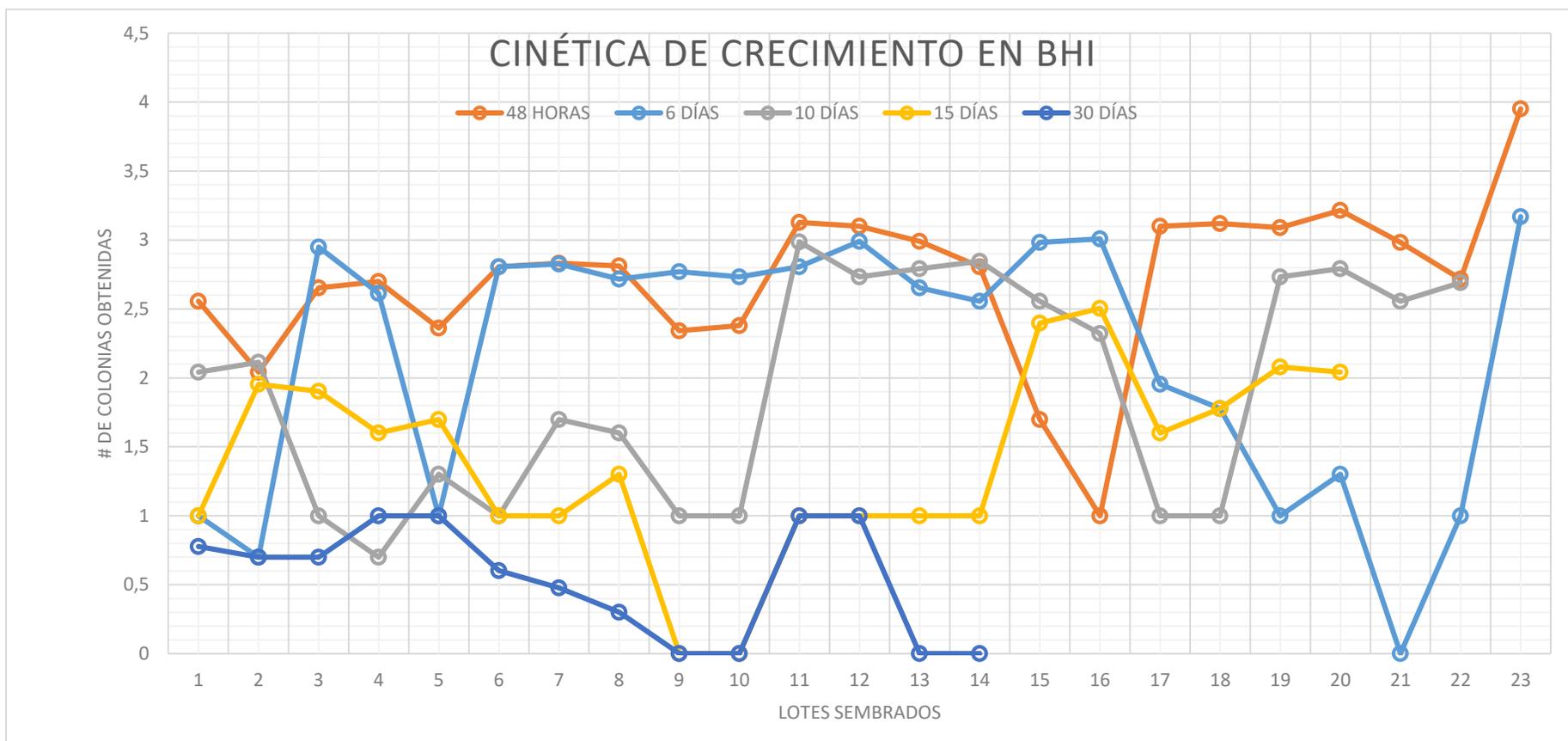
A continuación se presenta la **Gráfica 1** que muestra la cinética de crecimiento del bacilos esporoformadores en el medio de cultivo TSA



Gráfica 1 Cinética de crecimiento de los 23 lotes analizados en el medio de cultivo TSA

La anterior gráfica evidencia que en los primeros lotes el recuento es bajo, pero a partir del lote 7 hasta el lote 12 y el lote 17 hasta el lote 23, el recuento aumenta pasadas 48 horas de incubación. En el lote 16 el menor recuento poblacional se obtuvo luego de 2 días de incubación, pero pasados 6 días, este recuento está en el punto máximo. En muchos de los lotes, el recuento no es común, debido a que algunos evidencian un crecimiento pasados 6 o hasta incluso 10 días de incubación. Por otro lado, luego de un mes de análisis, la población se reduce significativamente.

En la **Gráfica 2** se muestra el crecimiento del mismo microorganismo pero en el medio de cultivo BHI.



Gráfica 2 Cinética de crecimiento de los 23 lotes analizados en el medio de cultivo BHI

En los recuentos graficados anteriormente se sigue evidenciando que el análisis pasado los 30 días de incubación logra ser muy bajo o casi nulo, excepto en el lote 4, que muestra un recuento de la población muy bajo pasados los 10 días. En el recuento del lote 21, pasados 6 días de incubación, es bajo, más que el recuento obtenido luego de 10 días incubado. Evidentemente, el recuento en este medio de cultivo es menor en comparación con el medio TSA.

Los recuentos pueden ser visualizados en la **Tabla** presente en los **Anexos**.

6.2 Caracterización morfológica macro y microscópica y pruebas bioquímicas básicas

Crecimiento en agar TSA

En la **Figura 1** se puede observar el crecimiento de pequeñas colonias aisladas en el medio de cultivo TSA. Estas colonias son pequeñas, puntiformes, translúcidas o blancas de un tamaño menor a 0.1mm. Los microorganismos morfológicamente corresponden a bacilos Grampositivos agrupados en filamento con reacción de catalasa y oxidasa positivas.

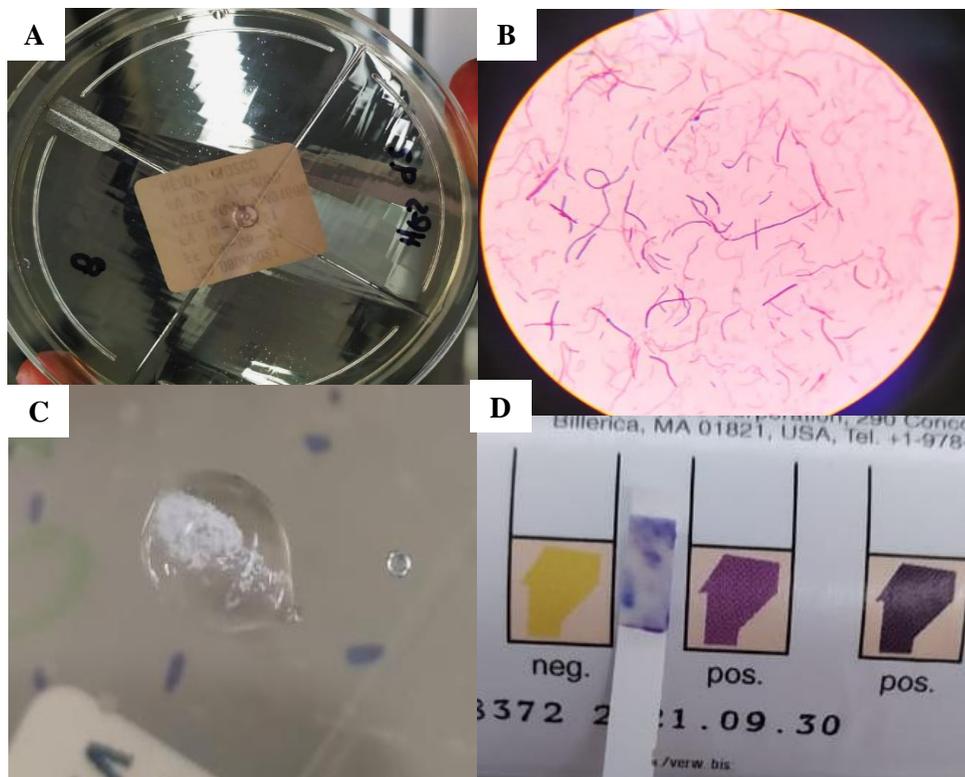


Figura 1 Crecimiento de colonias, tinción de Gram y resultados de pruebas bioquímicas. A. Colonias en agar TSA. B. Tinción de Gram, bacilos largos Gram positivos, visión 100X C. Prueba oxidasa positiva. D. Prueba catalasa positiva.

Teniendo en cuenta que el medio de cultivo TSA está compuesto por peptona de caseína (15g/L), peptona de soja (5g/L), cloruro sódico (5g/L) y agar (15g/L) y se utiliza para numerosas aplicaciones, como cultivo de referencia, recuento en placa y aislamiento de microorganismos presentes en una variedad de materiales, incluidos agua, agua residual y alimentos (Becton, 2013), presenta colonias muy pequeñas y difíciles de distinguir. Sus componentes básicos facilitan un crecimiento poblacional rápido, reduciendo el tamaño celular, por lo que se observan colonias más pequeñas.

Crecimiento en agar BHI

La **Figura 2** evidencian las colonias observadas en agar BHI son colonias un poco más grandes a las obtenidas en el agar TSA, puntiformes y traslucidas o levemente blancas. Al realizar la tinción de Gram, se observan bacilos largos Gram positivos, con reacción positiva a catalasa y oxidasa.

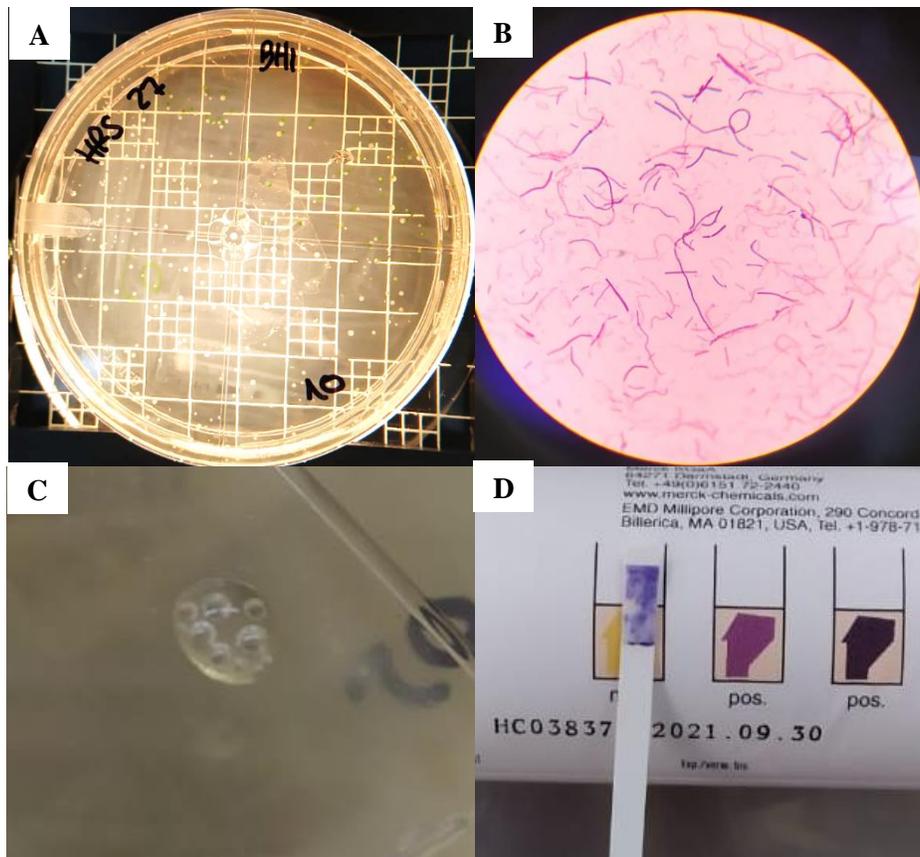


Figura 2 Crecimiento de colonias, tinción de Gram y resultados de pruebas bioquímicas. A. Colonias en agar BHI. B. Tinción de Gram, bacilos largos Gram positivos, visión 100X. C. Prueba oxidasa positiva. D. Prueba catalasa positiva

Por otro lado, el BHI está compuesto por infusión de cerebro y corazón (8g/L), peptona de tejido animal (5g/L), peptona de caseína (16g/L), cloruro sódico (5g/L), glucosa (2g/L), fosfato disódico de hidrógeno (2,5g/L) y agar (13,5g/L) y es de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas, ambientes y alimentos (Dickinson, 2013). Estos componentes de origen animal, permite la formación de colonias más grandes, que tardan mucho más en descomponer estos nutrientes, obteniendo finalmente un menor recuento.

Tinción de Gram

En la tinción de Gram se reflejan bacilos Gram positivos por la tinción de color violeta, debido a que la pared celular de este microorganismo está compuesto por una capa gruesa de peptidoglicano que es muy afín con el cristal violeta (López, y otros, 2014), produciendo el color observado en el microscopio.

Pruebas catalasa y oxidasa

Para la prueba catalasa, se tomaron unas colonias de los medios de cultivo y se les agregó algunas gotas de peróxido de hidrógeno generando unas burbujas, dando a entender que el microorganismo producía la enzima catalasa que descompone el peróxido en agua y oxígeno, esta enzima se encuentra en la mayoría de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos.

Usando una tira de prueba oxidasa, se tomaron varias colonias y se evaluó la presencia de la enzima oxidasa. La prueba oxidasa consiste en determinar la presencia de Citocromo C oxidasa, que es una enzima que oxida al N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina generando el azul-violeta característico en las tirillas de reacción, esta enzima está presente en microorganismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y unos pocos microaerófilos. (Canaria, NR)

6.3 Curva de crecimiento de las muestras a través del tiempo

A continuación se presenta la curva de crecimiento de los bacilos esporoformadores en diferentes lotes de la misma referencia.

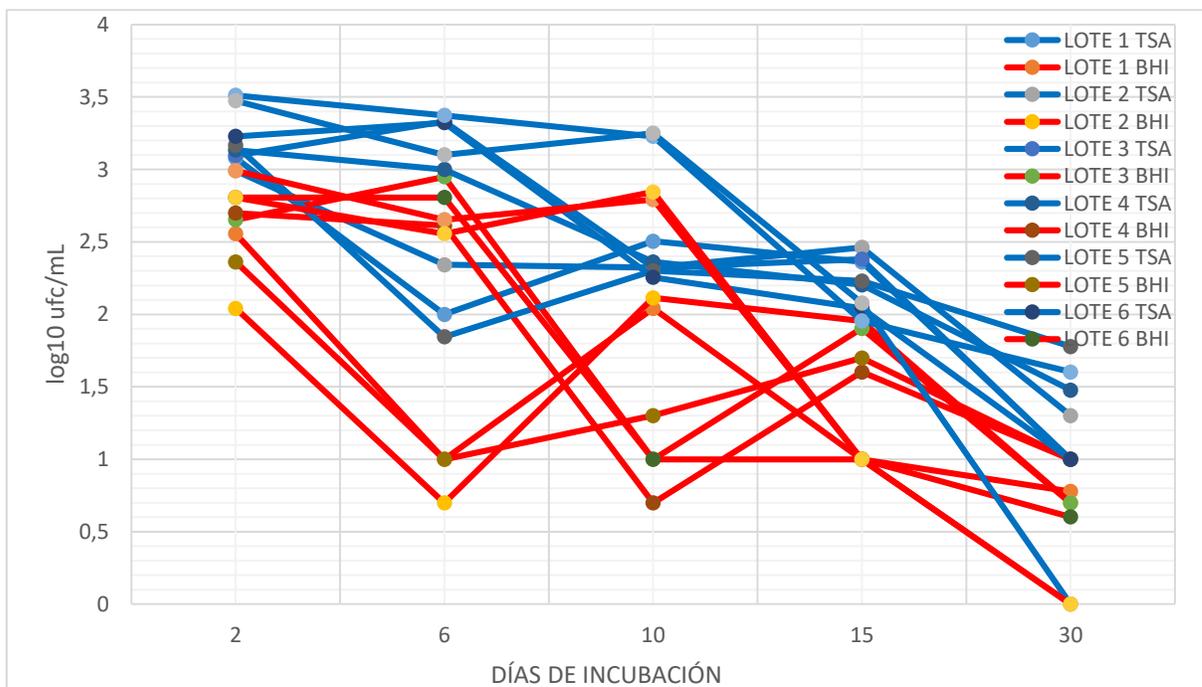
Referencia A

En la **Tabla 2** se representa el comportamiento del microorganismo en los lotes que corresponden a leche entera referencia A

Tabla 2 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche entera referencia A

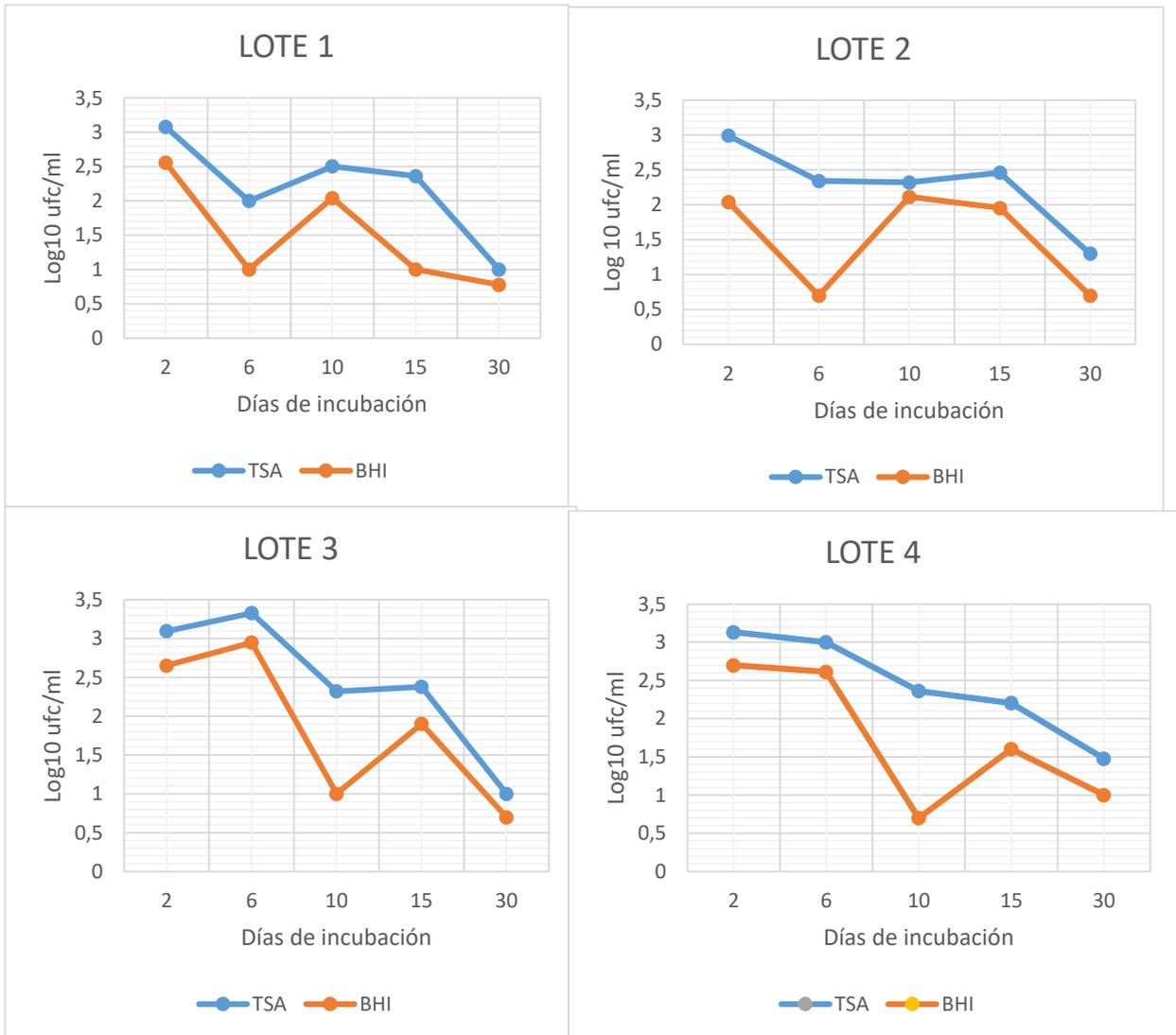
LOTES	2 DÍAS		6 DÍAS		10 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS	
	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml								
LOTE 1	1200	360	100	10	320	110	230	10	10	<10
LOTE 2	980	110	220	<10	210	130	290	90	20	<10
LOTE 3	1250	450	2140	890	210	10	240	80	10	<10
LOTE 4	1360	500	1000	410	230	<10	160	40	30	10
LOTE 5	1470	230	70	10	200	20	170	50	60	10
LOTE 6	1690	640	2100	640	180	10	110	10	10	<10
LOTE 13	3250	220	1250	590	80	10	130	<10	10	<10
LOTE 14	2980	240	1790	540	60	10	90	<10	60	<10

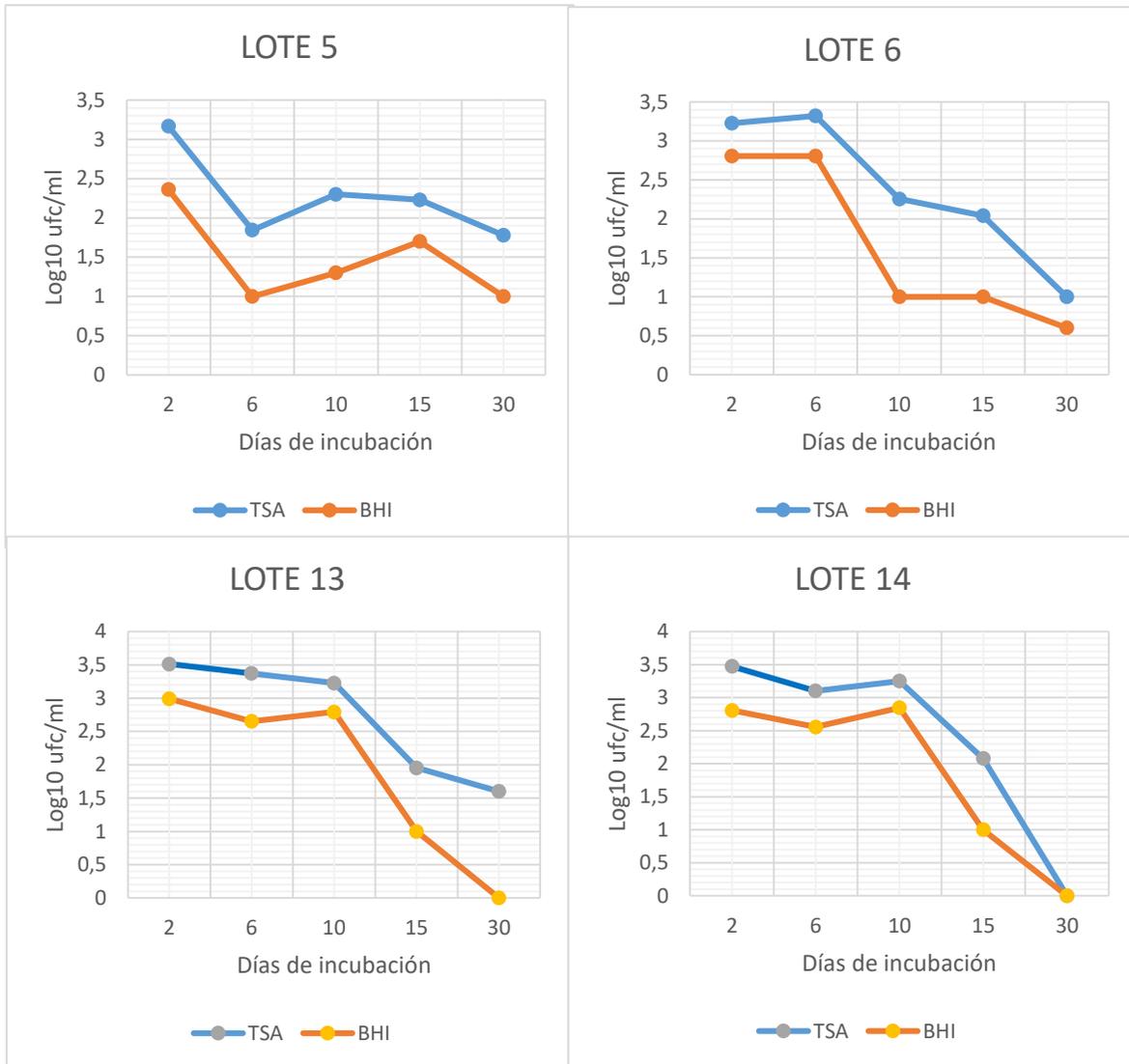
Se representa gráficamente el recuento obtenido a través del tiempo. Las líneas azules representan el crecimiento en TSA y las líneas rojas representan el crecimiento en BHI. Mostrando así que el recuento en TSA es mayor que en BHI. Para una mejor observación del comportamiento poblacional y establecer la recta de crecimiento, los valores de las unidades formadoras de colonias son sometidas al logaritmo base 10, como se muestra a continuación:



Gráfica 3 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia EUM

A partir de la gráfica anterior, se representa individualmente el crecimiento en ambos medios de cultivo de la siguiente manera:





Gráfica 4 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia EUM

Según lo observado en la **Gráfica 4**, los lotes 1, 2, 4, 5, 13 y 14 tienen un recuento poblacional máximo luego de 2 días de incubación, en el lote 3 y 6 este recuento es mayor luego de 6 días, por lo que se podría decir que la población de esporas de este microorganismo pudo ser tan baja, que necesitó 6 días de incubación para expresar una cantidad poblacional mayor. Pasados 6 días de incubación, lotes como el 1, 2, 5 y 14 reducen su población, que aumenta pasados 10 días, como si se adaptarán a un nuevo sustrato en la muestra. En los lotes 3 y 6 esta reducción se ve reflejada luego de 10 días. A los 15 y 30 días de incubación se ve una notable reducción poblacional en la mayoría de lotes.

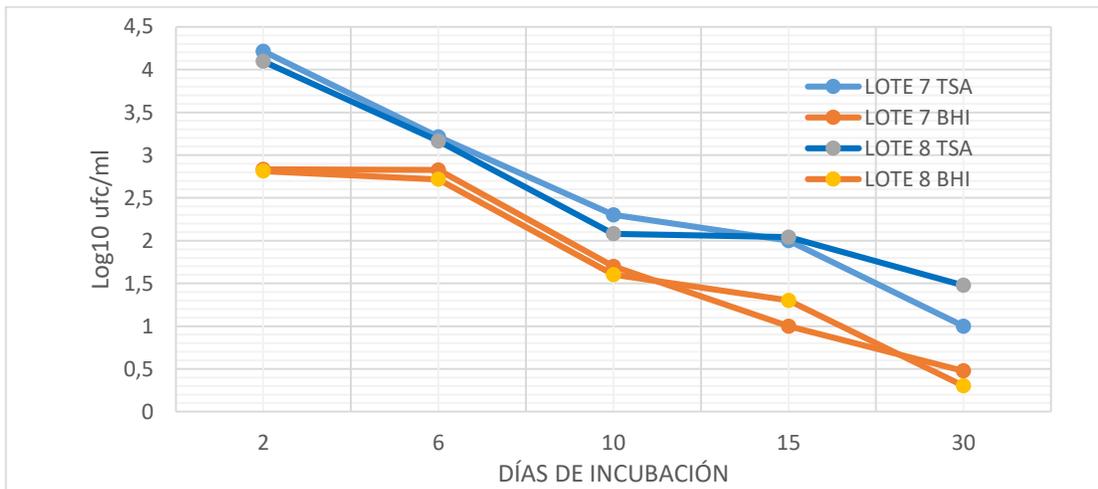
Referencia B

En la **Tabla 3** se representa el comportamiento del microorganismo en los lotes que corresponden a leche entera referencia B

Tabla 3 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche entera referencia B

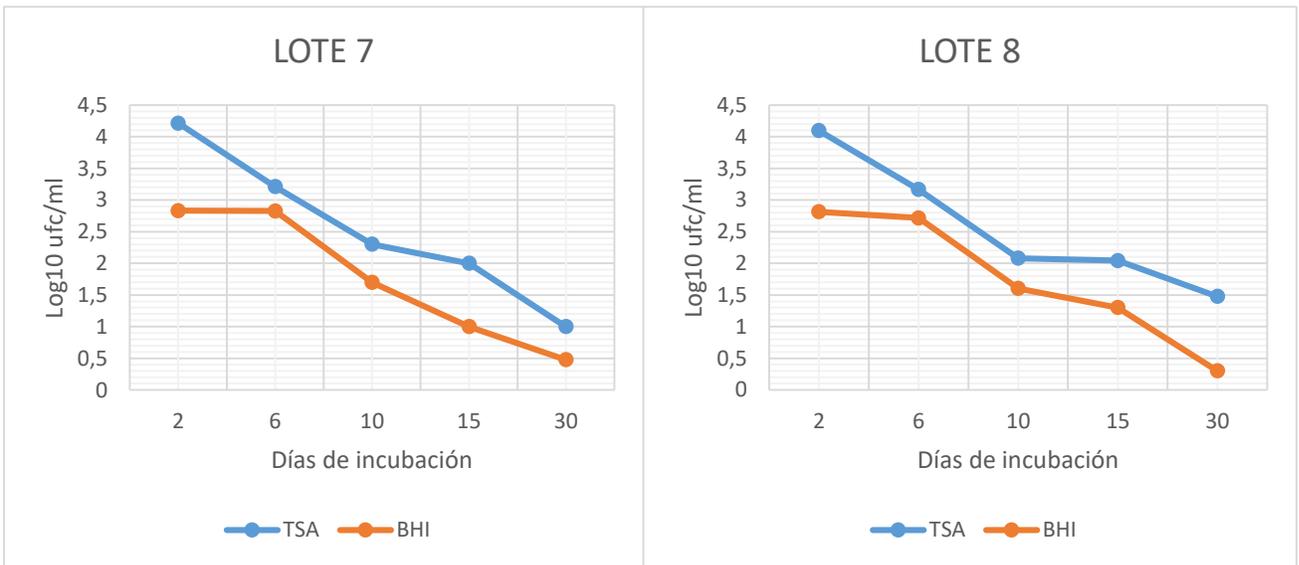
LOTES	2 DÍAS		6 DÍAS		10 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS	
	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml								
LOTE 7	16340	680	1630	670	200	50	100	10	10	<10
LOTE 8	12470	650	1460	520	120	40	110	20	30	<10

La gráfica que representa el logaritmo base 10 de esta referencia se muestra así:



Gráfica 5 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia EUARA

Con un crecimiento individual así:



lotes que correspondan a la referencia EUARA

Ambos lotes graficados anteriormente tienen una cinética microbiana similar, lo que puede significar que provienen del mismo sitio de almacenamiento, provocando que más lotes contengan la misma carga microbiana. Con un recuento máximo pasados 2 días de incubación, que se va reduciendo hasta los 30 días.

La leche de referencia A y B se procesan y envasan en la empresa principal, pero son recogidos y transportados a un centro de acopio diferente, donde se podría aumentar la población microbiana de los bacilos esporoformadores. Es más común ver estos productos con mayor carga microbiana.

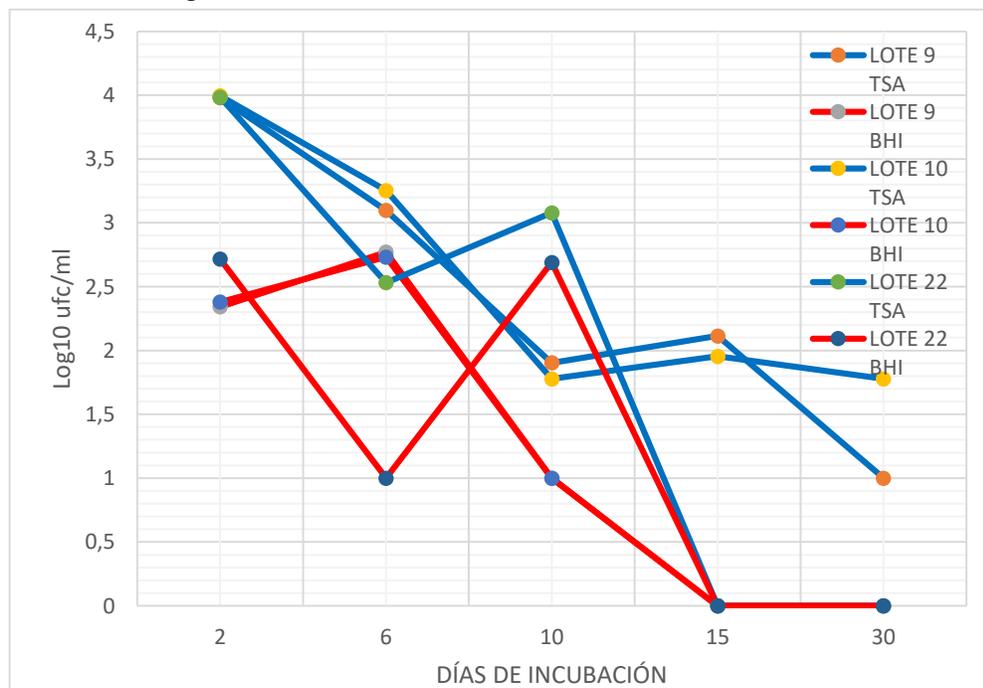
Referencia Deslactosada

En la **Tabla 4** se muestra el comportamiento microbiano en lotes de leche deslactosada.

Tabla 4 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche deslactosada

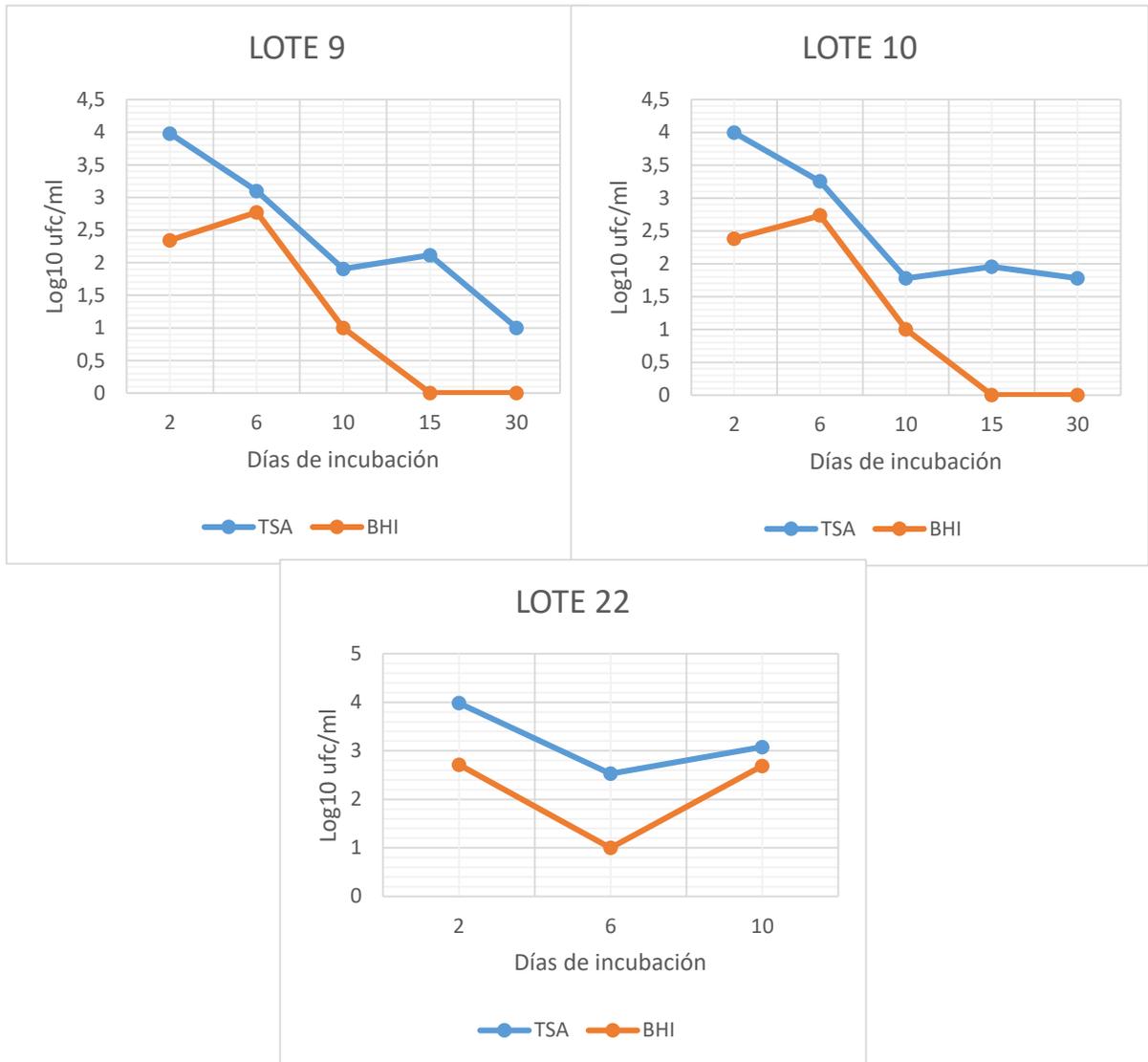
LOTES	2 DÍAS		6 DÍAS		10 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS	
	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml								
LOTE 9	9540	220	1250	590	80	10	130	<10	10	<10
LOTE 10	9870	240	1790	540	60	10	90	<10	60	<10
LOTE 22	9640	520	340	10	1200	490				

Graficada con el logaritmo base 10 así:



Gráfica 7 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia DLU

El crecimiento individual expresado en la **Gráfica 10** se observa así:



Gráfica 8 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia DLU.

De las representaciones anteriores, los lotes 9 y 10 presentan un crecimiento similar, donde luego de las 48 horas, el crecimiento se reduce considerablemente, por otro lado, a pesar de que el lote 22 expresa lo mismo, pasados 10 días de incubación, aumenta levemente su crecimiento. Aquí se debe tener en cuenta que los lotes 9 y 10 fueron envasados el mismo día, además de que corresponden a

leche deslactosada fibra, mientras que el lote 22 es leche deslactosada regular. Esta fibra puede mejorar el crecimiento de este microorganismo.

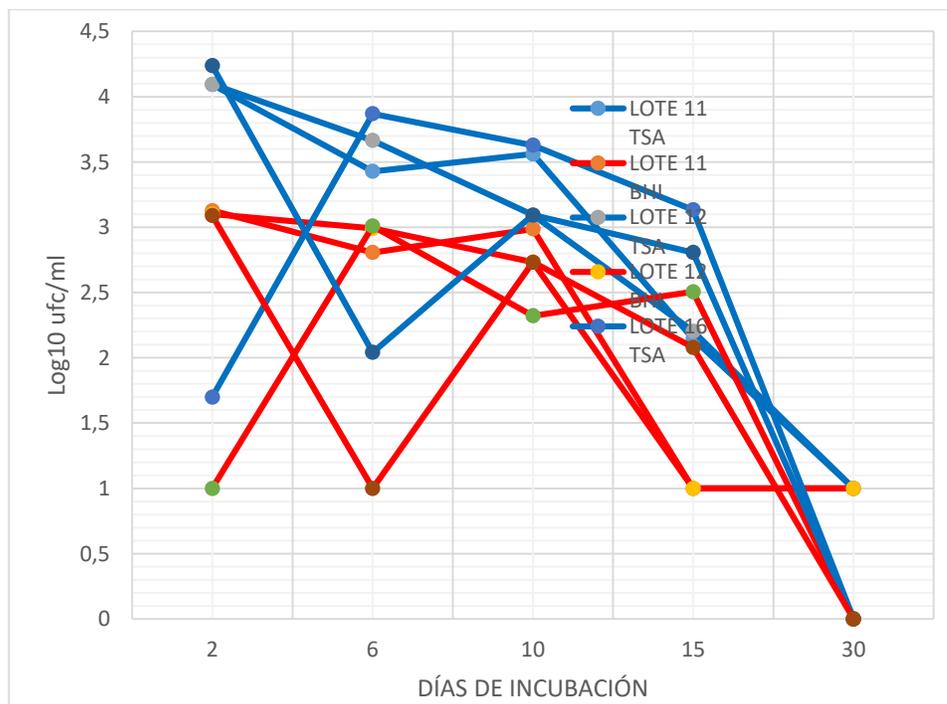
Referencia Crema de leche UHT

En la **Tabla 5** se expresa el comportamiento del microorganismo en lotes de la referencia CLU

Tabla 5 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia Crema de leche UHT

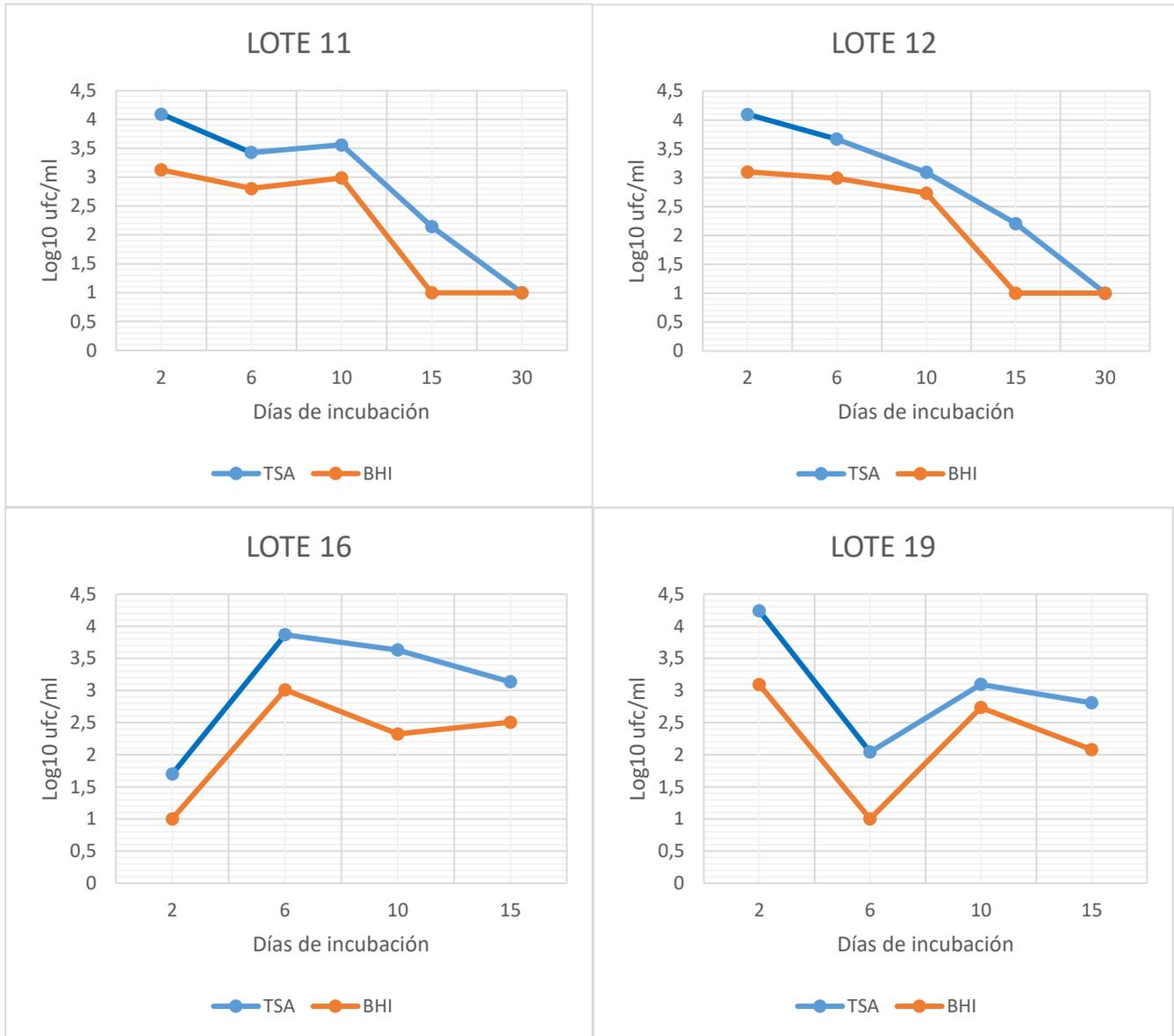
LOTES	48 HORAS		6 DÍAS		10 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS	
	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml								
LOTE 11	12390	1340	2680	640	3640	970	140	10	10	10
LOTE 12	12450	1260	4620	980	1240	540	160	10	10	10
LOTE 16	50	10	7400	1020	4250	210	1360	320		
LOTE 19	17250	1230	110	10	1240	540	640	120		

Graficada en logaritmo base 10 de la siguiente manera:



Gráfica 9 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia CLU

Su crecimiento individual se expresa así:



Gráfica 10 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia CLU.

Los lotes 11, 12 y 19 tienen un recuento poblacional máximo luego de 2 días de incubación, que se va reduciendo pasados los días. Pasados 6 días de incubación, el lote 16 aumenta drásticamente la población microbiana, donde el microorganismo pasa de fase de latencia a fase exponencial, la población en el lote 11 y 19 se reduce pero luego aumenta pasados los 10 días de incubación y finalmente en el análisis de los 15 días, la población microbiana se reduce en todos los lotes de esta referencia.

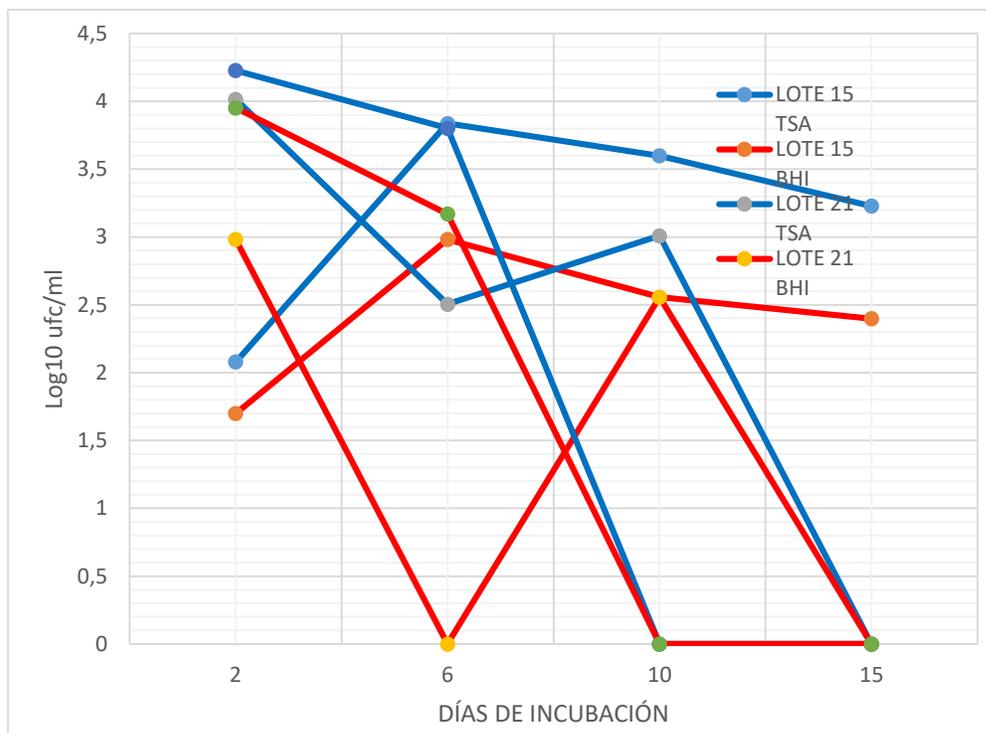
Referencia Leche Entera UHT

Para el principal producto de esta empresa, casi no se encontraron lotes contaminados, en la **Tabla 6** se presenta el comportamiento de este microorganismo una vez evidenciada su presencia.

Tabla 6 Cinética de crecimiento del microorganismo diana en TSA y BHI presente en referencia leche entera UHT

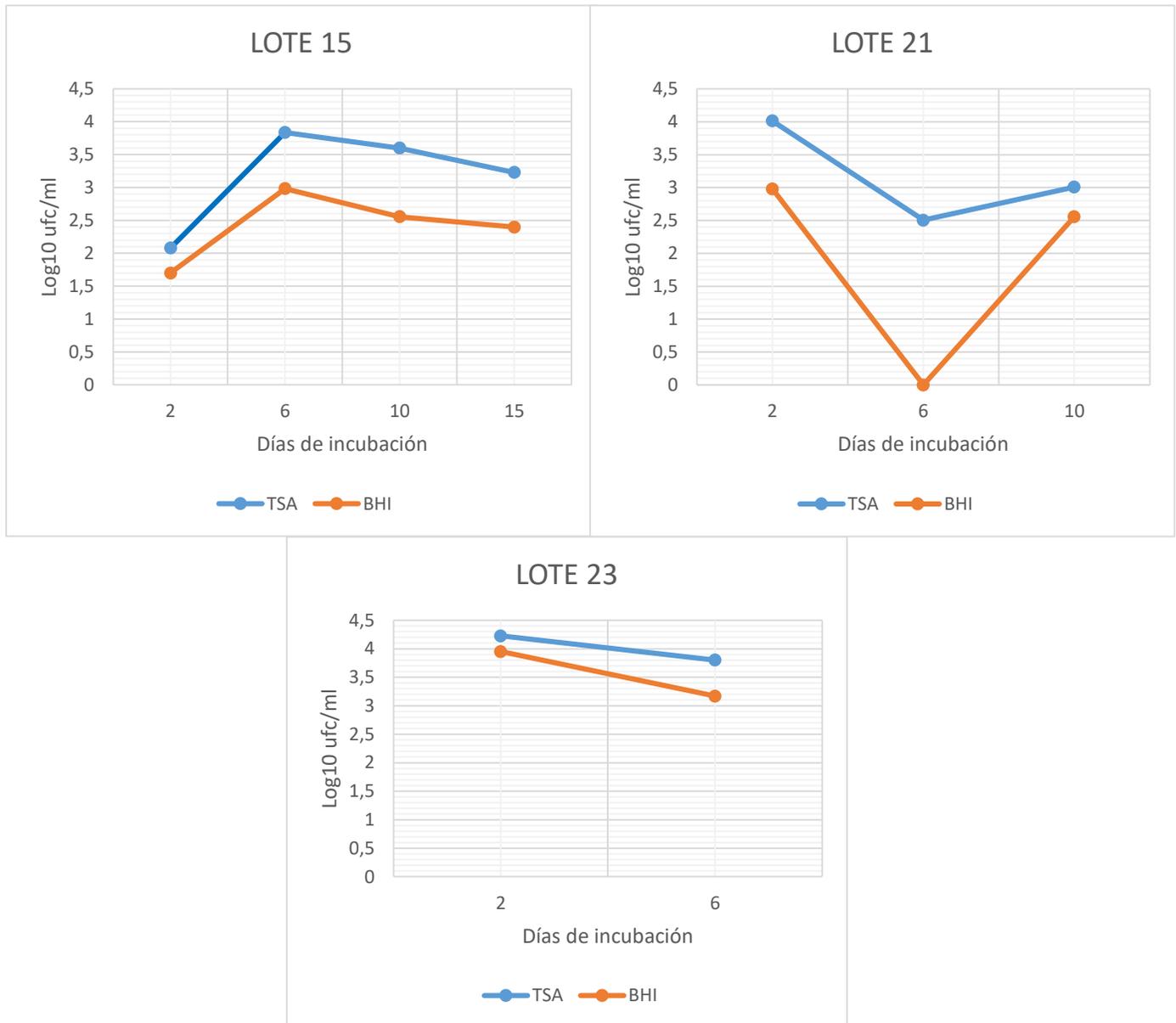
LOTES	48 HORAS		6 DÍAS		10 DÍAS		15 DÍAS	
	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml						
LOTE 15	120	50	6870	960	3970	360	1690	250
LOTE 21	6320	960	320	<10	1020	360		
LOTE 23	6970	890	6340	1480				

Y se representa gráficamente en logaritmo base 10 así:



Gráfica 11 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia EU

Individualmente el crecimiento se refleja así:



Gráfica 12 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia EU

Luego de 2 días de incubación, el crecimiento es máximo en los lotes 21 y 23, pero en el lote 15 pareciera que este microorganismo se encontrara en fase de adaptación. Pasados los 6 días de incubación, en el lote 15, el microorganismo expresa un pico poblacional máximo, sin embargo, los lotes 21 y 23 reducen su población, que hasta incluso en el medio BHI no se observa crecimiento en el lote 21, como si se hubiese agotado la fuente nutricional y se estuvieran adaptando a otro componente de la leche.

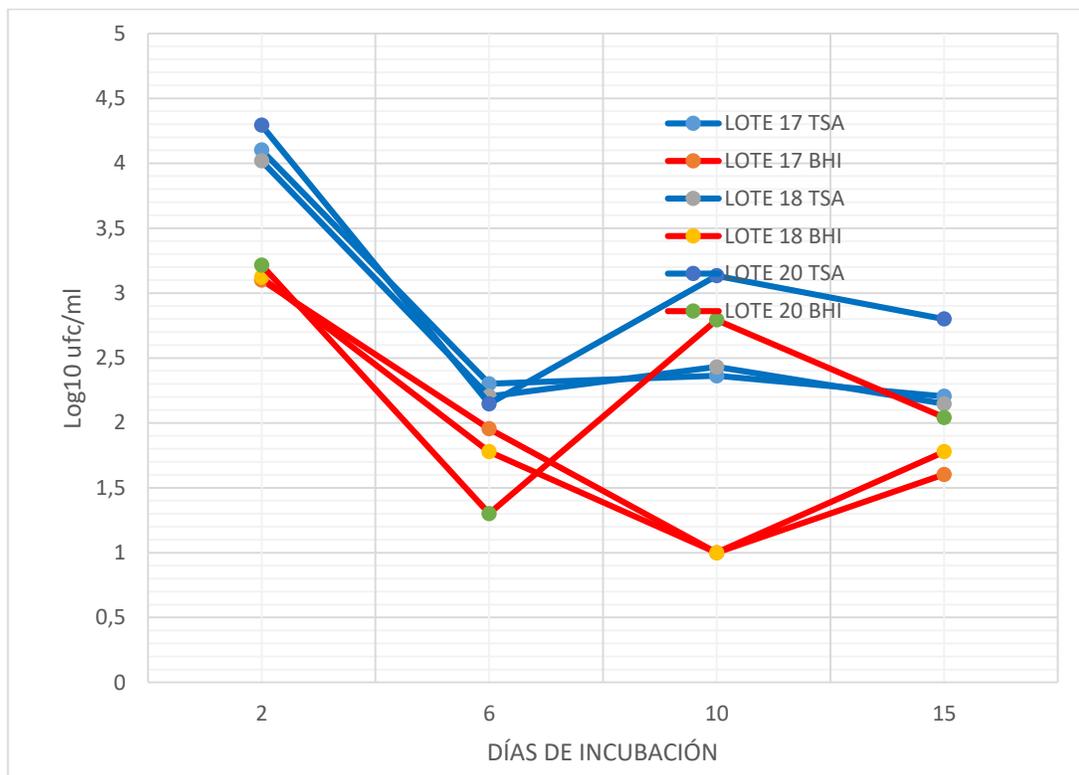
Referencia avena y saborizadas

Finalmente, con los productos fabricados y envasados en menor cantidad, están las avenas y las leches saborizadas, que sin lugar a duda también se ven afectadas por el crecimiento de estos termoresistentes. En la **Tabla 7** se muestra su comportamiento microbiano.

Tabla 7 Cinética de crecimiento del microorganismo *diana* en TSA y BHI presente en las referencias de avena sabor canela y leche sabor fresa

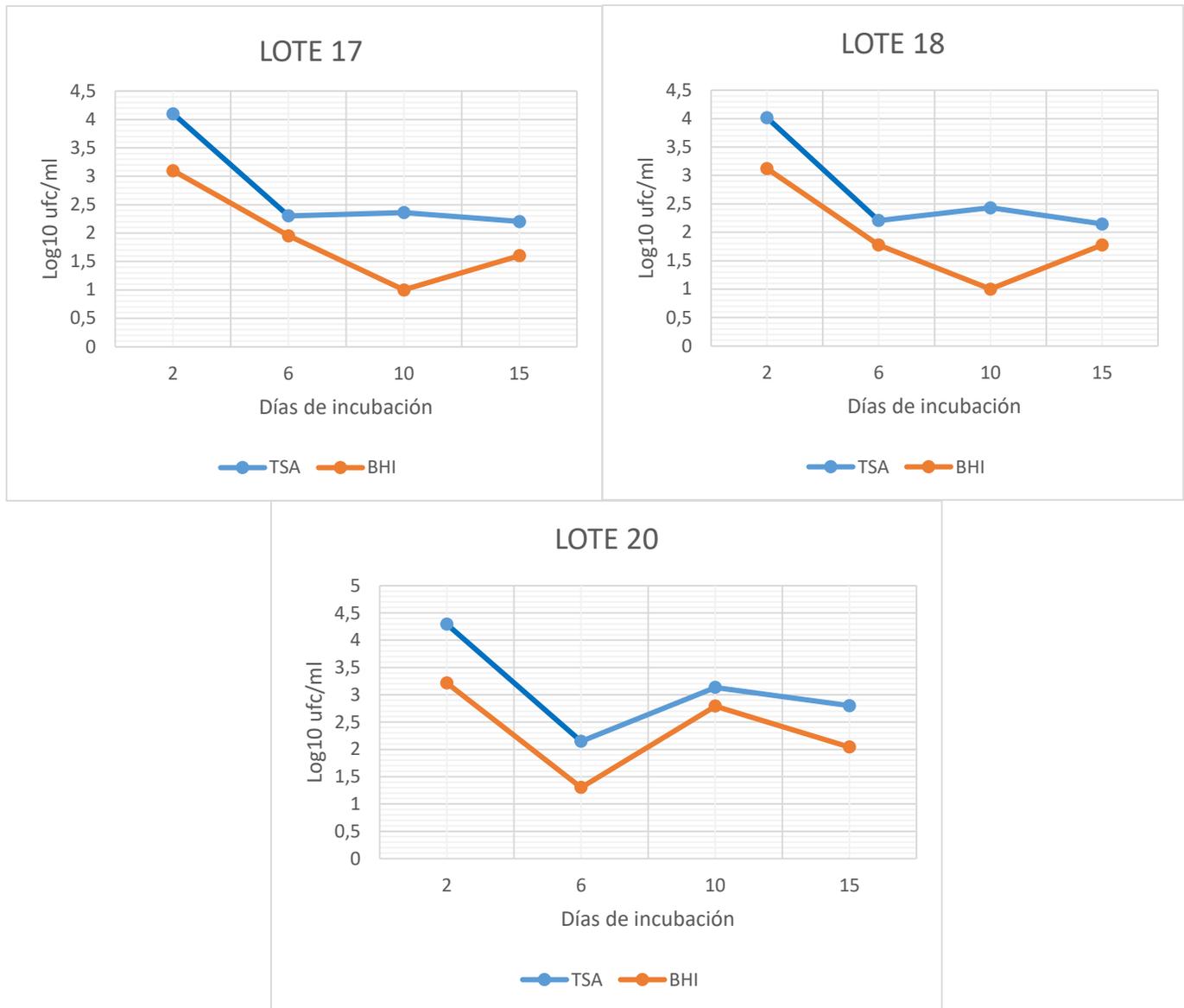
LOTES	48 HORAS		6 DÍAS		10 DÍAS		15 DÍAS	
	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml	TSA ufc/ml	BHI ufc/ml
LOTE 17	12640	1260	200	90	230	10	160	40
LOTE 18	10420	1320	160	60	270	10	140	60
LOTE 20	19640	1640	140	20	1360	620	630	110

Graficando el comportamiento logarítmico anterior de los lotes juntos, se observa de la siguiente manera:



Gráfica 13 Cinética de crecimiento del microorganismo en estudio en medios TSA y BHI en lotes de la referencia AU y LSUF

Individualmente el crecimiento se ve reflejado de la siguiente manera



Gráfica 14 Cinética de crecimiento individual en los medios de cultivo TSA y BHI de los lotes que correspondan a la referencia AU y LSUF

El comportamiento del microorganismo en estos lotes se observa un poco más coordinado que lo observado en otras referencias. Donde el recuento luego de 2 días es mayor y se va reduciendo tanto, que pasados 6 días de incubación hay una reducción de hasta casi 2 veces el total de la población inicial. Luego de 10 días de incubado, aumenta el recuento en ambos medios de cultivo excepto en los lotes 17 y 18, hasta finalmente una reducción pasados 15 días de incubación.

Discusión

La composición en las leches es la misma, es decir, contienen la misma cantidad de proteína, grasas, vitaminas y minerales, por lo que se puede analizar que el microorganismo no tiene preferencia por uno u otro producto. Por otro lado está la crema de leche, que tiene porcentaje de grasas mucho mayor que las leches blancas, dificultando la degradación de algunos componentes de este producto, también se analizó avena, este producto a base de cereal contiene más de azúcar, siendo un producto ideal nutricionalmente para cualquier microorganismo termorresistente sin ningún tipo de competencia.

Respecto a la carga microbiana, en muchos de los lotes, se observaba que pasados 2 días de incubación, el recuento era bajo, pero luego se reactivaba pasados los 6 días de incubación, pudiendo generar la hipótesis de; un estado de latencia de este microorganismo, debido a un bajo número de esporas, que se van transformando en células a medida que van pasando los días; o reducción de la población debido al agotamiento del sustrato principal y una nueva adaptación a otro sustrato debido a que se observaba que el recuento se reducía pasados los 6 o 10 días de incubación y luego aumentaba ligeramente.

Como se menciona anteriormente, no puede establecerse una contaminación en un punto de la cadena de producción, porque esta contaminación puede ser general, desde el alimento y el forraje del ganado, hasta la formación de un petrifilm por parte del microorganismo en alguna tubería de producción y envasado.

De acuerdo con las regulaciones de la comercialización de la leche y los productos lácteos, cuya norma básica es la Directiva Europea 92/46/CEE, los recuentos de colonias de paquetes sin abrir, después de 15 días de incubación a 30°C, deben estar por debajo de 10 ufc por 0.1 ml o 100 ufc, por lo anterior, podemos decir que si se usa el medio BHI para hacer el recuento microbiano de las muestras, se estaría cumpliendo con la Directiva Europea porque su recuento es bajo luego de los 15 días de incubación en el 91,3% de los lotes. Por otro lado, en el medio de cultivo TSA, sólo el 8,7% de los lotes cumplirían.

Finalmente el escaso crecimiento y las reacciones negativas para muchas pruebas estándar y bioquímicas, pueden acarrear algunas dificultades para conseguir una identificación fenotípica fiable de bacilos esporoformadores. Además de que estos métodos de identificación tardan mucho tiempo, debido a la baja velocidad de crecimiento de esta especie (Abouelnaga, 2016).

6.4 Esterilidad comercial y uso de aceite mineral

Conjunto a la siembra en placa en ambos medios de cultivo, se realizó pruebas de esterilidad comercial en cada lote analizado obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 8 Resultados obtenidos luego de las pruebas de esterilidad comercial a los lotes seleccionados. A uno de los 3 tubos inoculados en cada condición, se le añadió 2ml de aceite mineral estéril para mejorar la anaerobiosis

LOTE	35°C		55°C	
	AEROBIOSIS	ANAEROBIOSIS	AEROBIOSIS	ANAEROBIOSIS
LOTE 1	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 2	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 3	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 4	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 5	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 6	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 7	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 8	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 9	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 10	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 11	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 12	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 13	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 14	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 15	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 16	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 17	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 18	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 19	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 20	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 21	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA
LOTE 22	HRS	HRS	AUSENCIA	AUSENCIA

Teniendo en cuenta la **Tabla 8**, a pesar de que se usó el aceite mineral para conseguir una nula disposición de oxígeno para impedir el crecimiento de bacilos esporoformadores aerobios facultativos, no se logró el objetivo, debido a que sí se observó el crecimiento de este microorganismo, dando a entender que el aceite no fue una barrera suficiente, pero si era notoria la reducción del bacilo en el campo de visión del microscopio.

En la **Figura 4** que se muestra a continuación, se puede observar la presencia del bacilo largo Grampositivo en los tubos de BHI con almidón, incubados por 10 días a la temperatura correspondiente. Es notoria la reducción de su visión al pasar a

una atmósfera anoxigénica. Por otro lado, las muestras incubadas a 55°C no evidencian el bacilo.

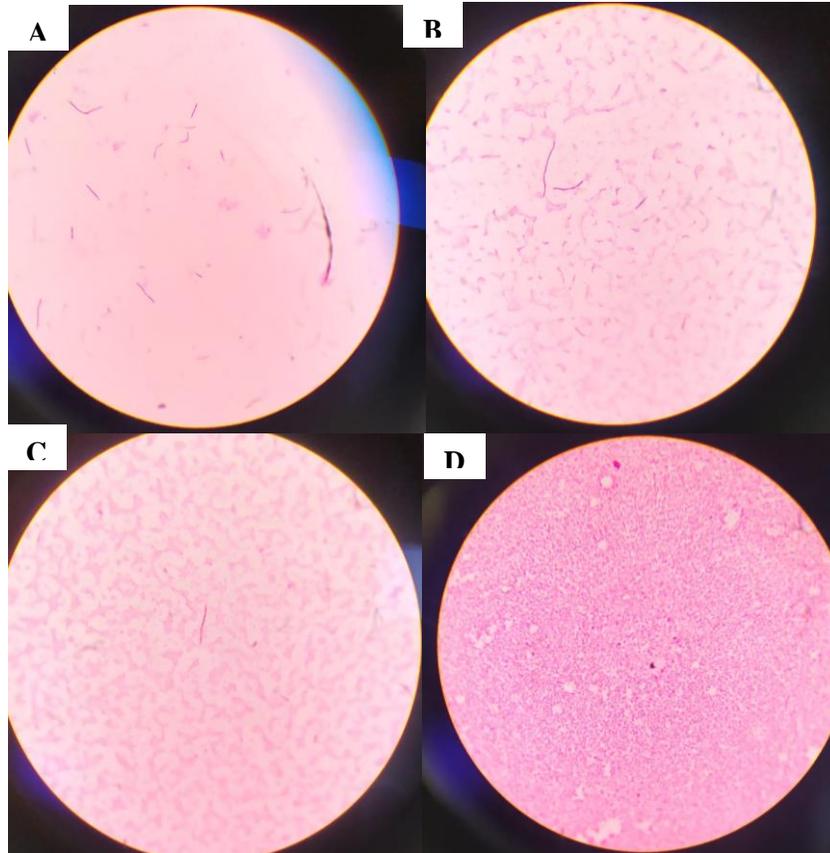


Figura 3 Tinción de Gram de muestras sembradas en los tubos de caldo BHI con almidón para prueba de esterilidad comercial, vistas bajo el microscopio a 1000X. A muestras incubadas a 35°, bacilo Gram positivo. B. Muestras incubadas a 35°C en anaerobiosis sin aceite mineral. C. Muestras incubadas a 35°C en anaerobiosis con 2 ml de aceite mineral. D. Muestras incubadas a 55°C, donde no hay evidencia del bacilo.

Por otro lado, se usó **S. aureus**, un microorganismo anaerobio facultativo como control en los tubos con BHI y almidón, evidenciando que no existe una atmósfera anaeróbica total, debido a que sí hubo crecimiento en los tubos así:

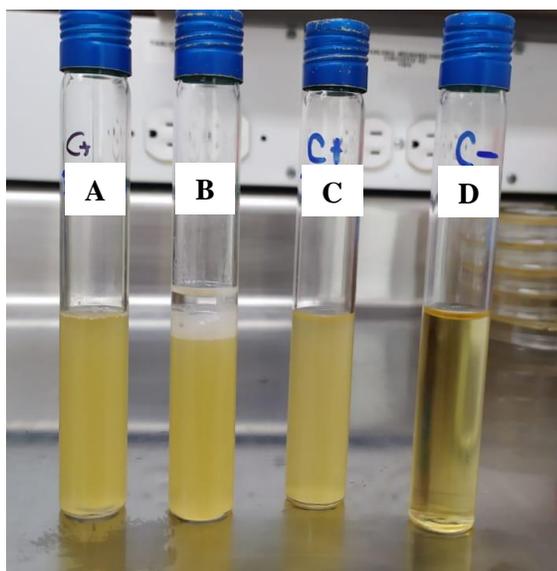


Figura 4 Tubos con caldo BHI adicionado de almidón para prueba de esterilidad comercial. **Tubo A** Control positivo incubado a 35°C en aerobiosis. **Tubo B.** Control positivo con 2ml de aceite mineral incubado a 35°C en anaerobiosis. **Tubo C.** Control positivo incubado a 35°C en anaerobiosis. **Tubo D.** Control negativo incubado a 35°C

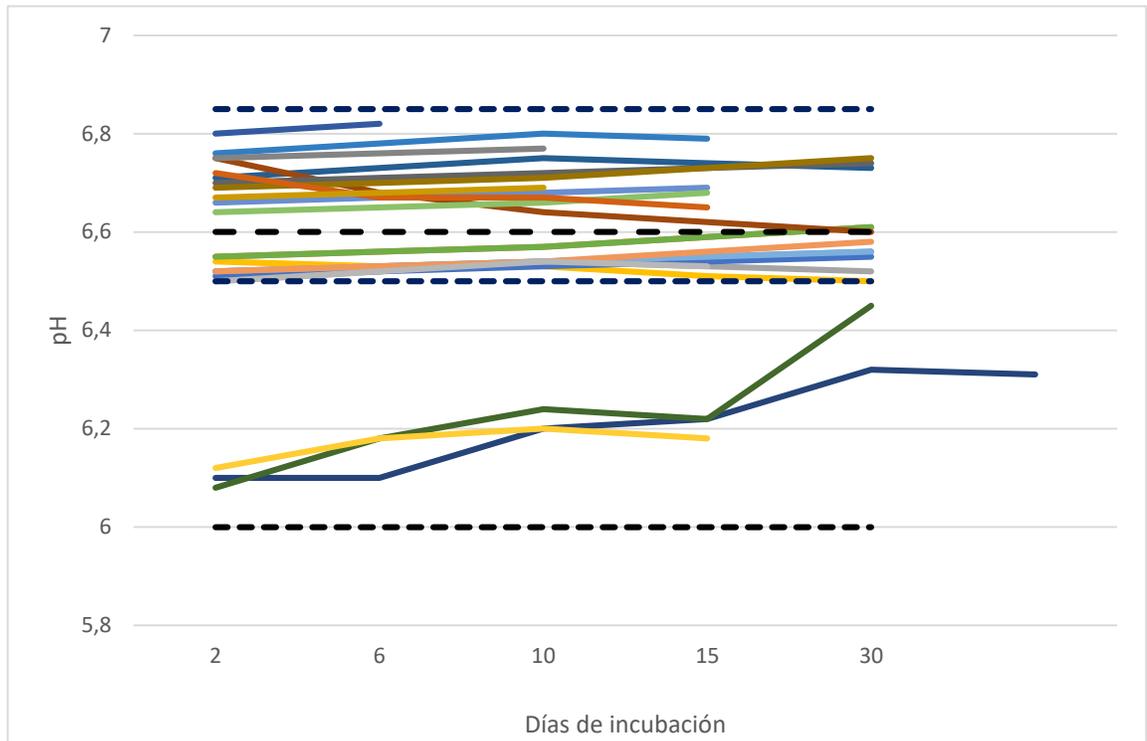
6.5 Resultados fisicoquímicos

Las muestras luego de sembradas fueron enviadas al laboratorio fisicoquímico de la planta de Funza, dotado con equipos y personal capacitado para realizar pruebas fisicoquímicas de pH, acidez y pruebas sensoriales, que determinan algún ligero cambio en las características de las mismas, comprobando si la presencia de este microorganismo provoca cambios de fácil percepción.

pH

En la **Gráfica 15** se observa el comportamiento de los iones hidronio (H⁺) en las muestras, transcurridos los días de incubación.

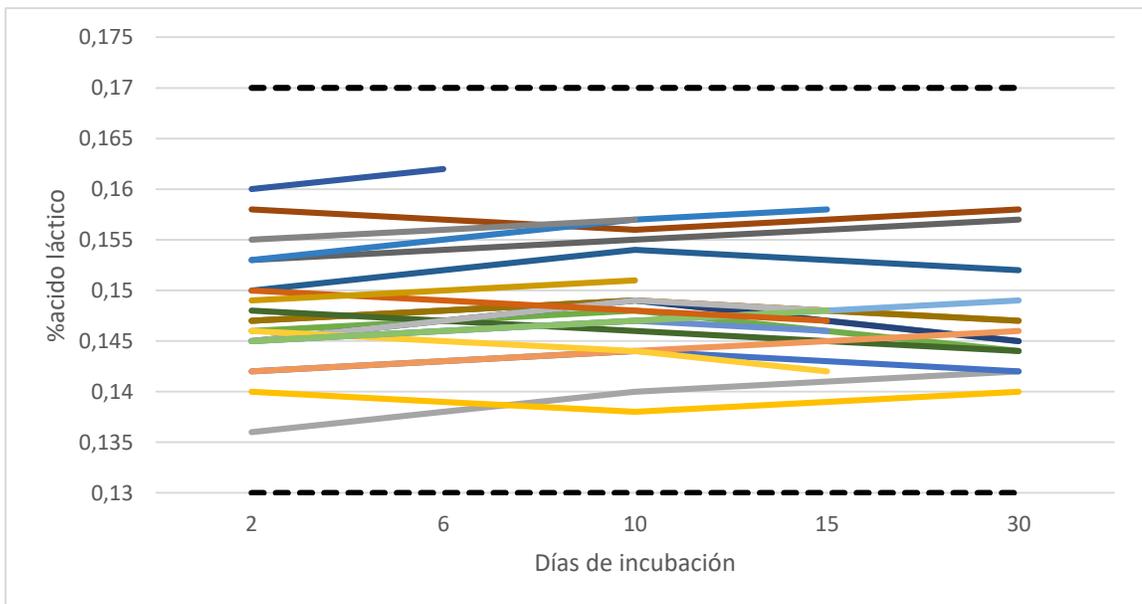
Como se observa allí, ninguna muestra de leche entera, deslactosada, avena y saborizada se sale de los límites de pH permitido en la norma (6,5 a 6.85). Los valores inferiores, corresponden a los valores límites de pH de la crema de leche que oscilan entre 6,0 y 6,60 y una acidez titulable no mayor a 1,16% expresada en ácido láctico (Ganadería, 2008). Afirmando que no hay ningún tipo de perturbación que altere la actividad iónica en las muestras.



Gráfica 15 pH calculado en las muestras pasados los días de incubación

Porcentaje de acidez titulable

En la **Gráfica 16** se puede observar el % de ácido láctico presente en las muestras.

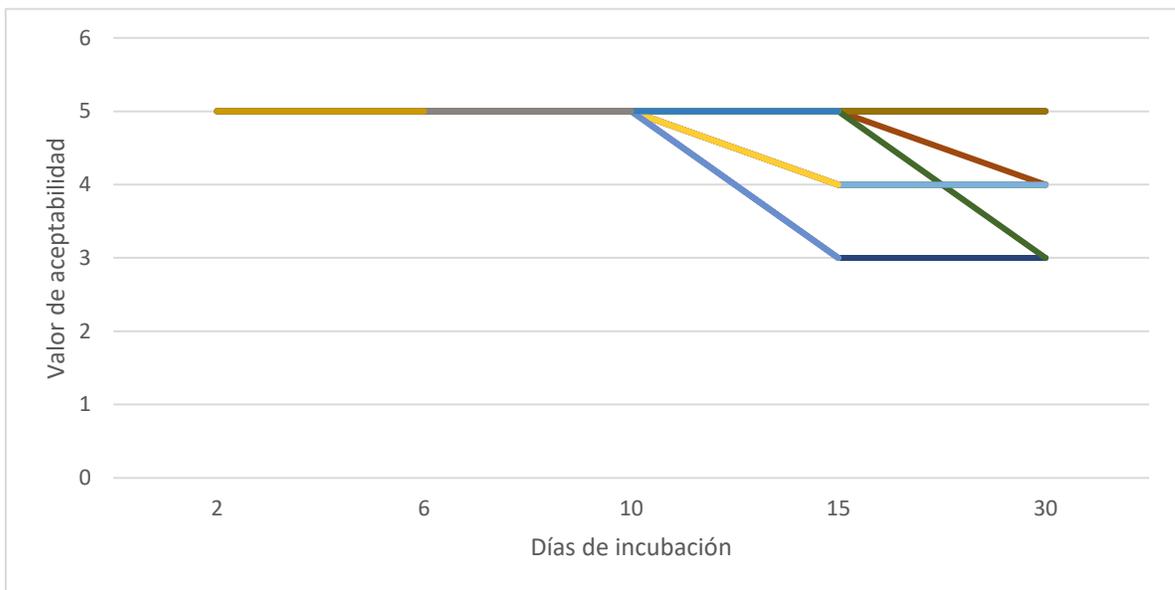


Gráfica 16 % de ácido láctico calculado en las muestras pasados los días de incubación

Al igual que en la gráfica que muestra el pH de las muestras, el % de ácido láctico presente en las mismas no varía mucho según los días de análisis, todo se encuentra dentro del rango establecido en la norma (1,17% y 1,13%, Decreto 616, 2006).

Pruebas sensoriales

Estas pruebas se evalúan en un rango de 1 a 5, donde 5 es un valor de muy agradable tanto en textura, olor, sabor y color y 1 es el valor de menos agradable. Estos resultados se disponen en la **Gráfica 17**.



Gráfica 17 Valor de aceptabilidad de las muestras sometidas a pruebas sensoriales luego de los análisis los días de incubación

Según la **Gráfica 20** ninguna muestra fue desagradable al gusto. Por otro lado, pocas muestras fueron perdiendo algún tipo de característica organoléptica disminuyendo la agradabilidad, pero ninguna hasta el punto de generar un rechazo por parte del degustador. Los lotes que se han visto afectados a través del tiempo, corresponden a la referencia CLU.

A pesar de que el microorganismo estuvo latente pasados los días de análisis, éste no demostró alteraciones en el producto, ni un rechazo sensorial.

Finalmente, el metabolismo de estos bacilos esporoformadores no está bien especificado, debido a que no forma CO_2 , ni alcoholes, ni acidificación del producto, por lo que se necesitaría análisis fisicoquímicos especializados para determinar la composición final del producto.

7. Conclusiones

De los 23 lotes analizados, se comparó el crecimiento obtenido en el medio TSA y BHI, concluyendo que a pesar de obtener colonias más pequeñas y menos visibles, el medio TSA es el más óptimo para una mayor recuperación de los bacilos, sin embargo, el medio BHI es mejor para realizar pruebas macro y microscópicas debido a las características morfológicas de las colonias, ya que éstas son más grandes y más visibles al ojo humano.

Se concluyó que la presencia de bacilos esporoformadores no afecta las características fisicoquímicas de las muestras, inclusive pasados los 30 días de incubación no generó ningún tipo de repercusión en la salud del degustador.

Se evaluó el uso de aceite mineral para generar una atmósfera anóxica en los tubos de ensayo, pero los resultados no fueron acertados, dejando abierta la posibilidad de usar otros métodos que no permitan la disposición de oxígeno en los medios inoculados.

8. Recomendaciones

Se recomienda seguir buscando más métodos para producción de anaerobiosis en los tubos de ensayo y así definir si los bacilos esporoformadores son anaerobios facultativos.

Una vez estandarizado el proceso de anaerobiosis en los tubos, se recomienda realizar una prueba comparativa con el aceite mineral para determinar posibles fallos a la hora de usar éste método

Se sugiere continuar con el estudio para verificar las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas de las muestras hasta finalizar la vida útil del producto.

Bibliografía

- Abouelnaga, M. (2016). *Caracterización molecular y desarrollo de métodos de PCR en tiempo real para evaluar y cuantificar genes de virulencia de enterococos en alimentos fermentados y no fermentados y "Bacillus sporothermodurans" en leche UHT*. Lugo: Universidad de Santiago de Compostela.
- Agrario, B. (10 de Agosto de 2010). *Ultrapasteurización*. Obtenido de Boletín Agrario: <https://boletinagrario.com/ap-6,ultrapasteurizacion,765.html>
- Aguilar, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*, 333-338.
- Becton, D. (26 de Agosto de 2013). *Becton Dickinson* . Obtenido de BD: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-256665.pdf>
- Benavides, H. A. (2007). *Propuesta de guía de aplicación de técnicas de microbiología (Bacterias y Hongos) para ser utilizado en microbiología general*. El Salvador: Universidad de El Salvador.
- Bernier, I., Cádena, E., & Piñeros, O. (2012). Bacillus sporothermodurans anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia. *Alimentos hoy Colombia*, 126-139.
- Canaria, U. d. (NR de NR de NR). *Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias*. Las Palmas de Gran Canaria: ULPGC. Obtenido de ULPGC: https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35729/pruebas_bioquimicas_de_identificacion_de_bacterias.pdf
- Castañeda, S. L. (2015). Caracterización de la microbiota de leche ultra alta temperatura (UAT-UHT) analizada en Bogotá. *Investigaciones en Seguridad Social y Salud*, 37-43.
- Díaz, M. d. (2005). Proceso básico de la leche y el queso. *Revista Digital Universitaria*, 1-17.
- Dickinson, B. (26 de Agosto de 2013). *Becton Dickinson*. Obtenido de BD: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
- FEDEGAN. (12 de Diciembre de 2020). *Producción*. Obtenido de FEDEGÁN: <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>
- FENIL. (5 de Septiembre de 2011). *Federación Nacional de Industrias Lácteas* . Obtenido de Plan de Nutrición y Comunicación de Productos lácteos : <http://www.lacteosinsustituibles.es/p/es/consumidor/publico-general/obtencion-y-conservacion.php>
- Ganadería, M. d. (NR de NR de 2008). *MEIC-MAG-S*. Obtenido de GOBERNMENT WEB SITE: <http://www.mag.go.cr/legislacion/2009/de-35406.pdf>

- ICONTEC. (- de - de 2018). *ICONTEC*. Obtenido de ICONTEC: <https://tienda.icontec.org/gp-microbiologia-de-alimentos-metodo-horizontal-para-la-deteccion-de-bacillus-sporothermodurans-en-leche-uht-ultra-high-temperature-ntc6257-2018.html>
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 10-18.
- Methods, S. (2004). *Examination of Dairy Products* . Washington D.C: American Public Health Association .
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., & Stackebrandt., E. (1996). *Bacillus sporothermodurans*, a New Species Producing Highly Heat-Resistant Endospores. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 759-764.
- 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). BOGOTÁ, CUNDINAMARCA, COLOMBIA: MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL.
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., & Heyndrickx, M. (2005). *Bacillus sporothermodurans* y otras formas de esporas altamente resistentes en leche. *Journal of Applied Microbiology*, 370-384.

9. Anexos

9.1 Actividades desarrolladas en el laboratorio de microbiología Funza, Cundinamarca.

9.1.1 Análisis diarios

❖ Termófilos

Este análisis se realiza diariamente a partir de la producción del día anterior, para determinar la presencia de esporas aerobias que pudieron resistir los procesos de pasteurización y ultra pasteurización.

Metodología

El día de la producción se debe tener en cuenta los productos a empacar, debido a que no se toman la misma cantidad de lotes en todos los productos. Para leches blancas (leche entera, deslactosada, descremada, descremada deslactosada, semidescremada) y crema de leche UHT se toma un lote al inicio y otro al final de la producción; para avenas (sabor natural y/o sabor canela) y leches saborizadas (vainilla, fresa y/o chocolate) se toma un lote por boquilla de envasadora. Las muestras son tomadas por los auxiliares del laboratorio de microbiología y son incubadas a 35°C por 24 horas, pasadas las 24 horas se registra en la plataforma virtual, se toma una alícuota de 1mL, se siembra en PCA por profundidad y se incuba a 50°C por 48 horas. Se realiza la lectura y se informa como UFC por mL.

En la **Figura 5** se presenta un ejemplo de la caja de Petri con PCA inoculado con muestra.

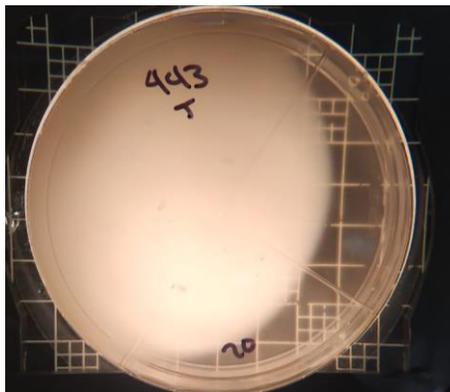


Figura 5 Prueba de termófilos, no se observa crecimiento microbiano

❖ Arranques

Los arranques es un término designado al agua que sale de la envasadora, antes de empacar el producto luego de ser pasteurizado. Aquí se determina las boquillas de las envasadoras presentan algún agente contaminante que pueda afectar la esterilidad del producto final.

Metodología

Cada que una envasadora va a iniciar el proceso de empaque, el agua que se hace pasar por las boquillas, se empaca y se lleva al laboratorio, donde se registra en un estadístico y se siembra en el Petrifilm™ AQHC, se incuba a 35°C por 48 horas y se hace un recuento de bacterias heterotróficas por mL.

En la **Figura 6** se presenta un ejemplo del Petrifilm™ AQHC inoculado con muestra.

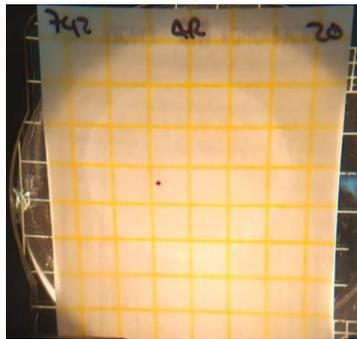


Figura 6 Petrifilm AQHC inoculado con 1ml de agua de arranque

❖ Control diario de medios

Cada día, al usar medios de cultivos para análisis semanales o especiales, se debe tomar de 2 a 3 cajas, dependiendo del medio, para hacer análisis cuali y cuantitativos, como productividad, selectividad y esterilidad.

Metodología

Para el agar PCA: Se toman 2 cajas de Petri que contenga aproximadamente 18 mL de agar PCA, una caja es el control positivo con **S. aureus** y la otra sirve como prueba de esterilidad. A partir de un cultivo puro y conservado a 2°C, tomar una colonia y sembrar por estría en el control positivo. Incubar, revisar la capacidad de recuperación y describir las características morfológicas de las colonias

Para el agar BHI: Se toman 2 cajas de Petri, la caja de control positivo es inoculada con **B. sporothermodurans** tomada de un cultivo puro e incubar tanto el control

positivo como el control de esterilidad y evisar la capacidad de recuperación y describir las características morfológicas de las colonias

Para el agar Chromocult: Se toman 3 cajas de Petri, la caja de control positivo se inocula con un cultivo puro de *E. coli*, el control negativo se inocula con *S. aureus* y se incuban junto con el control de esterilidad a 35°C por 24 horas. Revisar la capacidad de selectividad del medio y reportar.

Para el agar YGC: Se toman 3 cajas de Petri, la caja de control positivo se inocula con un cultivo puro de *C. albicans*, el control negativo se inocula con *E. coli* y se incuban junto con el control de esterilidad a 25°C por 5 días. Revisar la capacidad de selectividad del medio y reportar.

En la **Figura 7** se presenta un ejemplo de la caja de Petri con PCA inoculado con la cepa y control esterilidad.

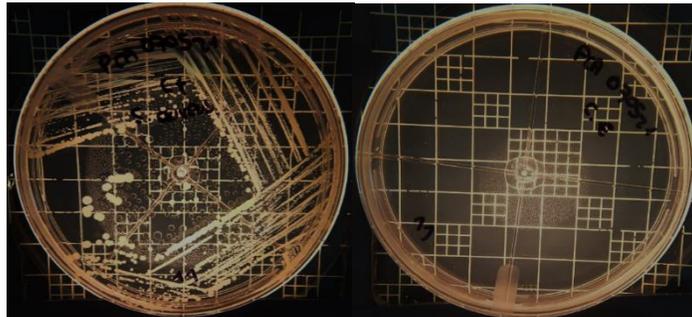


Figura 7 Cajas de Petri con PCA, para control positivo y para control de esterilidad

En la **Figura 8** se presenta un ejemplo de la caja de Petri con Agar BHI inoculado con la cepa.

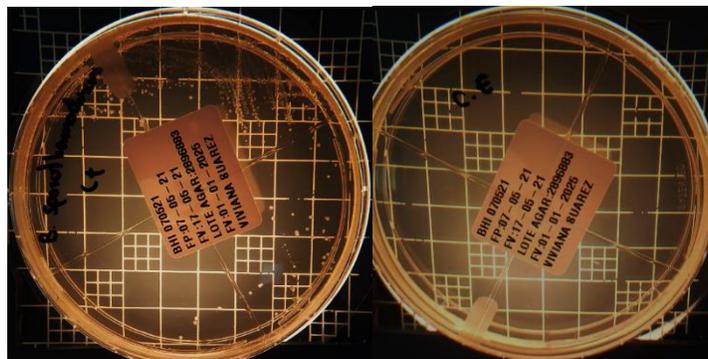


Figura 8 Cajas de Petri con BHI para control positivo y control de esterilidad

En la **Figura 9** se presenta un ejemplo de la caja de Petri con Agar Chromocult inoculado con la cepa.

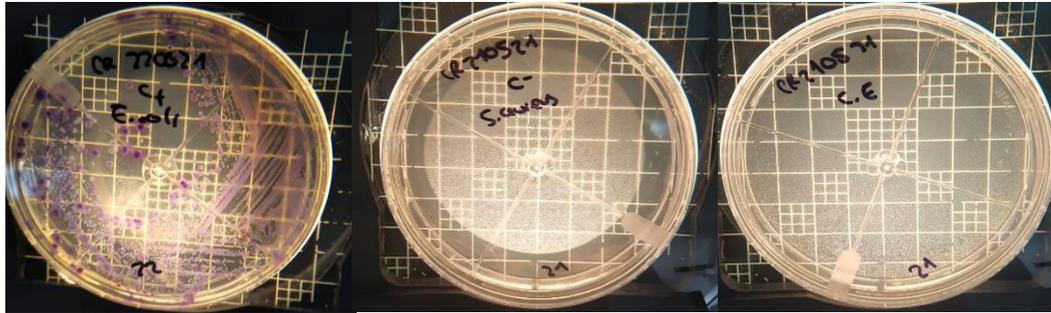


Figura 9 Cajas de Petri con Chromocult para control positivo, control negativo y control de esterilidad

En la **Figura 10** se presenta un ejemplo de la caja de Petri con Agar YGC inoculado con la cepa.

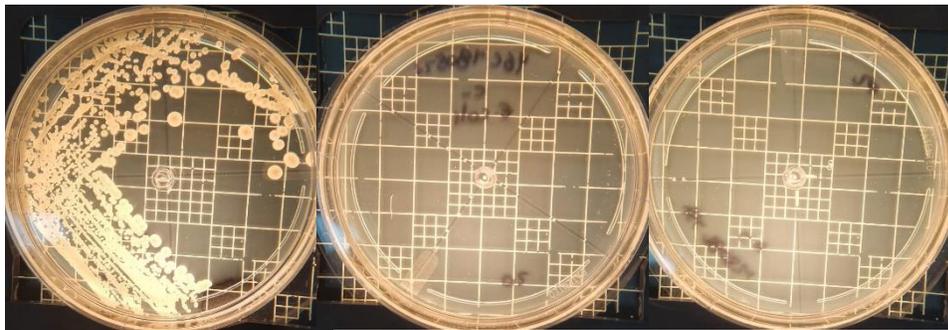


Figura 10 Cajas de Petri con YGC para control positivo, control negativo y control de esterilidad

9.1.2 Análisis semanales

❖ Silos

Los silos son equipos de almacenamiento que contienen tanto leche cruda, como leche que ha sido termizada y crema de leche cruda. En total son 11 silos, 7 de ellos contienen leche y 4 silos de mezclas contienen crema de leche, avena y/o leches saborizadas. Este análisis sirve para determinar las condiciones microbiológicas de los productos contenidos dentro de los silos.

Metodología

Cualquier día de la semana, los silos que contengan productos se muestrean esterilizando la boquilla y dejando correr el producto por 10 segundos para purgar la boquilla, se toman aproximadamente 35 mL en un frasco productor y se

mantienen a temperaturas de refrigeración mientras se realizan los siguientes análisis:

Se toma 1 mL del producto y se llevan a 9 mL de agua peptona estéril, dilución 10^{-1} , a partir de aquí, se siembra:

- Aerobios mesófilos; 1 mL en Petrifilm™ AC
 - Leche cruda y crema de leche cruda: Se siembran en 2 diluciones; 10^{-3} y 10^{-4}
 - Leche termizada (se incluye avena y leche saborizada): Se siembran 2 diluciones; 10^{-2} y 10^{-3}
 - Incubar a 35°C por 48 horas

- Coliformes totales y ***E coli***: 1 mL en profundidad en caja de Petri con Agar Chromocult
 - Leche termizada (se incluye avena y leche saborizada): Se siembran 2 diluciones; 10^{-2} y 10^{-3}
 - Incubar a 35°C por 24 horas

- Psicrótrofos: 1 mL en profundidad con Agar PCA leche
 - Leche cruda y crema de leche cruda: Se siembran en dilución 10^{-3}
 - Leche termizada (se incluye avena y leche saborizada): Se siembran en dilución 10^{-2}
 - Incubar a 25°C por 24 horas

- Mohos y levaduras:
 - Tomar 1 mL a partir de la dilución 10^{-1} y sembrar en caja por profundidad y añadir agar YGC
 - Incubar a 25°C por 5 días.

- Esporas de aerobios mesófilos:
 - A partir de la dilución 10^{-1} , someter el tubo a una temperatura de 80°C por 10 minutos
 - Pasados los 10 minutos, llevar a baño frío por 5 minutos
 - Sembrar 1 mL en caja por profundidad y añadir agar PCA.
 - Incubar a 35°C por 72 horas

❖ **Muestreo en Casino**

Se realiza muestreo a alimentos, manipuladores y superficies para llevar a cabo una trazabilidad en el casino.

❖ Muestreo de alimentos

Tomar aproximadamente una porción de los alimentos a servir ese día, los alimentos son; Alimento cárnico, ensalada, jugo, postre y alimento preparado. Se pesan 10 gramos de cada alimento, se lleva a 90 mL de agua peptona estéril y se realiza los siguientes análisis:

El pH del jugo debe ser neutralizado con Hidróxido de sodio al 1N para evitar lecturas fallidas en los medios. La cantidad de NaOH es calculado mediante un pHmetro, donde se añade hidróxido hasta obtener una pH de 5.8 – 6.2

- Aerobios mesófilos; 1 mL en Petrifilm™ AC a partir de la dilución 10^{-1} . Incubar a 35°C por 48 horas
 - Alimento preparado
 - Alimento cárnico
 - Jugo
 - Postre

- Coliformes totales y *E. coli*: 1 mL en Petrifilm™ EC a partir de la dilución 10^{-1} . Incubar a 35°C por 24 horas
 - Alimento preparado
 - Alimento cárnico
 - Jugo
 - Postre
 - Ensalada

- *S. aureus*: 1 mL en Petrifilm™ Staph Express a partir de la dilución 10^{-1} . Incubar a 35°C por 24 horas
 - Alimento preparado
 - Alimento cárnico
 - Jugo
 - Postre

- Mohos y levaduras; 1 mL en Caja de Petri en profundidad con Agar YGC. Incubar a 25°C por 5 días
 - Jugo
 - Postre

❖ Muestreo a manipuladores; determinar la presencia de *E. coli*.

Se realiza un hisopado a ambos lados de las manos de las personas que se encuentren en el casino. Anotar la actividad que ellos estaban realizando, además de comportamientos como el lavado de manos y/o uso de guantes. Los hisopos se guardan en tubos con caldo BHI, se registran y se incuban a 35°C por 24 horas.

Pasadas las 24 horas, sembrar en agar Chromocoult, revisar la formación de colonias típicas de *E. coli* y reportar.

❖ **Muestreo a superficies**

Se realiza un hisopado, humedeciendo el hisopo con caldo BHI, a un área de 10cm * 10 cm, 10 veces de forma vertical, 10 veces horizontal y 10 veces diagonal. Guardar los hisopos en el tubo con el caldo BHI e incubar a 35°C por 24 horas, repicar en agar BHI, incubar a 35°C por 48 horas y reportar.

❖ **Siembra de aguas**

Se realiza muestreo de aguas en toda la planta, rotando los lugares, con el fin de obtener 10 muestras semanales. Éstas son sembradas así; 100ml en frasco Colilert y 1 ml en caja de Petri en profundidad con Agar PCA; el frasco se incuba a 35°C por 24 horas, la caja se incuba a 35°C por 48 horas y reportar si hay crecimiento microbiano.

En la **Figura 11** se presenta un ejemplo del frasco Colilert inoculado con muestra.



Figura 11 Frasco Colilert con el agua a analizar y el reactivo para evaluar la presencia de *E. coli*

9.1.3 Análisis especiales

❖ **Mulas**

Al ingresar una mula cargada de leche, se analiza la carga microbiana inicial de aerobios mesófilos. En un frasco productor, la encargada de recibo de leche, toma aproximadamente 35 mL de leche cruda y lo pone a disposición del laboratorio de microbiología. Se refrigera 4 °C hasta la siembra.

Metodología

Teniendo en cuenta que la leche cruda cuenta con una carga microbiana inicial demasiado alta, se realizan diluciones seriadas y se siembra en Petrifilm™ AC las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , el cual se incuba a 35°C por 48 horas, se cuenta las UFC/ml y se reporta.

❖ Enjuagues

Cada que se lava un equipo como el pasteurizador o alguna envasadora, los operarios toman una muestra del agua que se usa para enjuagar las soluciones limpiadoras, se refrigeran y se registran.

Metodología

Luego de registrar las muestras, se siembra por filtración por membrana y frascos Colilert, se humedece el Petrifilm™ AQHC una hora antes de la siembra. Pasada la hora, se depositan 100 mL en los frascos de filtración y el agua se hace pasar por la membrana de celulosa que posterior es depositada en el petrifilm hidratado. El petrifilm se incuba a 35°C por 48 horas. Otros 100 mL son agregados al frasco Colilert, se toma 1 ml para sembrar en Petrifilm™ YM, se añade el reactivo de Colilert y se incuba a 35°C por 24 horas. El Petrifilm™ YM se incuba a 25°C por 5 días. Pasado el tiempo de incubación, hacer el recuento y reportar.

En **la Figura 12** se presenta un ejemplo del Petrifilm™ AQHC con la membrana luego de la filtración

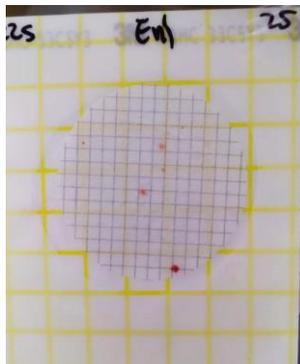


Figura 12 Petrifilm AQHC con membrana de filtración por membrana

❖ Envasado de crema de leche pasteurizada

El día que se va a empacar crema de leche pasteurizada en presentaciones de 5 y 10 litros, se debe tomar una muestra del empuje del pasteurizador, la salida del pasteurizador, el silo de mezcla que contiene la crema de leche cruda y muestras del producto terminado. Para realizar un seguimiento de la carga microbiana en el producto antes de pasteurizar, al pasteurizar, la primera crema a empacar y el

producto terminado. Al tener las muestras, sembrar en el menor tiempo posible. Para las muestras anteriormente mencionadas, se pesan 10 g y se diluyen en 90 mL de PEP.

Metodología

- Empuje

Para el análisis del empuje, a partir de la dilución 10^{-1} , sembrar 1 mL en Petrifilm™ AC, Petrifilm™ EC y caja de Petri en profundidad con Agar YGC. Incubar, hacer recuento y reportar.

- Salida del pasteurizador

A partir de la dilución 10^{-1} , sembrar 1 mL en Petrifilm™ AC, incubar, hacer recuento y reportar.

- Silo de mezcla

A partir de la dilución 10^{-1} , diluir y sembrar 1 mL en Petrifilm™ AC en las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , incubar, hacer recuento y reportar.

- Producto terminado

A partir de la dilución 10^{-1} , sembrar 1 mL en Petrifilm™ AC, Petrifilm™ EC y caja de Petri en profundidad con Agar YGC. El análisis de mohos y levaduras se realiza al inicio, mitad y final de las estibas a empacar. Como análisis adicional, cada semana se siembra 1 mL en Petrifilm™ Staph Express de un lote de diferente presentación. Incubar, hacer recuento y reportar.

❖ Seguimientos y vencimientos de crema de leche pasteurizada.

Luego de empacada la crema de leche pasteurizada en presentaciones de 5 y 10 litros, se realiza un análisis de seguimiento (17 días posterior al empaque) y vencimiento (21 días posterior al empaque), para tener un margen de crecimiento microbiano.

Metodología

- Seguimiento

En los días correspondientes, se toma una pequeña muestra de crema de leche empacada, se pesan 10 gramos y se diluyen en 90 mL de agua peptonada estéril. Se siembran en Petrifilm™ AC las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} , incubar e informar.

- Vencimiento

Un día después del vencimiento de la crema de leche, se obtiene una pequeña muestra en un frasco productor y se pesan 10 g que se diluyen en 90 mL de agua peptona estéril. Para el recuento de aerobios mesófilos se repite el procedimiento de los seguimientos, pero los análisis adicionales son; Coliformes totales y *E. coli*, en Petrifilm™ EC; *S. aureus*, en Petrifilm™ Staph Express; y mohos y levaduras en caja de Petri con agar YGC. Se incuba, se hace recuento y se reporta.

La muestra de crema de leche se lleva al laboratorio de fisicoquímica para análisis complementarios.

En la Figura 21 se presenta un ejemplo del Petrifilm™ AC, Petrifilm™ EC, Petrifilm™ Staph Express y caja con YGC inoculados con muestra.

❖ **Análisis de quesos**

Cada que empacan queso pera se hace un análisis de Coliformes totales y *E. coli*, *S. aureus* y mohos y levaduras.

Metodología

Se reciben 6 paquetes de 6 unidades de queso pera, 2 corresponden al inicio del envasado, 2 a la mitad y 2 al final. Un paquete de cada tiempo de envasado se guarda para poder enviarlo a la planta de San Pedro para análisis complementarios. De los paquetes sobrantes, se toman 3 unidades del paquete de inicio, 3 del paquete de la mitad y 3 del paquete del final. Una unidad de cada paquete se marca y se guarda para el análisis de vencimiento. Las demás unidades se registran en la base de datos de la planta para continuar con el procedimiento. Las 2 unidades restantes de cada paquete se agregan a 90 mL de PEP, formando un pool de 10 gramos, realizando así la primera dilución. Tomar 1 mL y sembrar en Petrifilm™ Staph Express, Petrifilm™ EC Y Petrifilm™ YM. Incubar, hacer recuento y reportar.

Los paquetes con las unidades sobrantes se guardan en refrigeración.

❖ **Vencimiento de quesos**

Las 3 unidades que fueron guardadas de los paquetes inicio, mitad y final se siembran de la misma manera que los quesos recibidos, un día después a la fecha de vencimiento, formando un pool de 10 gramos que se diluyen en 90 mL de PEP y se siembran en Petrifilm™ Staph Express, el Petrifilm™ EC y Petrifilm™ YM. Incubar, hacer recuento y reportar.

❖ Jugos

Luego de empacados los jugos, varias muestras del producto final son analizadas en el laboratorio, para determinar la presencia de aerobios mesófilos; coliformes totales y *E. coli*; y mohos y levaduras. La cantidad de NaOH 1N necesario para neutralizar el pH de los jugos ya está estandarizado.

Metodología

Tomar 1 mL de muestra de jugo y diluir 9 mL de PEP, añadir la cantidad necesaria de NaOH y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL y sembrar en Petrifilm™ AC, el Petrifilm™ EC y Petrifilm™ YM. Incubar, realizar recuento y reportar.

Anexos 2

Tabla del recuento microbiano obtenido en los medios de cultivo TSA y BHI de cada lote y referencia sembrado, indicando los días de incubación.

# DE MUESTRA	PSTN	REF	LOTE	TSA		BHI		DÍAS DE INCUBACIÓN
				#COLONIAS	RTO	#COLONIAS	RTO	
1	900ml	EUM	LOTE 1	120	1200	36	360	48 horas
2	900ml	EUM	LOTE 2	98	980	11	110	
3	900ml	EUM	LOTE 3	125	1250	45	450	48 horas
4	900ml	EUM	LOTE 4	136	1360	50	500	
5	900ml	EUM	LOTE 5	147	1470	23	230	
6	900ml	EUM	LOTE 6	169	1690	64	640	
7	900ml	EUM	LOTE 1	10	100	1	10	7 días
8	900ml	EUM	LOTE 2	22	220	0	<10	
9	900ml	EU ARA	LOTE 7	1634	16340	68	680	48 horas
10	900ml	EU ARA	LOTE 8	1247	12470	65	650	
11	1100ml	DLUF	LOTE 9	954	9540	22	220	
12	1100ml	DLUF	LOTE 10	987	9870	24	240	
13	900ml	EUM	LOTE 3	214	2140	89	890	6 días
14	900ml	EUM	LOTE 4	100	1000	41	410	
15	900ml	EUM	LOTE 5	7	70	1	10	
16	900ml	EUM	LOTE 6	210	2100	64	640	
17	900ml	EUM	LOTE 1	32	320	11	110	10 días
18	900ml	EUM	LOTE 2	21	210	13	130	
19	900ml	CLU	LOTE 12	1239	12390	134	1340	48 horas
20	900ml	CLU	LOTE 13	1245	12450	126	1260	
21	900ml	EUM	LOTE 14	1041	10410	98	980	
22	900ml	EUM	LOTE 15	986	9860	64	640	
23	900ml	EUM	LOTE 3	21	210	1	10	10 días
24	900ml	EUM	LOTE 4	23	230	0	<10	
25	900ml	EUM	LOTE 5	20	200	2	20	

26	900ml	EUM	LOTE 6	18	180	1	10	
27	900ml	EU ARA	LOTE 7	163	1630	67	670	6 días
28	900ml	EU ARA	LOTE 8	146	1460	52	520	
29	1100ml	DLUF	LOTE 9	125	1250	59	590	
30	1100ml	DLUF	LOTE 10	179	1790	54	540	
31	1100ml	EU	LOTE 11	12	120	5	50	48 horas
32	180ml	CLU	LOTE 16	5	50	1	10	
33	900ml	EUM	LOTE 1	23	230	1	10	17 días
34	900ml	EUM	LOTE 2	29	290	9	90	
35	900ml	EU ARA	LOTE 7	20	200	5	50	11 días
36	900ml	EU ARA	LOTE 8	12	120	4	40	
37	1100ml	DLUF	LOTE 9	8	80	1	10	
38	1100ml	DLUF	LOTE 10	6	60	1	10	
39	900ml	CLU	LOTE 12	268	2680	64	640	8 días
40	900ml	CLU	LOTE 13	462	4620	98	980	
41	900ml	EUM	LOTE 14	236	2360	45	450	
42	900ml	EUM	LOTE 15	126	1260	36	360	
43	900ml	EUM	LOTE 3	24	240	8	80	17 días
44	900ml	EUM	LOTE 4	16	160	4	40	
45	900ml	EUM	LOTE 5	17	170	5	50	
46	900ml	EUM	LOTE 6	11	110	1	10	
47	1100ml	EU	LOTE 11	687	6870	96	960	6 días
48	180ml	CLU	LOTE 16	740	7400	102	1020	
49	200ml	AU CAJA	LOTE 17	1264	12640	126	1260	48 horas
50	200ml	AU	LOTE 18	1042	10420	132	1320	
51	900ml	CLU	LOTE 12	364	3640	97	970	11 días
52	900ml	CLU	LOTE 13	124	1240	54	540	

53	900ml	EUM	LOTE 14	169	1690	62	620	
54	900ml	EUM	LOTE 15	178	1780	70	700	
55	900ml	EU ARA	LOTE 7	10	100	1	10	15 días
56	900ml	EU ARA	LOTE 8	11	110	2	20	
57	1100ml	DLUF	LOTE 9	13	130	0	<10	
58	1100ml	DLUF	LOTE 10	9	90	0	<10	
59	1100ml	EU	LOTE 11	397	3970	36	360	10 días
60	180ml	CLU	LOTE 16	425	4250	21	210	48 horas
61	900ml	CLU	LOTE 19	1725	17250	123	1230	
62	200ml	LSUF	LOTE 20	1964	19640	164	1640	48 horas
63	1100ml	EU	LOTE 21	1036	10360	96	960	
64	900ml	DLU	LOTE 22	964	9640	52	520	15 días
65	900ml	CLU	LOTE 12	14	140	1	10	
66	900ml	CLU	LOTE 13	16	160	1	10	
67	900ml	EUM	LOTE 14	9	90	1	10	
68	900ml	EUM	LOTE 15	12	120	1	10	29 días
69	900ml	EUM	LOTE 1	1	10	0	<10	
70	900ml	EUM	LOTE 2	2	20	0	<10	14 días
71	1100ml	EU	LOTE 11	169	1690	25	250	
72	180ml	CLU	LOTE 16	136	1360	32	320	6 días
73	200ml	AU CAJA	LOTE 17	20	200	9	90	
74	200ml	AU	LOTE 18	16	160	6	60	6 días
75	900ml	CLU	LOTE 19	11	110	1	10	
76	200ml	LSUF	LOTE 20	14	140	2	20	10 días
77	200ml	AU CAJA	LOTE 17	23	230	1	10	
78	200ml	AU	LOTE 18	27	270	1	10	

79	1100ml	EU	LOTE 21	32	320	0	<10	6 días
80	900ml	DLU	LOTE 22	34	340	1	10	
81	900ml	EU	LOTE 23	1687	16870	896	8960	48 horas
82	900ml	EUM	LOTE 3	1	10	0	<10	30 días
83	900ml	EUM	LOTE 4	3	30	1	10	
84	900ml	EUM	LOTE 5	6	60	1	10	
85	900ml	EUM	LOTE 6	1	10	0	<10	
86	900ml	CLU	LOTE 19	124	1240	54	540	10 días
87	200ml	LSUF	LOTE 20	136	1360	62	620	
88	1100ml	EU	LOTE 21	102	1020	36	360	10 días
89	900ml	DLU	LOTE 22	120	1200	49	490	
90	200ml	AU CAJA	LOTE 17	16	160	4	40	14 días
91	200ml	AU	LOTE 18	14	140	6	60	
92	900ml	EU ARA	LOTE 7	1	10	0	<10	32 días
93	900ml	EU ARA	LOTE 8	3	30	0	<10	
94	1100ml	DLUF	LOTE 9	1	10	0	<10	
95	1100ml	DLUF	LOTE 10	6	60	0	<10	
96	900ml	EU	LOTE 23	634	6340	148	1480	6 días
97	900ml	CLU	LOTE 12	1	10	1	10	30 días
98	900ml	CLU	LOTE 13	1	10	1	10	
99	900ml	EUM	LOTE 14	4	40	0	<10	
100	900ml	EUM	LOTE 15	0	<10	0	<10	
101	900ml	CLU	LOTE 19	64	640	12	120	15 días
102	200ml	LSUF	LOTE 20	63	630	11	110	