

**Control de la calidad microbiológica de la leche en la planta de lácteos Freskaleche
S.A.**

Ibeth Yuliana Gutiérrez Vega

Microbiología

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona

Nota del autor

Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona –Pamplona, Norte de Santander.

Trabajo como requisito para optar por el Título de Microbiólogo

Este trabajo fue realizado en Freskaleche S.A. Corrección y asesoría de la profesora Ángela Maritza Cajiao Pedraza de la facultad de Ciencias Básicas del programa de Microbiología.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia a mis padres por la vida, enseñarme a vivir de la mejor manera, por su confianza, valores y principios que me han inculcado. Por ser mi motor, por su esfuerzo, sacrificio y sobre todo siempre creer en mí.

A mi tía Claudia Gutierrez, a quien aprecio con tanto amor por ayudarme durante estos años, gracias por estar dispuesta, por brindarme un segundo hogar.

A mis amigos por los buenos momentos, en especial a Natalia Sandoval porque hemos aprendido y aprendemos continuamente la una de la otra, por su apoyo y cariño durante estos años, por ser mi persona favorita, hoy materializamos un sueño juntas.

RESUMEN

El presente trabajo aborda los análisis para evaluar la calidad microbiológica de leche cruda, termizada y producto final de la empresa de lácteos FRESKALECHE S.A., durante un periodo comprendido desde diciembre del 2021 a abril 2022, para lograr lo anterior fue necesario realizar procedimiento estándar para la leche cruda como: recuentos de aerobios mesófilos y psicrófilos; en leche procesada se realizaron recuentos de enterobacterias y psicrófilos. Adicionalmente, se realizaron análisis de esporas mesófilas termófilas y HHRS (highly heat-resistant spores) a las muestras de leche cruda y procesada, se investigó la presencia de patógenos (*Salmonella* spp. y *Listeria* spp.) en superficies, se evaluó el ambiente y manipuladores para dar cumplimiento a las normas internas de calidad al control de calidad de la empresa.

Durante la línea de proceso se verificó la efectividad de la ultra pasteurización en la leche. De igual manera, la evaluación de ambientes, manipuladores y patógenos arrojaron valores aceptables para los respectivos recuentos, indicando buenas prácticas de manufactura durante el procesamiento de leche UHT.

PALABRAS CLAVES: Leche cruda, leche termizada, UHT, calidad microbiológica.

ABSTRACT

The present work deals with the analyzes to evaluate the microbiological quality of raw, thermized milk and final product of the dairy company FRESKALECHE S.A., during a period from December 2021 to April 2022, to achieve the above it was necessary to carry out a standard procedure for the raw milk as: mesophilic and psychophilic aerobic counts; Enterobacteriaceae and psychophiles were counted in processed milk. Additionally, analyzes of thermophilic mesophilic spores and HHRS (highly heat-resistant spores) were performed on raw and processed milk samples, the presence of pathogens (*Salmonella* spp. and *Listeria* spp.) on surfaces was investigated, the environment and handlers to comply with internal quality standards for the company's quality control.

During the process line, the effectiveness of ultra-pasteurization in milk was verified. Similarly, the evaluation of environments, handlers and pathogens yielded acceptable values for the respective counts, indicating good manufacturing practices during the processing of UHT milk.

KEY WORDS: Raw milk, thermized milk, UHT, microbiological quality.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	11
1. OBJETIVOS.....	13
1.1. GENERAL	13
1.2. ESPECIFICOS	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. MARCO REFERENCIAL	15
3.1. FUNDAMENTOS CONCEPTUALES	15
3.1.1. Agentes bacterianos de la leche cruda.....	16
3.1.2. Epidemiología.....	17
3.1.3. Procesos industriales de la leche	18
3.1.4. Garantía de la calidad	21
3.2. Marco legal	24
4. METODOLOGÍA	26
4.1. Análisis de leche cruda	26
4.2. Análisis de leche procesada	26
4.3. Análisis de esporas de 80° y 90° C.....	26
4.4. Análisis de HHRS en leche cruda, leche de proceso	27
4.5. Análisis de leche UHT	27
4.5.1. Análisis de seguimiento 48 horas.	27
4.5.2. Análisis de esterilidad comercial.....	28
4.6. Otros análisis de la línea de producción	28
4.6.1. Análisis de agua potable	28
4.6.2. Filtración por membrana	29
4.6.3. Análisis patógenos <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> spp	29
4.6.4. Análisis de manipuladores.....	30
4.6.5. Análisis de ambientes	31
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1. Análisis de leche cruda	33

6.1.1 Microorganismos psicrófilos.....	35
6.2. Análisis de leche procesada	37
6.3. Análisis de esporas de 80° y 90° C.....	41
6.3.1. Leche cruda y proceso	41
6.4. Análisis de HHRS en leche cruda, leche de proceso	43
6.4.1. Leche de cruda.....	43
6.4.2. Leche de proceso	45
6.5 Análisis de leche UHT	46
6.5.1 Análisis de seguimiento 48 horas	46
6.5.2 Análisis de esterilidad comercial.....	47
6.6 Otros análisis de la línea de producción	49
6.6.1 Análisis de aguas, patógenos, manipuladores y ambientes	49
7. CONCLUSIONES	51
8. RECOMENDACIONES	52
9. GLOSARIO.....	53
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	58

TABLA DE TABLAS

Tabla 1. Brotes reportados al SIVIGILA asociados al consumo de leche periodo 2008-2010.	18
Tabla 2. Cronograma de actividades primer semestre 2022.....	32
Tabla 3. Promedio de los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos durante los meses de diciembre a abril	33
Tabla 4. Promedio de los recuentos de microorganismos psicrófilos obtenidos durante los meses de diciembre a abril	35
Tabla 5. Promedio de los recuentos de enterobacterias obtenidos durante los meses de diciembre a abril.	38
Tabla 6. Promedio de los recuentos de microorganismos psicrófilos obtenidos durante los meses de diciembre a abril en leche de proceso	39
Tabla 7. Porcentaje de presencia de HHRS en las muestras de leche cruda durante los meses Diciembre-abril.....	43
Tabla 8. Porcentaje de presencia de HHRS en las muestras de leche proceso durante los meses Diciembre-abril.....	45
Tabla 9. Porcentaje de presencia de HHRS en leche UHT	46
Tabla 10. Porcentaje mensuales de esterilidad comercial en aerobiosis y anaerobiosis.	48
Tabla 11. Porcentaje mensuales ausencias de otros análisis de la línea de producción...52	

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción del proceso de la leche UHT.....	20
Figura 2. Comportamiento microbiano de los respectivos tanques/proveedores durante los meses de enero a abril.....	34
Figura 3. Comportamiento microbiano de microorganismos psicrófilos de los respectivos tanques/proveedores durante los meses de enero a abril.	36
Figura 4. Comportamiento microbiano de enterobacterias de los respectivos tanques durante los meses de enero a abril.	38
Figura 5. Comportamiento microbiano de microorganismos psicrófilos de los respectivos tanques de leche de proceso durante los meses de enero a abril.	39
Figura 6. Porcentaje de presencia de HHRS en leche cruda del tanque/proveedor durante los meses diciembre-abril.....	44
Figura 7. Porcentaje de presencia de HHRS en leche proceso de los tanques durante los meses diciembre-abril.....	45
Figura 8. Porcentaje de presencia de HHRS en leche UHT	47

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1. Recuento de aerobios mesófilos.....	58
Anexo 2. Recuento de enterobacterias	58
Anexo 3. Recuento de psicrófilos en leche cruda.....	59
Anexo 4. Recuento de psicrófilos en leche proceso	59

INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se evidencia toda la línea de procesamiento de la leche que llega a la planta Freskaleche hasta su producto final UHT y sus respectivos controles microbiológicos.

La leche es una secreción natural de las glándulas mamarias del ganado bovino, obtenida por el ordeño diario de los animales. Proporciona los nutrientes esenciales a la alimentación, la composición de la leche puede verse afectada por factores tanto internos como externos que afectan significativamente la calidad del producto. (Agudelo & Bedoya, 2005)

La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura asegura:

La leche es una fuente de energía y proporciona los nutrientes esenciales, además atribuye significativamente con la ingestión necesaria de nutrientes como calcio, magnesio, selenio y vitamina B12. Los productos lácteos son ricos en nutrientes, la leche juega un papel importante en poblaciones con bajo nivel de consumo de grasas y otros alimentos de origen animal. (FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura , 2022)

Sin embargo, la leche y los productos lácteos también pueden provocar enfermedades.

En este sentido, el producto final se relaciona en gran medida con las características de la leche cruda, resultando en una desnaturalización de ingredientes que alteran la calidad

del producto final en relación a su vida útil, como algunos microorganismos que pueden causar enfermedades en los humanos.

La leche es un medio ideal para el crecimiento de bacterias por ello los problemas de inocuidad en el sector lechero. Microorganismo como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Brucella* spp. Pueden estar presentes en la leche (FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentacion y la agricultura , 2022)

De acuerdo con FEDEGAN en comparación al año 2019 que se produjeron 3.170 millones de litros para el año 2020 se produjeron 3.347 millones de litros. Además, se evidencio un incremento en el consumo de leche superior al 30%, llegando a 156 litros/persona-año el consumo de leche, así como el consumo de productos lácteos. (FEDEGAN, 2021)

1. OBJETIVOS

1.1.GENERAL

Evaluar la calidad microbiológica de la leche durante la cadena de producción en la planta de lácteos FRESKALECHE S.A. y los diferentes factores que intervienen en ella.

1.2.ESPECIFICOS

- Analizar la calidad microbiológica de la leche cruda, termizada y producto final en la planta de lácteos FRESKALECHE S.A.
- Verificar el control de calidad durante el proceso de ultra pasteurización, ambientes de trabajo, higiene de manipuladores, procesos de limpieza de equipos, materiales y áreas.

2. JUSTIFICACIÓN

El sector lechero en Colombia es sumamente importante para la economía, ya que en Colombia existen muchas empresas especializadas en la producción de leche y productos lácteos, para llegar a miles de consumidores con productos que cumplan con la calidad e inocuidad, es importante incluir elementos que van desde buenas prácticas de ordeño y manejo hasta almacenamiento, transporte, distribución y producción de productos lácteos.

La carga microbiana del producto puede estar determinado por la carga inicial presente en la leche cruda como aerobios mesófilos, psicrófilos y enterobacterias; algunos microorganismos producen cambios que son deseables, otros microorganismos contaminan produciendo alteraciones y afectando la calidad de la leche pueden provocar enfermedades al consumidor.

Además, los puntos de la línea de producción que son un foco de atención durante la producción adverso a ello existen factores como métodos de desinfección, método de lavado de los equipos, insumos utilizados, empaques, buenas de manipulación, operarios, así como el almacenamiento del producto final. Ya que, esto influye directamente en la calidad de la leche. La empresa FRESKALECHE S.A. cumple con los parámetros especificados en el decreto 616 de 2006 para dar garantía a los requisitos legales al producto final del consumidor.

Razón por la cual se da continuidad al proceso de calidad microbiológica en la planta de lácteos FRESKALECHE S.A.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. FUNDAMENTOS CONCEPTUALES

La leche es una emulsión fascinante que tiene distintas definiciones según la consideremos desde un punto de vista bromatológico, biológico o fisicoquímico. El código alimentario establece que se “entiende por leche sin calificativo alguno al producto obtenido por el ordeño total e interrumpido en condiciones de higiene de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación”. La leche se define desde un punto fisicoquímico como una sustancia coloidal que lo componen sustancias químicas como proteínas, grasa, azúcares, vitaminas y minerales. El agua es uno de los componentes más abundantes presente en la leche. (Gigli, 2017)

(Porporatto & Felipe, 2010) afirman que:

La producción y distribución de productos lácteos en el marco de un complejo productivo con una larga trayectoria a nivel nacional y mundial. A su vez, la producción primaria de leche dentro de la producción agropecuaria llegó a alcanzar el quinto lugar procedida por la soja, carne, trigo y maíz alcanzando un 8% de la misma. La leche como los productos lácteos aportan un gran valor nutritivo a la dieta humana que son indispensables durante ciertas etapas de la vida. Para tener productos lácteos de alta calidad es indispensable que esta sea de calidad antes de ser procesada.

La calidad de la leche implica los componentes fisicoquímicos y los higiénico-sanitarios, en los cuales encontramos entre otros los recuentos de células somáticas, bacterias y residuos contaminantes.

3.1.1. Agentes bacterianos de la leche cruda

Debido a las condiciones higiénicas y de sanidad en la obtención de leche juega un papel importante sobre la calidad microbiológica de la leche, cuanto más cuidadosamente se realice el ordeño menor será el recuento microbiano. Microorganismos oportunistas o no como *Pseudomonas* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp, *Bacillus* spp. y *Pasteurella* spp. Son hallados constantemente.

La contaminación por parte de estos microorganismos casi siempre se debe a manejo inadecuados durante el ordeño, otros microorganismos menos comunes como levaduras del género *Candida* como otros hongos que también pueden producir infecciones. La calidad microbiológica también varía de acuerdo con su manejo y transporte, si no se cuenta con un medio de enfriamiento una vez la leche es obtenida esto incurre directamente durante el incumplimiento de los requisitos de calidad para que la leche sea apta para el consumo. La presencia de bacterias mesófilas presenta un riesgo alto de contaminación de leche para patógenos. Algunos microorganismos dominantes incluyen: a) *bacterias lácticas* b) *Pseudomonas* spp, c) *Micrococcaceae* y d) levaduras. Otros microorganismos presentes en la leche cruda son *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, *Listeria* spp, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp, *Alcaligenes* spp, *Flavobacterium* spp, *Aeromonas* spp, *Arthrobacter* spp, *Corynebacterium* spp, *Brevibacterium* spp, *Propionibacterium* spp. (Porporatto & Felipe, 2010)

La leche obtenida de bovinos sanos y en condiciones asépticas es inusual que la leche sea totalmente estéril, ya que debido a la anatomía de la ubre se facilita la penetración de microorganismos en comparación para otras especies productoras de leche como ovejas y cabras. (Juárez, 2009)

Uno de los microorganismos hallados con mayor frecuencia en las glándulas mamarias de las vacas es *Streptococcus* spp. (Celis & Juárez, 2009) aseguran, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* son encontrados en las glándulas mamarias infectadas como agentes microbianos.

También, aseguran en su investigación que

Debido a las condiciones de ordeño los microorganismos que producen mastitis aumentan y esto produce una pérdida económica debido a la baja producción de leche además cambia la composición de esta que resulta en que se vuelve difícil coagular y desuerar la leche, esto puede ser corregido durante la pasteurización.

(Celis & Juárez, 2009)

3.1.2. Epidemiología

El consumo de leche cruda se asocia a brotes por intoxicación e infección alimentaria. Entre los años 1990-2006, hubo 83 casos de los cuales 37 brotes de los cuales su causa fue por leche pasteurizada y 46 de ellos por leche no pasteurizada, los microorganismos más frecuentes son: *Campylobacter* spp. *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Los brotes principalmente ocurrieron en hogares y granjas, la CDC reportó durante 1973-1992, 46 brotes por el consumo de leche cruda (1733 casos) por los siguientes microorganismos *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp. La FDA a partir de 1987 prohibió la venta de leche cruda para así reducir el número de brotes asociados a la leche cruda.

El sistema nacional de vigilancia en salud pública del 2008 a 2010 reportó 2 brotes asociados al consumo de leche (Tabla 1). (Instituto Nacional de Salud, 2011)

Tabla 1. Brotes reportados al SIVIGILA asociados al consumo de leche periodo 2008-2010.

Año	Lugar	Alimento implicado	Número de casos	Microorganismo asociado
2009	Sincelejo (Sucre)	Leche	3	<i>E. coli</i>
2009	Sucre (Sucre)	Leche	3	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo

Fuente: SIVIGILA, 2010 (108)

En Colombia no existe un monitoreo sobre ETAS para leche cruda, pero se reportó la circulación de varios patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp y *Bacillus cereus* que se reportó en leche cruda, pasteurizada y derivados lácteos en restaurantes escolares para un estudio en el 2017. (Forero, 2017)

Para Colombia, el decreto 616 del 2006 tiene como objetivo establecer los requerimientos que se debe cumplir la leche de animales bovinos destinada al consumo humano, para proteger la seguridad, salud y vida del consumidor. Con un límite máximo 700.000 UFC/mL, permitido en la normativa vigente.

3.1.3. Procesos industriales de la leche

Los procesos térmicos para extender la vida útil de la leche tienen la función de obtener un producto saludable y aumentar su vida útil.

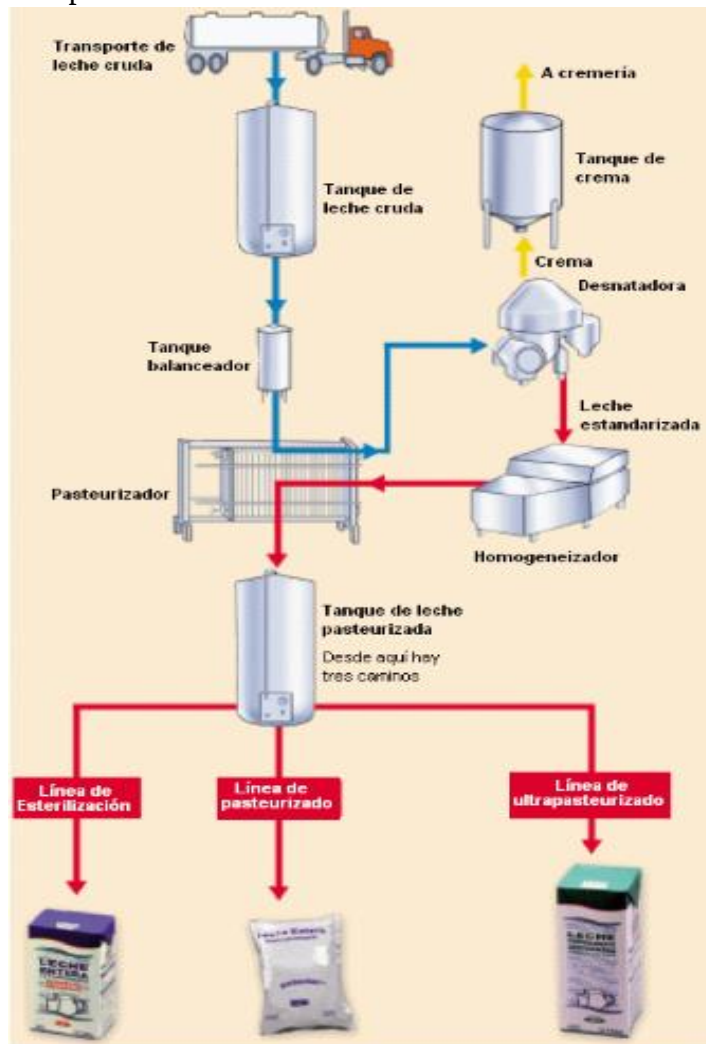
En Colombia se distribuyen leches pasteurizadas conforme con su contenido de grasa y su procesamiento.

En el Capítulo quinto, artículo 15 del Decreto 616 de 2006, establece la clasificación de la leche el proceso de producción.

Esta leche puede ser pasteurizada, ultra pasteurizadas, ultra alta temperatura (UAT), leche larga vida, esterilizada, en polvo y deslactosada. La leche UHT, leche larga vida,

debe cumplir con los siguientes requisitos microbiológicos: en la prueba de esterilidad comercial, “Después 10 días de incubación no debe presentar crecimiento microbiano a 55 °C y 35 °C” (Norma Técnica Colombiana [NTC] 4433, 2015)

Figura 1. Descripción del proceso de la leche UHT.



Nota. (Cabrejos, 2015)

El “Crecimiento aerobio y anaerobio positivo a 35 °C” para el resultado de la prueba de esterilidad comercial es una de las causas del no cumplimiento en las leches UHT, la presencia de esporas resistentes a la ultra pasteurización (HHRs) del género *Bacillus*. Estos problemas de recontaminación después del tratamiento de pasteurización son causas de una no esterilidad satisfactoria. (Castañeda & Carrasquilla, 2015).

3.1.4. Garantía de la calidad

La leche es muy susceptible a la degradación microbiana que afectan su calidad, además las enfermedades que afectan al ganado afectan directamente sobre la calidad e inocuidad de la leche. Como consecuencia, la leche pasteurizada puede verse afectada por la exposición a ambientes o por equipos contaminados generando un peligro potencial si no se toman las medidas de higiene en las distintas etapas: ordeño, manejo, traslado, procesamiento y producción, limpieza de las áreas de trabajo, etc. para obtener productos lácteos de calidad. La adopción de estas medidas previene posibles contaminaciones minimizando o eliminando riesgos, asegurando que los productos sean seguros para los consumidores. (FAO, 2011)

En este sentido, (Magariños, 2000) asegura:

Desde el ordeño hasta el producto terminado, estas cualidades están sujetas a una gran cantidad de riesgos que comprometen la calidad original. Los riesgos causados por microorganismos van sujetos a cambios en los componentes del producto final. contribuyendo negativamente a la calidad higiénica y nutricional de los productos y por tanto conspiran contra la salud pública y la economía del país.

El desafío del sector lechero no solo es basa en producir cierta cantidad de leche si no que esta sea de calidad y dentro de ella se abarcan aspectos fundamentales como la higiene microbiológica, química y estética, tres aspectos que unificados mejoran favorablemente el sector lechero. (González, 2010)

Por otra parte, el agua dentro de la industria láctea es muy empleada para procedimientos de limpieza tanto de equipos, materiales y áreas de trabajo, el consumo de

agua potable debe cumplir con la resolución 2115 de 2007. Se realiza por medio de filtración de membrana el cual se atrapan en una membrana con un poro de tamaño 0.45um microorganismos mayores, por presión diferencial por medio de una bomba eléctrica haciendo que el agua se filtre. “Los contaminantes de tamaño menor que el poro atraviesan la membrana o se quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego está es llevada a un medio de enriquecimiento selectivo” (ROA, 2007)

El riesgo de contaminación por parte de los manipuladores en la zona de producción de UHT es una de las formas más simples y comunes de contaminación de los alimentos. “Los contaminantes llegan a los alimentos a través de los manipuladores. Este tipo de contaminación posiblemente genere una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA)” (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2017) Según, lo anterior, las ETA tienden a tener en común los siguientes síntomas vómito, diarrea y náuseas.

Durante el año 2021 se presentaron 13 brotes de ETA en total 117 casos asociados, por ello la secretaria Distrital de Salud de Bogotá (2009) citado por (Zúñiga & Caro, 2017) señalan que

La incidencia real de las tox infecciones no es precisa. Los principales lugares identificados como foco de ETA son establecimientos o lugares en donde se concentra gran cantidad de personas a quienes se les suministra algún tipo de alimentación (almuerzos, comidas, refrigerios); generalmente, al indagar sobre el menú se encuentran implicados alimentos de alto riesgo (cárnicos o lácteos) cuya manipulación y conservación son muy importantes para evitar que se deterioren y causen daño a la salud.

Las bacterias patógenas presentes en leche provienen de fuentes exógenas y endógenas, así mismo desarrollan actividades como fermentaciones lácteas que potencializan dichos procesos fermentativos o pueden deteriorar los alimentos, así como los lactobacillus y las bifidobacterias que causan enfermedades que alertan la salud pública de los alimentos. (Quigley, Sullivan, Stanton, & Beresford, 2013).

El género *Listeria* spp. Es una de las principales bacterias patógenas encontradas en leche cruda dentro de ella presentan dos especies comunes *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*. La primera es una bacteria que su presencia es un problema de salud pública debido a su sintomatología en diferentes grupos de riesgo y a sus grandes habilidades para crecer en condiciones extremas, además que su rango de contaminación dentro de los alimentos es amplio dentro de los cuales se encuentra la leche cruda y sus derivados listos para el consumo, así mismo la contaminación también se genera por bacterias del género *Salmonella* spp. (Aguilera, Urbano, & Jaimes, 2014).

Durante la cadena de producción, desde la finca es necesario cuidar todos los factores, ya que si no se les da un adecuado manejo van a provocar deterioro en el producto final causando pérdidas, debe darse un manejo adecuado desde su obtención hasta en consumo ya que es un alimento altamente perecedero, para ello tecnologías que se aplican dentro de la industria alimentaria se mantengan en constante monitoreo para que se asegure la limpieza y se de seguridad alimentaria de los productos.

El Sistema de Detección Molecular (MDS) amplifica rápidamente las secuencias únicas de ácido nucleico de ADN con alta especificidad y sensibilidad. MDS utiliza una combinación de dos tecnologías; la amplificación isotérmica y bioluminiscencia, donde las

secuencias de ADN se amplifican rápidamente con alta especificidad y sensibilidad (Yáñez, 2015).

Los primers utilizados son más específicos y toleran en mayor instancia los inhibidores. Se utiliza ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, es una reacción isotérmica por lo que todo sucede continuamente a la misma temperatura, con alta eficiencia porque el ADN se amplifica 1010 veces en 75 minutos. (Rapidmicrobiology, 2019).

Sin embargo, es necesario que se realice una validación del método para asegurar el uso de sus fines. Obteniendo una afirmación sobre el cumplimiento o incumplimiento del uso hay que destacar que tiene una alta efectividad sobre los procesos (Quesada, 2019).

3.2. Marco legal

Dentro de la investigación llevada a cabo, es importante mencionar que existen normas constituyentes y legítimas que rigen el manejo y comercialización de la leche, así como requisitos sanitarios que garanticen la salud del ser humano.

MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL DECRETO NUMERO 616 DE 2006 28
FEB 2006

Fue publicado el 28 de febrero de 2006, donde se establecieron los requisitos que debe cumplir la leche de consumo humano. Como se mencionó, se aplica en la leche de vaca, búfala y cabra; en todos los establecimientos que acopian, procesa, envasa, transportan, comercializa y expenden leche, se contemplan las actividades de inspección, vigilancia y control para el expendido de leche. (DECRETO 616, 2006)

NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4433

Se describe los métodos empleados para evaluar la esterilidad comercial en alimentos, los métodos para determinar si los alimentos envasados cumplen con los requisitos de esterilidad comercial, el tratamiento térmico aplicado solo o combinado para eliminar patógenos u otros microorganismos ha sido suficiente para que se mantenga viable durante su distribución y almacenamiento. (RESOLUCION 4433, 2015)

RESOLUCIÓN NÚMERO 2115 DE 2007

Se indican las características básicas, herramientas y frecuencias de los sistemas de monitoreo y control de la calidad del agua para uso humano, los análisis microbiológicos que se realizan para evaluar la presencia o ausencia de microorganismos. (RESOLUCION 2115, 2007)

4. METODOLOGÍA

Las metodologías presentadas son realizadas según procedimientos y normas internas establecidos por la empresa.

4.1. Análisis de leche cruda

Cada muestra de la leche procedentes de los diferentes sitios de acopio y de los silos de almacenamiento que llegan a la planta de Freskaleche se realizaron muestreos y para ello se tomaron una muestra de aproximadamente 40 ml para el análisis microbiológico. Una vez en el laboratorio, se registraron las muestras y se procedió a realizar diluciones hasta 10^{-5} , se tomó 1ml de la muestra y se sembró en petrifilm AC (petrifilm de aerobios mesófilos), se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. De la dilución 10^{-1} : se siembra 1ml en petrifilm AC, se incubaron a refrigeración 4°C por 7 días para psicrófilos.

4.2. Análisis de leche procesada

La leche procedente del tratamiento de termización, se tomaron de los silos de almacenamiento 40 ml de muestra; posteriormente, en el laboratorio de microbiología, se realizó una dilución hasta 10^{-1} en 90 ml agua peptona estéril; de esta dilución se sembró 1 ml en petrifilm EB (Enterobacterias), se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, directamente de la muestra 10^{-0} se toma 1 ml en petrifilm AC, se incubaron a refrigeración 4°C por 7 días para psicrófilos.

4.3. Análisis de esporas de 80° y 90°C

Las muestras de leche cruda y leche procesada respectivamente se tomó 20 ml y se depositaron en 2 tubos de ensayo, se llevaron a calentamiento hasta alcanzar la temperatura

de 80 grados, se mantuvieron en esta temperatura por 10 minutos, enseguida, se realizó un choque térmico con hielo, los tubos se agitaron en un vortex y se sembró 1 ml en profundidad; se agregó agar CASO. Igualmente, para las esporas de 90 grados.

4.4. Análisis de HHRS en leche cruda, leche de proceso

Previamente de cada muestra de leche, se muestrean 10 ml y se agregan a un tubo de ensayo cada una donde se llevaron a la autoclave una temperatura de 121°C por 3 minutos, posteriormente, se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 días; después, se homogenizaron la muestra en vortex y se realizaron la siembra por superficie 0,1 ml en la caja de Petri con BHI, se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Las cajas mostraron crecimiento macroscópico característico de *Bacillus sporothermodurans*.

4.5. Análisis de leche UHT

4.5.1. Análisis de seguimiento 48 horas.

En la producción de cada uno de los productos, al pasar 48 horas, se lleva a un cuarto de incubación a $35^\circ \pm 1^\circ \text{C}$, posteriormente una vez en el laboratorio de microbiología se organizan las muestras ya sea LVS A (Leche larga vida semidescremada marca A), LVS F (Leche larga vida semidescremada marca F), LVE A (Leche larga vida entera marca A) LVE F (Leche larga vida entera marca F) DESL A (Leche deslactosada marca A) DESL F (Leche deslactosada marca F) CREMA A (Crema de leche marca A) , AVENA F (Avena marca A). De acuerdo con el inicio de producción (IP), final de producción (FP), parada de producción (PP), reinicio de producción (RIP), boquilla de la envasadora y hora se registraron. Una vez registradas en el sistema se procedió a desinfectar las bolsas, se tomaron 1 ml. Se sembró en profundidad en cajas de Petri respectivamente de cada bolsa y se sirvieron con agar SPC adicionando TTC.

4.5.2. Análisis de esterilidad comercial

Se tomaron dos bolsas de la misma presentación, se llevaron las muestras a incubación a 35° C y 55° C durante 10 días. Las bolsas se dejaron atemperar, se tomó pH de las muestras en cada temperatura y de cada muestra se sembró 1 ml en 8 tubos con 10ml de caldo BHI; de estos, cuatro se incubaron en condiciones de anaerobiosis a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas y cuatro tubos en aerobios $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, este mismo procedimiento se realizó para las muestras que se incubaron a $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. Pasado este tiempo, se tomó de la muestra 0.1 ml de cada tubo, y se sembró en superficie (0,1 ml) en agar BHI se incubaron a 35° C y 55° C por 48 horas.

4.6. Otros análisis de la línea de producción

4.6.1. Análisis de agua potable

La planta de tratamiento de agua potable con la que cuenta la empresa; allí el personal encargado lleva las muestras al laboratorio de microbiología donde se realizaron análisis de los filtros de agua, enjuagues, carrotanques, bancos de hielo y al baño serológico. Se sembró 1ml de la muestra en petrifilm EB y AC se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para Enterobacterias y 48 horas para Aerobios mesófilos.

La siembra para agua de lavadero se realizó en Fluorocult de 5ml, se sembró 1 ml de la muestra de agua, estas son recogidas en el lavadero de los carrotanques de las rutas de leches.

4.6.2. Filtración por membrana

Análisis de Aerobios mesófilos, Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*

El equipo de filtración esta previamente esterilizado, los filtros de membrana se colocaron sobre la superficie del filtro. Continuamente, se ajustó el embudo y se depositaron 100ml de muestra, se encendió la bomba de filtración, cuando la muestra bajo completamente por el filtro con ayuda de pinzas estériles se retiró y se colocó en el medio de cultivo SPC con TTC para el recuento de aerobios mesófilos, en petrifilm de EB previamente rehidratado y en el medio de cultivo Cetrimide, se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 y 48 horas respectivamente. El medio de cultivo Cetrimide se incubo a 42°C por 48 horas.

4.6.3. Análisis patógenos *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*

Este procedimiento se llevó a cabo para la detección de patógenos en todas las áreas de la planta, equipos, superficies y todo lo que tenga contacto directo entre los colaboradores y el producto terminado; la detección de patógenos se hace por bioluminiscencia. El muestreo se realizó simultáneamente tanto para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*. Por medio de un frotis sobre las superficies evaluadas con las esponjas con mango 3M con solución amortiguadora neutralizante. Las muestras se llevaron al laboratorio y se separaron tanto para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*, previamente los medios de cultivo que se emplean se habían incubado a la temperatura correspondiente.

Para *Listeria monocytogenes* se adicionaron 100 ml de caldo base Demi-Fraser que contiene 1 ml de suplemento para *Listeria* y se incubo a 42°C por 26 horas. En el análisis de *Salmonella* spp se adicionaron 100 ml de agua peptona, se incubo a 35 °C por 26 horas.

Después, se usaron para cada microorganismo el kit de detección de patógenos, en el que se adicionaron a los tubos con solución de lisis, 20 µl de la muestra y se llevaron a la plancha de calentamiento para subir la temperatura a $100 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos; enseguida, se baja la temperatura en la plancha de enfriamiento a 25 °C durante 5 minutos. Se tomaron 20µl de cada tubo de lisis con la ayuda de una pipeta multicanal a tubos que contenían un pellet con 6 primers para unirse específicamente al ADN de cada microorganismo para su amplificación y detección. En el equipo de detección molecular (MDS) se configuro la corrida y se colocaron las muestras ya listas para su análisis.

4.6.4. Análisis de manipuladores

El análisis a los manipuladores se realizó según cronograma y este se debe cumplir mensualmente para poder realizarse a todo el personal de la empresa en sus diferentes turnos, análisis de enterobacterias; se llevó a cabo por contacto directo en petrifilm EB se incubo a 35°C por 24 horas y se leyó los resultados.

Simultáneamente al realizar el análisis de manipuladores se realizó el análisis de la dotación del personal, evaluando el uniforme y calzado (botas); se realizó un frotis con un hisopo continuamente se homogenizo en vortex y se sembró en petrifilm EB, se incubo a 35°C por 24 horas.

4.6.5. *Análisis de ambientes*

Se realizaron por medio de la exposición de cajas de Petri utilizando agar SPC (aerobios mesófilos) y Rosa de bengala (mohos y levaduras) durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se incubaron $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para aerobios mesófilos y 30°C por 4 días para mohos y levaduras. Cumplido el tiempo se da lectura e interpretación a los resultados.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 2. Cronograma de actividades primer semestre 2022

SEMANA / ACTIVIDADES	DICIEMBRE				ENERO				FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Capacitación e inducción de ingreso a la planta																												
Revisión bibliográfica																												
Redacción de procedimientos y metodología																												
Registro de resultados																												
Revisión de avances por parte del tutor académico																												
Revisión y entrega final al coordinador del laboratorio de la empresa																												
Entrega del informe final																												

Fuente. (Gutierrez, 2022)

Nota: en esta tabla se muestra cada una de las actividades que se programaron durante el primer semestre del 2022 con respecto al desarrollo, ejecución y socialización del proceso de investigación realizado.

6. RESULTADOS

Los datos que se presentan a continuación contienen datos próximos a la realidad debido a las políticas de privacidad de la empresa.

6.1. Análisis de leche cruda

Se obtuvieron resultados durante los respectivos meses, donde se recopilaban datos de tanques de almacenamiento de la leche cruda, como de las principales rutas ingresadas al acopio; estableciendo un comportamiento de la carga microbiana respectivamente. La lectura se realizó por medio del lector de placa Petrifilm 3M.

Tabla 3. Promedio de los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos durante los meses de diciembre a abril

TANQUE/ PROVEEDOR	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	*	1,02E+07	4,60E+06	6,93E+06	2,53E+06
B	*	1,03E+07	6,52E+06	9,82E+06	2,36E+07
C	*	7,55E+06	5,52E+06	6,73E+06	8,03E+06
D	*	9,92E+06	8,76E+06	1,16E+07	8,28E+06
E	*	1,01E+07	3,58E+06	3,15E+06	1,53E+06
F	*	3,96E+06	7,17E+06	7,45E+06	7,28E+06
G	*	3,68E+06	1,30E+06	*	*
H	*	8,83E+06	3,93E+06	6,63E+06	4,95E+06
I	*	4,84E+06	9,11E+06	4,60E+06	6,68E+06
J	*	4,68E+06	1,16E+07	7,13E+06	1,30E+07

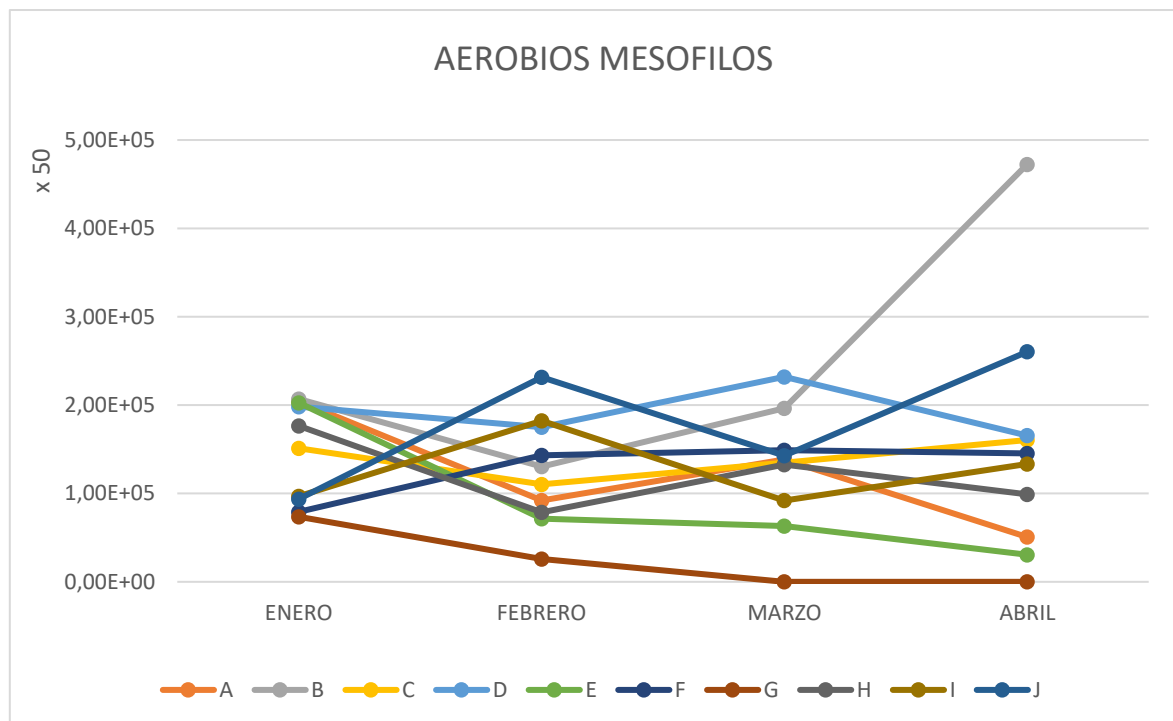
Fuente: (Gutierrez, 2022)

Nota. No se recolectó datos.

Los datos anteriormente presentados en la Figura 2, se estableció una comparación para establecer el comportamiento de la carga microbiana presente en la leche cruda

exceptuando el mes de diciembre que no se reportaron datos y durante el mes de marzo y abril del tanque/proveedor G que no se recolecto leche.

Figura 2. Comportamiento microbiano de los respectivos tanques/proveedores durante los meses de enero a abril.



Fuente: (Gutierrez, 2022)

Nota. Comparación de los recuentos de los diferentes tanques/proveedores

En la Figura 2 se evidencia una alta carga microbiana en los recuentos de la leche cruda que es ingresada a la planta, se evidencio que en el mes de abril el tanque/proveedor B, el cual presento un recuento alto $2,36 \times 10^7$ con respecto a las demás, durante los otros meses se observó que el comportamiento es similar y que oscilan entre $1,16 \times 10^7$ hasta $1,30 \times 10^6$.

La calidad microbiológica de la leche cruda depende de la salud, limpieza de las vacas y del ordeño. (Frazier & Westhoff, 1988) señalaron que la contaminación microbiana de la leche en la granja puede ser causada por varios microorganismos como *Streptococcus lactis*, coliformes, y termodúricos. La leche también puede contener varios patógenos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolítica* y *Listeria monocytogenes*.

6.1.1 Microorganismos psicrófilos

El recuento de microorganismos psicrófilos es de suma importancia ya que generan problemas en el deterioro de la calidad de la leche y de sus derivados, por ello se realizó un promedio de los recuentos obtenidos durante los meses de diciembre a abril.

Tabla 4. Promedio de los recuentos de microorganismos psicrófilos obtenidos durante los meses de diciembre a abril

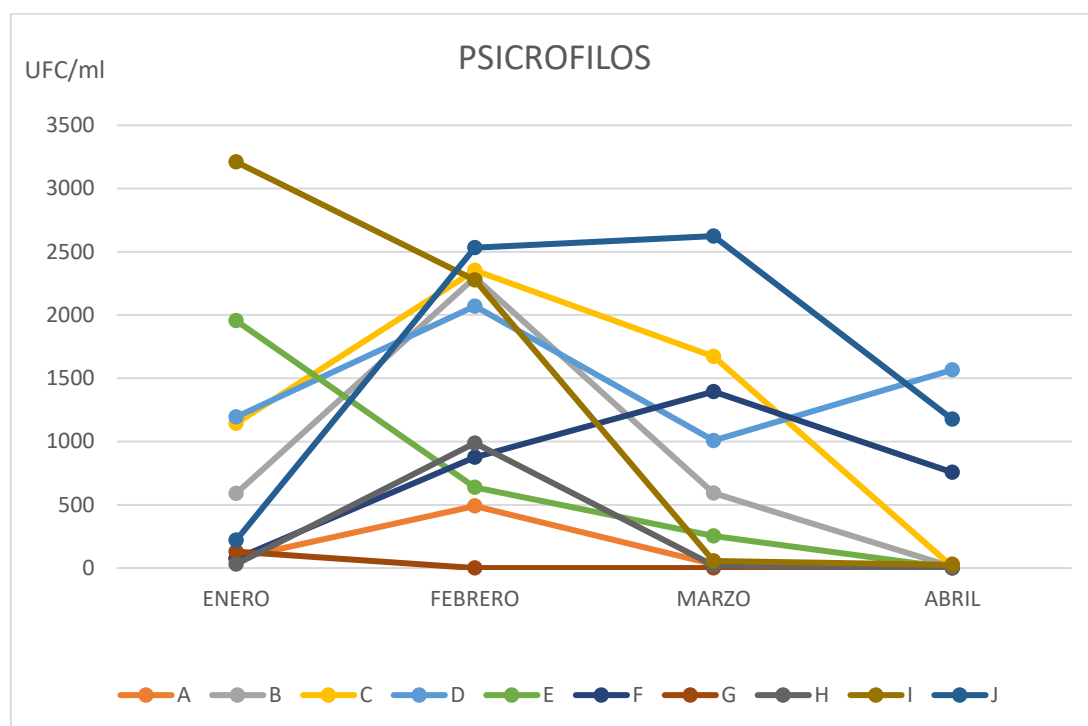
TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	*	77	490	30	30
B	*	590	2297	593	10
C	*	1145	2353	1673	10
D	*	1195	2070	1008	1565
E	*	1955	637	253	<10
F	*	73	877	1395	758
G	*	130	>1600	*	*
H	*	30	988	20	<10
I	*	3210	2277	55	25
J	*	220	2532	2624	1177

Fuente: (Gutierrez, 2022)

Nota. *No se recolectó datos.

Los datos presentados en la Figura 3 se compararon para establecer el comportamiento de la carga microbiana presente en la leche cruda. El mes de diciembre (no se reportaron datos) durante el mes de marzo y abril del tanque/proveedor G (no se recolecto leche).

Figura 3. Comportamiento microbiano de microorganismos psicrófilos de los respectivos tanques/proveedores durante los meses de enero a abril.



Fuente: (Gutierrez, 2022)

Nota. Se evidenció el comportamiento de bacterias psicrófilas, el recuento más alto durante los meses de diciembre- abril, en el mes de enero en el tanque/proveedor I presentó el recuento más alto para microorganismos psicrófilos a diferencia de los demás meses y tanque/proveedor que oscilan entre 2624 UFC/ml y 30 UFC/ml.

La normativa colombiana no presenta análisis en microorganismos psicrófilos; sin embargo, en la Figura 3 se muestran los resultados del análisis realizado para llevar un control interno, ya que puede favorecer a la formación de biofilms. La leche ingresada a la planta no supera las 24 horas de almacenamiento, el flujo de leche es constante por lo que la leche cruda en los tanques de almacenamiento es procesada el mismo día.

La temperatura de la leche después del ordeño promoverá la rápida multiplicación de microorganismos. El mayor porcentaje de bacterias hoy en día son mesófilos, por lo que el enfriamiento inmediato a 4°C es fundamental para asegurar la calidad de la leche. Pero no se debe prolongar su almacenamiento (mayor a 24 horas) porque entonces aumentara el número de psicrófilos. Cuando la leche no se procese el mismo día de su recepción, deberá someterse a un tratamiento de termización. (Heer, 2007)

Según (Silveira & Teixeira, 1998), los microorganismos psicótrofos representan menos del 10% de la flora inicial de la leche cruda, pero como crecen durante el almacenaje en frío de la leche, se convierten en un grupo predominante.

6.2. Análisis de leche procesada

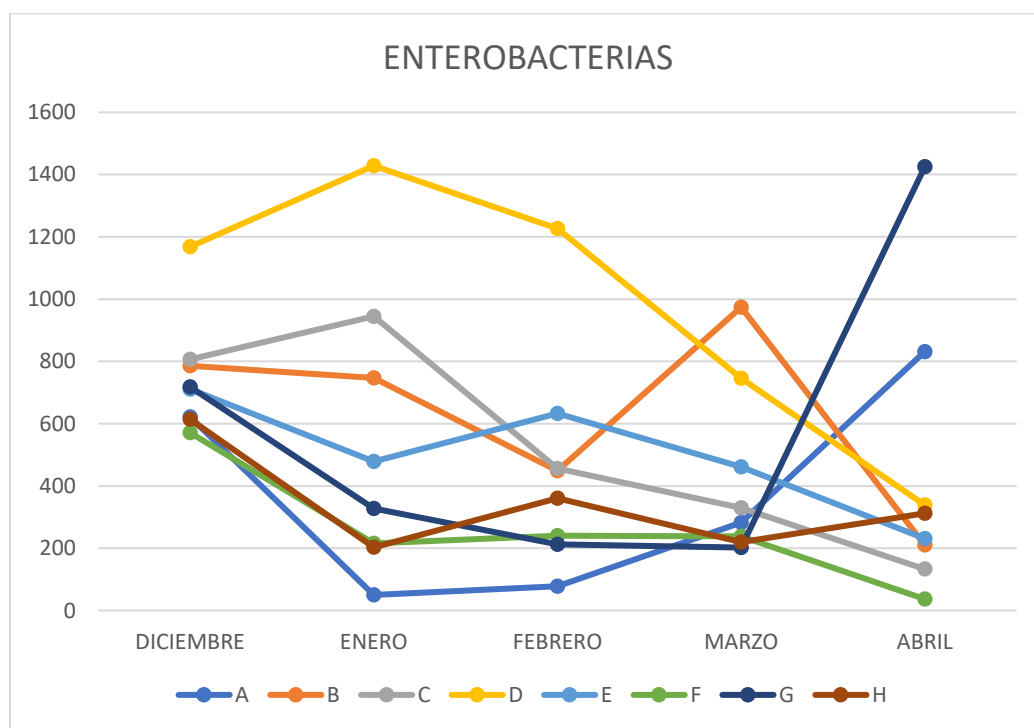
Los resultados de los análisis de la leche procesada se presentan a continuación, en la Tabla 5 se evidenció el promedio de los tanques de almacenamiento de la leche y los recuentos de enterobacterias que son un indicador de calidad. A diferencia de la leche cruda en la leche pasteurizada es inaceptable la presencia de coliformes, ya que la pasteurización debe destruirlas. Con el crecimiento de coliformes se denota mala pasteurización o contaminación luego de la pasteurización en los productos lácteos.

Tabla 5. Promedio de los recuentos de enterobacterias obtenidos durante los meses de diciembre a abril.

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	621	50	78	283	831
B	786	747	449	974	210
C	806	945	456	329	133
D	1168	1428	1227	746	338
E	711	478	633	461	231
F	571	216	240	238	37
G	718	327	212	202	1425
H	614	203	360	220	312

Fuente: (Gutierrez, 2022).

Figura 4. Comportamiento microbiano de enterobacterias de los respectivos tanques durante los meses de enero a abril.



Fuente: (Gutierrez, 2022).

Nota. Se pudo observar que en el recuento de enterobacterias presenta un comportamiento similar en los tanques de almacenamiento a excepción del tanque D, presentó un recuento mayor durante los meses de diciembre enero y durante el mes de febrero empezó a verse una disminución en el recuento microbiano, se pudo observar una disminución de los recuentos presentes en los demás

tanques; el tanque G durante el mes de abril presentó un aumento en la presencia de enterobacterias. Dentro de los parámetros internos de la empresa <10 UFC/ml muchos de los recuentos se encuentran por fuera del límite aceptable.

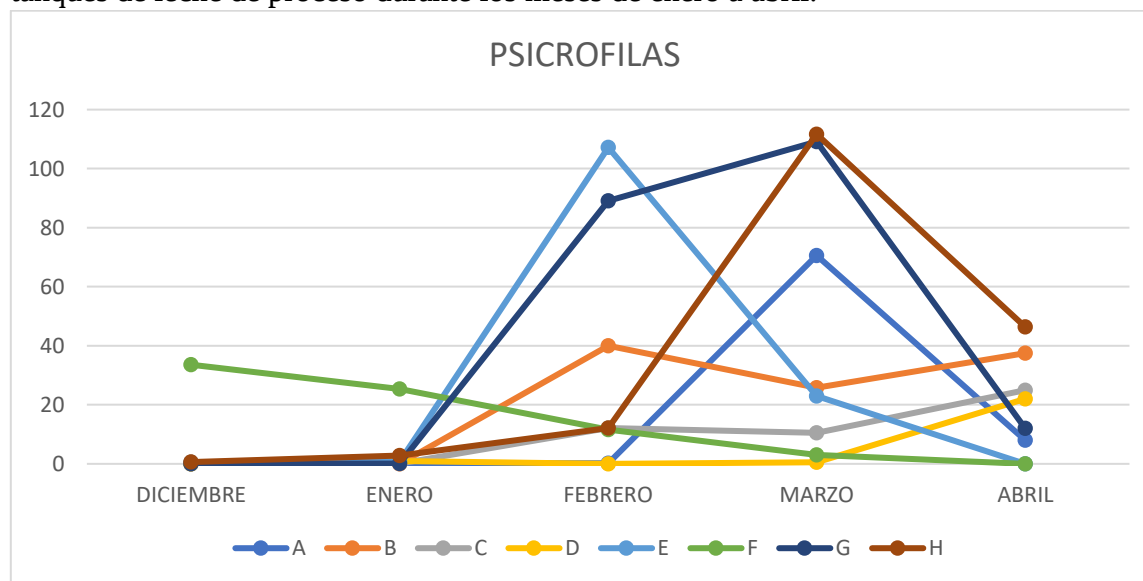
6.2.1. Microorganismos psicrófilos en leche procesada

Tabla 6. Promedio de los recuentos de microorganismos psicrófilos obtenidos durante los meses de diciembre a abril en leche de proceso

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	<1	<1	<1	71	8
B	<1	<1	40	26	38
C	<1	<1	12	11	25
D	<1	1	<1	1	22
E	1	1	107	23	<1
F	34	25	12	3	<1
G	<1	<1	89	109	12
H	1	3	12	112	46

Fuente: (Gutierrez, 2022)

Figura 5. Comportamiento microbiano de microorganismos psicrófilos de los respectivos tanques de leche de proceso durante los meses de enero a abril.



Fuente: (Gutierrez, 2022)

La temperatura de almacenamiento es uno de los factores que inciden sobre la calidad de la leche ya que es esencial si su almacenamiento va ser mayor a doce horas, ya que las temperaturas de refrigeración favorece el crecimiento de bacterias psicotrofas que son contaminantes normales, se recomienda que el tiempo que permanezca la leche en el tanque sea menor a 48 horas. (Ruiz del Rio, Toledo, & Pino, 2007).

El flujo de leche en la planta es constante por ello es importante el monitoreo de estos microorganismos para evitar la formación de biofilms, en la Figura 4., el recuento de microorganismos psicrófilos fue variable en los tanques al transcurrir lo meses, una posible causa podría deberse como anteriormente se menciona a la formación de biofilms ya que la industria es sensible a esta contaminación, durante el plan de limpieza y desinfección implementado por la empresa se logró eliminar un porcentaje de estos microorganismos por ello se logró observar la disminución de los recuentos durante algunos meses.

6.3. Análisis de esporas de 80° y 90° C

6.3.1. Leche cruda y proceso

A

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	*	125	34	20	31
B	*	1	8	72	50
C	*	33	1	49	44
D	*	61	8	22	78
E	*	94	18	14	159
F	*	18	5	40	24
G	*	87	18	-	-
H	*	201	14	33	21
I	*	39	19	44	64
J	*	85	10	15	23

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	*	5	1	5	2
B	*	<1	3	31	3
C	*	2	1	5	1
D	*	1	1	110	2
E	*	6	1	3	3
F	*	1	1	3	3
G	*	1	4	*	*
H	*	5	1	6	5
I	*	1	3	2	2
J	*	1	1	1	2

C

B

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	1	697	4	8	14
B	14	760	6	7	2
C	5	760	4	5	8
D	1	781	2	4	2
E	2	700	8	16	4
F	3	758	5	8	<1
G	7	737	3	13	9
H	8	760	6	4	13

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	<1	<1	3	4	6
B	2	39	2	3	9
C	<1	5	3	2	2
D	1	<1	8	9	9
E	1	1	2	4	1
F	<1	<1	1	2	<1
G	2	38	1	8	1
H	1	1	2	3	15

D

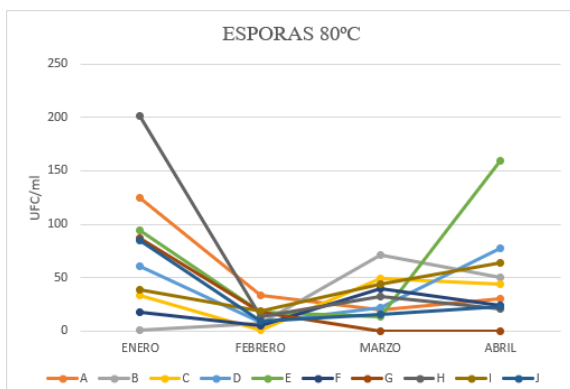
Fuente: (Gutierrez, 2022)

Nota. *No se recolecto datos.

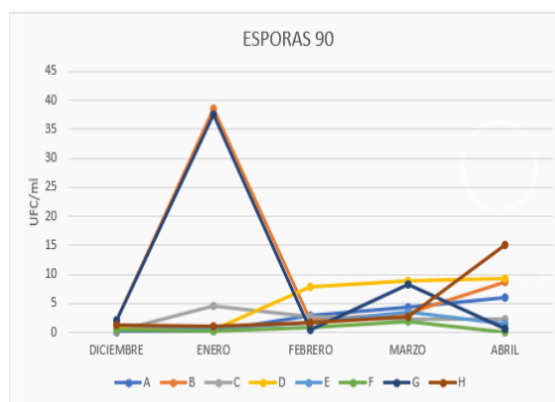
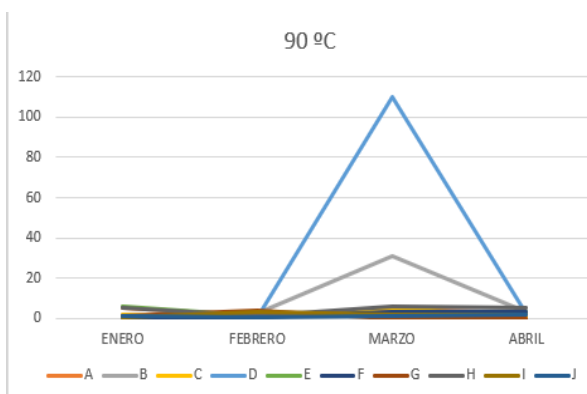
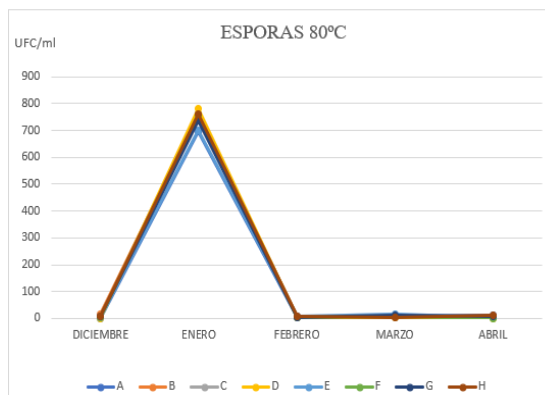
Tabla A, C: Promedio esporas 80° y 90°C de leche cruda exceptuando el mes de diciembre (no se reportaron datos) y durante el mes de marzo abril del tanque/proveedor G (no se recolecto leche),

Tabla B, D: Promedio esporas 80° y 90°C leche proceso durante los meses Diciembre-abril.

E



F



G

H

Fuente: (Gutierrez, 2022)

Nota. Figura E, G: Comparación del comportamiento esporas 80° y 90°C de leche cruda durante los meses Diciembre-abril, Figura F, H: Comparación del comportamiento de la carga microbiana presente en leche proceso.

Las figuras (E,G) ;(F,H) respectivamente para leche cruda (80, 90°C) y leche proceso (80, 90°C) el recuento de bacterias formadoras de esporas ufc/ml, los resultados, indicaron que la tasa de recuento de microorganismos esporulados presentes en la leche cruda demostraron que esta por no tener ningún tratamiento es la más típica a presentar

contaminación por bacterias formadoras de esporas, las condiciones climáticas, la variación estacional y las condiciones de la región son importantes en la composición microbiana de la leche además de que la incidencia de esporas en la leche puede estar relacionado con el pastoreo del ganado, las prácticas de ordeño y los tanque o cantinas de almacenamiento de la leche (Sutherland & Murdoch, 1994).

La presencia de bacterias formadoras de esporas durante la producción de leche UHT (leche de proceso) representadas en las Figuras F y H, demostraron la eficiencia del tratamiento térmico, siendo menor el recuento total llegando a tener recuento <10 ufc/ml en comparación a la leche cruda donde las variaciones en los recuentos fueron mayores.

6.4. Análisis de HHRS en leche cruda, leche de proceso

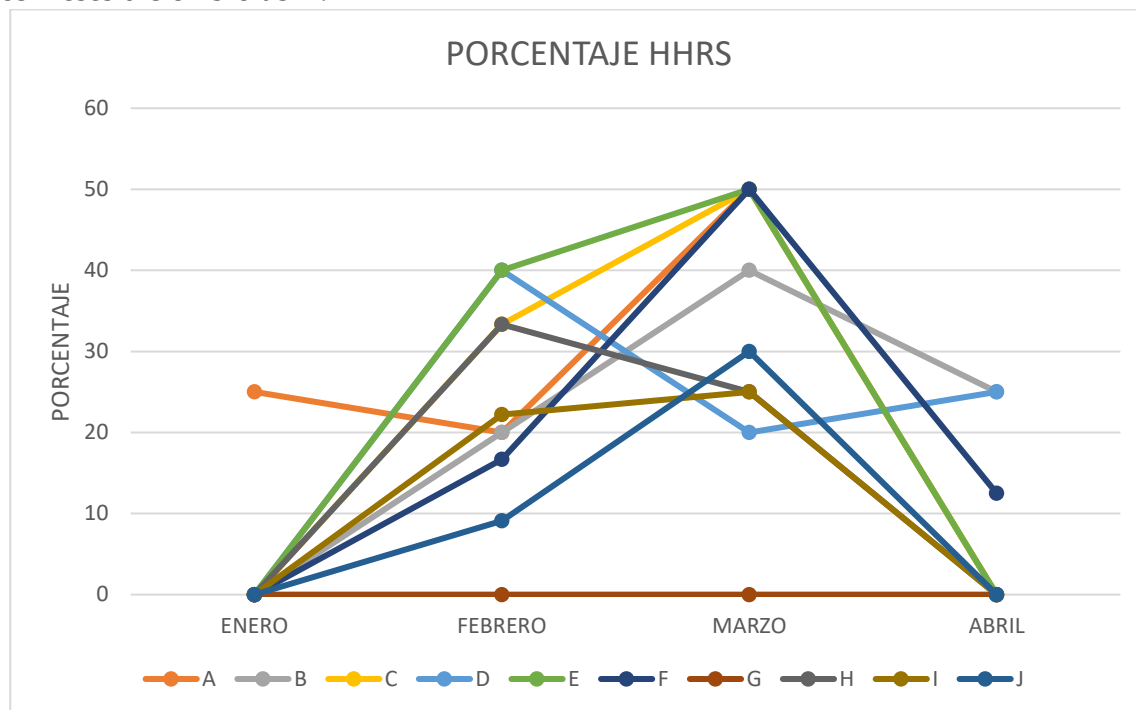
6.4.1. Leche de cruda

Tabla 7. Porcentaje de presencia de HHRS en las muestras de leche cruda durante los meses Diciembre-abril

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	*	25	20	50	0
B	*	0	20	40	25
C	*	0	33	50	0
D	*	0	40	20	25
E	*	0	40	50	0
F	*	0	17	50	13
G	*	0	0	*	*
H	*	0	33	25	0
I	*	0	22	25	0
J	*	0	9	30	0

Fuente: (Gutierrez, 2022).

Figura 6. Porcentaje de presencia de HHRS en leche cruda del tanque/proveedor durante los meses diciembre-abril.



Fuente: (Gutierrez, 2022)

La Figura 6 se evidenció que los datos fueron variables, no existe correlación entre los mismos. En el Tanque/proveedor E durante los meses de seguimiento se evidenció el mayor recuento, mientras se evidenció durante el mes de marzo se presentó el porcentaje mayor de presencia de HHRS (50%) respecto a los demás meses. según (Gomez, 2018) si bien la presencia de HHRS en leche cruda no es tan elevada <10 a 10^2 ufc/ml.

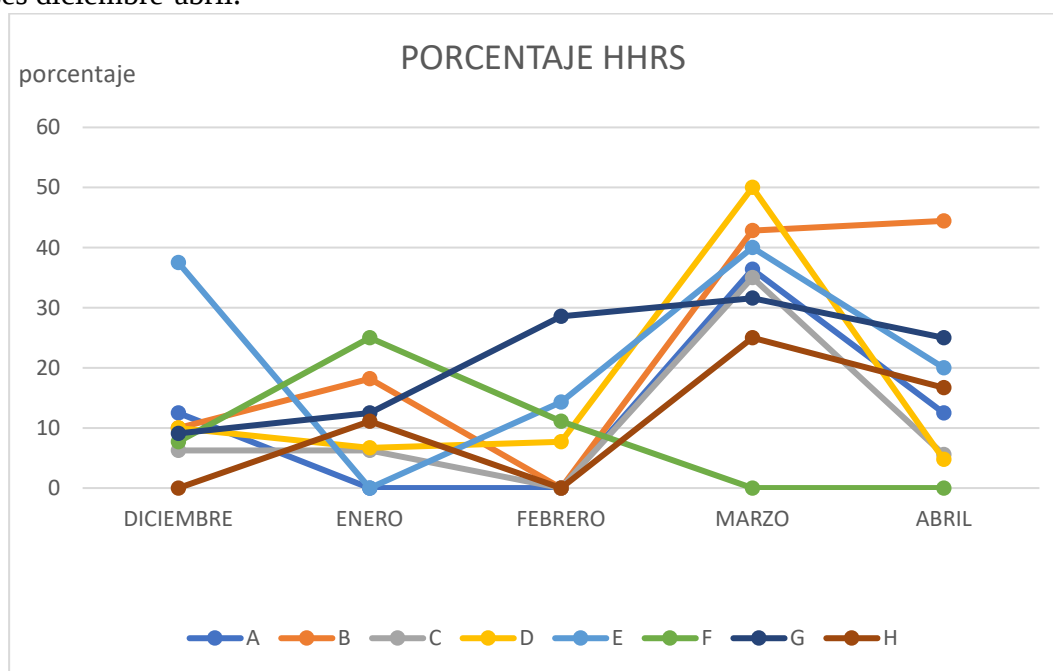
6.4.2. Leche de proceso

Tabla 8. Porcentaje de presencia de HHRS en las muestras de leche proceso durante los meses Diciembre-abril

TANQUE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
A	13	0	0	36	13
B	10	18	0	43	44
C	6	6	0	35	6
D	10	7	8	50	5
E	38	0	14	40	20
F	8	25	11	0	0
G	9	13	29	32	25
H	0	11	0	25	17

Fuente: (Gutierrez, 2022)

Figura 7. Porcentaje de presencia de HHRS en leche proceso de los tanques durante los meses diciembre-abril.



Fuente: (Gutierrez, 2022)

La Figura 7 durante el mes de marzo los porcentajes de presencia de HHRS en las muestras de leche de proceso fueron más altas respecto a los demás meses al igual que en la leche cruda, como se mencionó anteriormente el objetivo de la ultra pasteurización es que el producto final debe ser microbiológicamente estable. La presencia de HHRS en leche de proceso podría estar asociado a biopelículas dentro del sistema de tuberías, o la alta carga microbiana inicial de la leche cruda. Las esporas HHRS llegan a aumentar su concentración debido a la capacidad de crecer en la línea de procesamiento por la formación de biofilms logrando en ocasiones llegar al producto final (Gomez, 2018).

6.5 Análisis de leche UHT

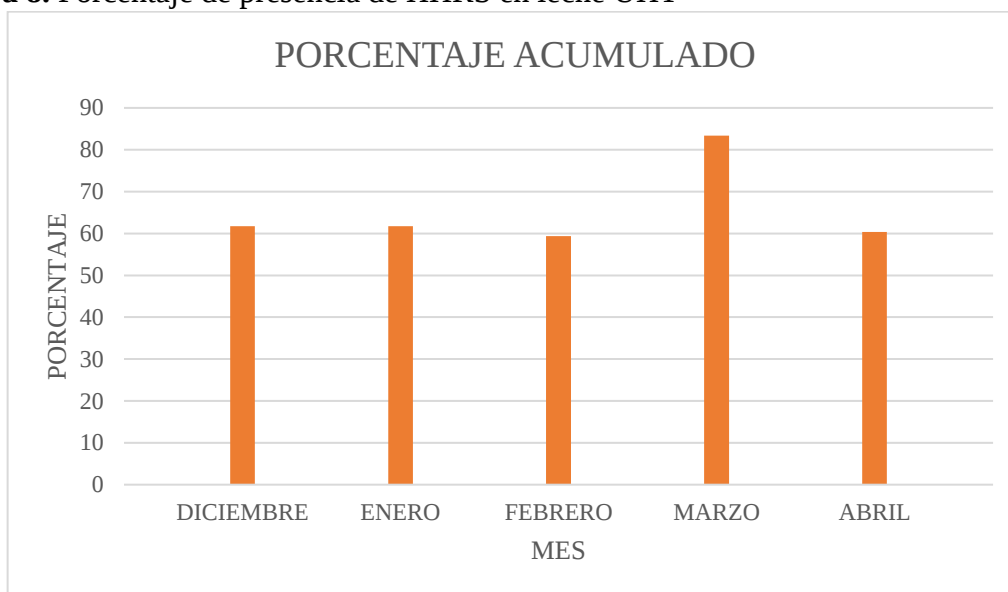
6.5.1 Análisis de seguimiento 48 horas

Según los resultados obtenidos durante los meses de diciembre-abril y las confirmaciones en medio BHI se estableció el porcentaje de HHRS en producto UHT.

Tabla 9. Porcentaje de presencia de HHRS en leche UHT

MES	EQUIPO	MUESTRAS ANALIZADAS	MUESTRAS PRESENCIA	PORCENTAJE PRESENCIA	PORCENTAJE ACUMULADO
DICIEMBRE	A	1309	746	56,99	61,76
	B	966	513	53,11	
ENERO	A	1130	707	62,57	61,76
	B	107	57	53,27	
FEBRERO	A	1096	655	59,76	59,38
	B	93	51	54,84	
MARZO	A	922	592	64,21	83,34
	B	70	48	68,57	
ABRIL	A	864	518	59,95	60,36
	B	82	54	68,85	

Fuente: (Gutierrez, 2022).

Figura 8. Porcentaje de presencia de HHRS en leche UHT

Fuente: (Gutierrez, 2022).

La presencia de HHRS en leche UHT en los meses de muestreo diciembre-abril del presente año se evidenció que durante el mes marzo fue el mes en el que superó el 70% comparado con los otros meses donde no se superó el 65% de igual manera se evidenció una relación ya que durante marzo en las muestras de leche cruda y leche de proceso se presentó un porcentaje elevado.

6.5.2 Análisis de esterilidad comercial

Con la confirmación del recuento en medio BHI se obtuvieron los siguientes resultados correspondientes a esterilidad comercial según la NTC 4433.

Tabla 10. Porcentaje mensuales de esterilidad comercial en aerobiosis y anaerobiosis.

MES	PRESENCIA MICROORGANISMOS EN AEROBIOSIS		PRESENCIA MICROORGANISMOS EN ANAEROBIOSIS	
	35°C	55°C	35°C	55°C
DICIEMBRE	*	*	*	*
ENERO	2,7%	0%	2,7%	0%
FEBERO	0%	0%	0%	0%
MARZO	0%	0%	0%	0%
ABRIL	0%	0%	0%	0%

Fuente: (Gutierrez, 2022).

El objetivo de la esterilidad comercial es verificar los procedimientos de fabricación y que el producto final sea inocuo con el tratamiento apropiado, el objetivo son alimentos libres de microorganismos y que no sean capaces de reproducirse dentro de las condiciones normales no refrigeradas en las que los alimentos probablemente se conservan (NTC 4433,2015).

Las muestras analizadas durante este periodo se evidenciaron que durante el mes de enero se presentó el 2,7% de presencia en las muestras analizadas y corresponden a la presencia de esporas HHRS, presuntivamente de *Bacillus sporothermodurans* por su caracterización fenotípica. Ya que según la literatura la principal causa del no cumplimiento de esterilidad comercial es la presencia de esporas resistentes la ultra pasteurización (HHRS) (Castañeda & Carrasquilla, 2015).

6.6 Otros análisis de la línea de producción

6.6.1 Análisis de aguas, patógenos, manipuladores y ambientes

Tabla 11. Porcentaje mensuales ausencias de otros análisis de la línea de producción.

Programa	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Aguas	100%	100%	100%	100%	100%
Ambientes	100%	100%	100%	100%	100%
Manipuladores	100%	100%	100%	100%	100%
Patógenos	100%	100%	100%	100%	100%

Fuente: (Gutierrez, 2022).

Los programas de limpieza y desinfección son la mejor medida preventiva para asegurar la calidad del producto terminado, el agua y su calidad que es fundamental durante la producción de leche UHT, en los procesos de limpieza de máquinas, instalaciones y tanques si se utiliza agua contaminada esta llega a jugar un papel importante dentro de la calidad, es por eso por lo que se debe evaluar la calidad microbiológica para que no se convierta en un transmisor de patógenos (Sinorini, 2003).

El análisis de aguas tratadas cumplió con los requisitos establecidos en la resolución 2115 de 2007, donde dentro de los valores establecidos el recuento de coliformes totales y *E. coli* <10 UFC/100 cm³. Donde se realizó análisis de enterobacterias respectivamente, el cual no se presentó crecimiento en este medio, además se realizaron análisis adicionales (aerobios mesófilos y *Pseudomonas aeruginosa*) no se presentan crecimientos en los respectivos medios de cultivo; así se determinó que el agua es apta para el consumo humano y sus demás usos como limpieza de tanques y superficies.

Los monitoreos ambientales y de superficies permiten verificar las condiciones de limpieza de equipos e instalaciones, los resultados de las pruebas aplicadas a superficies

para determinar patógenos en superficies como *salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* por medio del sistema de detección molecular (MDS) 3M que presenta una ventaja porque su detección se realiza en un menor tiempo, por lo que se ve reflejado en ahorro de tiempo y recursos, además que garantiza confiabilidad de los resultados obtenidos.

En relación con otras fuentes de contaminación el ambiente es una de las principales fuentes de contaminación por esporas y aerobios mesófilos, según al plan de muestreo de la empresa se da cumplimiento a la normativa interna de la empresa. El personal de la empresa no presentó recuentos en los análisis de manipuladores ya que se realizan el correspondiente lavado y desinfección de manos, botas y portan el uniforme en buenas condiciones para así disminuir factores que incurran en una fuente de contaminación en el producto final.

7. CONCLUSIONES

Con la evaluación de la calidad microbiológica de la leche durante la cadena de producción, se pudo determinar que muchos de los requisitos exigidos por la legislación colombiana no se cumplen en la leche cruda. Sin embargo, el producto terminado refleja la eficiencia del proceso de ultra pasterización y no se presenta Re-contaminación en la línea de procesamiento.

La leche UHT cumple con la normativa vigente en el país sin embargo se estableció la presencia de esporas mesófilas, termófilas y HHRS.

En los diferentes análisis de trazabilidad durante la línea de procesamiento de leche UHT se observó que se cumple con totalidad, se da garantía y no se ve afectado el producto final.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda para la identificación de *Bacillus sporothermodurans* metodologías que nos acerquen a confirmar la presencia de este microorganismo, ya que no toda la contaminación de la leche se debe a una sola especie de *Bacillus* spp. Y que no solo se enfoca en *B. sporothermodurans* como único contaminante.

9. GLOSARIO

LVS A: Leche semidescremada marca A

LVS F: Leche semidescremada marca F

CREMA A: Crema de leche marca A

DES A: Leche deslactosada marca A

DES F: Leche deslactosada marca F

LVE A: Leche entera marca A

LVE F: Leche entera marca F

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

IP: Inicio de Producción

FP: Final de producción

CR+IP: Cambio de rollo de polietileno e inicio de producción

RIP: Reinicio de producción

PP: Parada de producción

AVENA F: Avena marca F

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

TTC: es un colorante ampliamente utilizado para la detección, aislamiento y enumeración de presuntas colonias microbianas

BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, D., & Bedoya, O. (2005). *Composición nutricional de la leche de ganado vacuno*. Antioquia: Redalyc.
- Aguilera, A. M., Urbano, E., & Jaimes, C. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda. Problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura* , 11(2), 8-9. Obtenido de https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_agricultura/about/editorialPolicies#custom-0
- Cabrejos, A. (2015). Proceso de Leche Fluida. *Proceso de Leche Fluida*. Buenos Aires. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/347093937/Proceso-de-Leche-Fluida>
- Castañeda, L., & Carrasquilla, S. (2015). *Caracterización de la microbiota de leche ultra alta temperatura (UAT, UHT) analizada en Bogotá*. Obtenido de <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964508/revista-inv-seg-social-17-2-leches-uht.pdf>
- Celis, M., & Juárez, D. (2009). *Microbiología de la leche*. Argentina: Universidad Tecnológica Nacional. Obtenido de http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf
- DECRETO 616. (2006). Obtenido de <https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006d616.aspx>
- FAO. (2011). Obtenido de <https://www.fao.org/3/bo954s/bo954s.pdf>
- FAO. (2022). *Organizacion de las naciones unidas para la alimentacion y la agricultura* . Obtenido de <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- FEDEGAN. (2021). *FEDEGAN*. Obtenido de https://estadisticas.fedegan.org.co/DOC/download.jsp?pRealName=Balance_perspectivas_ganaderia_colombiana_2020_2021.pdf&iIdFiles=793#:~:text=Como%20consecuencia%20de%20este%20comportamiento,decir%20el%2045%2C27%25.
- Forero, A. Y. (2017). *BIOMEDICA*. Obtenido de <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3802/4199#info>
- Frazier, W., & Westhoff, D. (1988). *Microbiología de los Alimentos 3ra. ed*. Zaragoza, España: Editorial Acribia SA.
- Gigli, I. (2017). *La buena leche*. Buenos Aires , Argentina: Editorial Maipue.
- Gomez, M. E. (2018). *Identificación de microorganismos termotóxicos provenientes de leche cruda productores de enzimas de deterioro y evaluación de su actividad en biofilms*. Obtenido de

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21393/1/uy24-19243.pdf>

González, G. d. (2010). *foro lechero*. Obtenido de https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDEL_ALECHECRUDA.pdf

Gutierrez, I. (2022). Universidad de Pamplona, Aguachica.

Heer, G. (2007). *Microbiología de la leche. Cátedra de tecnología de la leche*. Santa Fe, Argentina.: Universidad Nacional del litoral.

ICBF. (2005). *Instituto Colombiano de Bienestar Familiar*. Obtenido de https://scp.com.co/ArchivosSCP/ENSIN_ICBF_2005.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2011). *IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-biologicos-en-leche.pdf>

Juárez, M. C. (2009). Obtenido de http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf

MADR/CCI. (2009). *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural/Cooperación Colombiana Internacional*.

Magariños, H. (2000). *PRODUCCIÓN HIGIÉNICA DE LA LECHE CRUDA*. Obtenido de <http://portal.oas.org/LinkClick.aspx?fileticket=wlyuTwR3IEc%3D>

Organización Panamericana de la Salud OPS. (2017). *Manual para manipuladores de alimentos*. Washington D.C.: Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de <https://www.fao.org/3/I7321ES/i7321es.pdf>

Porporatto, C., & Felipe, V. (2010). *Mastitis, confort animal y calidad de leche*. Villa María, Argentina: Eduvim.

Quesada, I. M. (2019). *Tecnologico de costa rica*. Obtenido de https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/11078/validacion_sistema_deteccion_molecular.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Quigley, L., Sullivan, O., Stanton, O., & Beresford, C. (2013). *FEMS Microbiology*.

Rapidmicrobiology. (2019). *Molecular Testing of Food Pathogens*. Obtenido de <https://www.rapidmicrobiology.com/test-method/molecular-testing-for-food-pathogens>

RESOLUCION 2115. (2007).

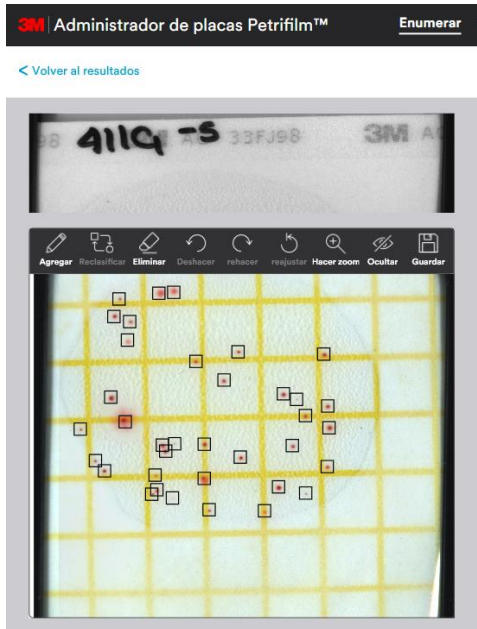
RESOLUCION 4433. (2015).

- ROA, M. O. (2007). *IDEAM*. Obtenido de <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-ec54a0f01174#:~:text=La%20filtraci%C3%B3n%20por%20membrana%20es,agua%20haciendo%20que%20se%20filtre>.
- Ruiz del Rio, A., Toledo, & Pino, I. (2007). Evaluacion de CO2 en el control de microorganismos psicrotrofos y termoturificos en la leche cruda. En *Tesis Ing. agr factad de agronomia*. Montevideo, Uruguay.
- Silveira, I., & Teixeira, D. (1998). Influencia de microorganismos psicrotrofos sobre a qualidade do leite refrigerado. En *Higiene alimenticia* (págs. 21-27).
- Sutherland, A., & Murdoch, R. (1994). Ocurrencia estacional de especies de *Bacillus* psicrotróficas en la leche cruda y estudios sobre la interacción con *Bacillus* sp mesófilos. En *t. J. Food Microbiol*, 279 - 292.
- Yáñez, V. (15 de enero de 2015). *Uso y ventajas de amplificación isotérmica en la detección de microorganismos patógenos en la detección de alimentos y control ambiental (en línea)*. Obtenido de 3M: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/08/1-3M-Uso-y-ventajas-de-amplificacion-isot--rmica-en-la-deteccion-microorganismos-004.pdf>
- Zúñiga, I. R., & Caro, J. (mayo de 2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *ENF INF MICROBIOL*, 37(3), 95-104. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2017/ei173e.pdf>

ANEXOS

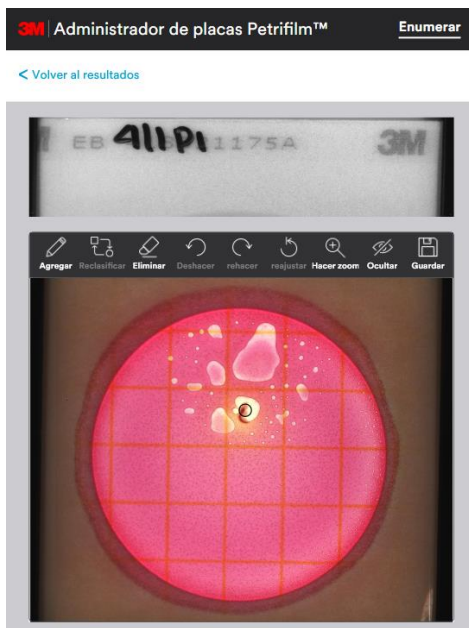
Anexo 1. Recuento de aerobios mesófilos

Ejemplo de crecimiento de Aerobios mesófilos en muestras de leche cruda. Dilución 10-5



Anexo 2. Recuento de enterobacterias

Ejemplo de crecimiento de Enterobacterias en muestras de leche procesada. Dilución 10-1



Anexo 3. Recuento de psicrófilos en leche cruda

Ejemplo de crecimiento de Psicrófilos en muestras de leche cruda. Dilución 10-1



Anexo 4. Recuento de psicrófilos en leche proceso

Ejemplo de crecimiento de Picrofilas en muestras de leche procesada. 1:1

