IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA Y DE SUPERFICIES EN UNA PLANTA DE PROCESAMIENTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS

ADRIANA LUCIA BAUTISTA RAMÓN

Presentado para obtener el título de

Microbiólogo

Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Departamento de Microbiología

Pamplona, Norte de Santander

30 de enero de 2023

IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA Y DE SUPERFICIES EN UNA PLANTA DE PROCESAMIENTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS

Autor

ADRIANA LUCIA BAUTISTA RAMÓN

Presentado para obtener el título de
Microbiólogo

Tutor Académico
MSc. William Hernando Suarez Quintana

Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Departamento de Microbiología

Pamplona, Norte de Santander

30 de enero de 2023

Nota de Aceptación

DEDICATORIA

En primer lugar, quiero dar gracias a Dios por permitirme culminar una etapa mas de mi vida, por lograr este último escalón que solo será el comienzo de una carrera llena de oportunidades y triunfos para mí y mi familia**.**

A mis padres José Nicolas Bautista Latorre y Nancy Janeth Ramón Villamizar quienes han sido parte fundamental de este proceso, pues su apoyo me ha permitido llegar hasta donde estoy hoy en día, por los principios enseñados no solo a lo largo de mi carrera universitaria si no a lo largo de mi vida y sin duda alguna por sus palabras de aliento y amor incondicional que me brindan día a día. También quiero agradecer a mi abuela María Dolores Villamizar quien a diario con sus palabras me alienta a ser mejor cada día y a querer construir un mejor futuro.

Así mismo quiero agradecerle a mi pareja, Criss Fernando Salazar, quien ha sido motivación en este proceso pues me ha estado apoyando incondicionalmente gran parte de mi carrera, en especial este último semestre, por su amor y por mostrarme que aun en momentos difíciles para los dos, siempre estará ahí apoyando mis sueños que al final son nuestros.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis docentes del programa quienes fueron un pilar fundamental en este proceso puesto que al compartir sus conocimientos nos ayudan a crecer en ámbitos personales y laborales. Así mismo quiero darle las gracias a mi tutor académico, el docente William Hernando Suarez Quintana, quien siempre estuvo puesto a guiarme y orientarme para poder realizar este trabajo, además de brindarme su amistad a lo largo de la carrera y siempre tener palabras de aliento.

Por último, pero no menos importante quiero dar gracias a la empresa que me abrió sus puertas para desarrollar y afianzar todos los conocimientos obtenidos, a mis jefes Karen Montenegro y Lina De la Rosa, quienes aportaron a mi aprendizaje, depositaron su confianza y aumentaron mi seguridad en creerme capaz de enfrentarme a nuevos retos y decisiones.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 10
ABSTRACT 11
1. INTRODUCCIÓN 12
2. OBJETIVOS 14
2.1. Objetivo General 14
2.2. Objetivos Específicos 14
3. JUSTIFICACIÓN 15
4. MARCO TEÓRICO 17
4.1. Sector Lácteo a Nivel Mundial 17
4.2. Sector Lácteo Nacional 19
4.3. Sector Lácteo Regional 20
4.4. Composición de la Leche 21
4.5. Características Fisicoquímicas 23
4.6. Bacterias en Leche Cruda 24
4.7. Buenas Prácticas de Ordeño y Buenas Prácticas Ganaderas 26
4.8. Superficies de Contacto 27
4.9. Métodos automatizados de identificación bacteriana 28
4.10. Normativa 29
5. METODOLOGÍA 30
5.1. Proceso de Muestreo 30
5.1.1. Muestreo de leche cruda en mulas 30
5.1.2. Muestreo de leche cruda de silos 30
5.1.3. Muestreo de superficies 31
5.2. Aislamiento Bacteriológico de la Leche Cruda 31
5.3. Aislamiento Bacteriológico de Superficies 32
5.4. Tinción de Gram 32
5.5. Prueba de Oxidasa y Catalasa 33
5.5.1 Oxidasa 33
5.5.2. Catalasa 33

5.6. Identificación Bioquímica 33
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES 35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 35
7.1. Aislamiento de las bacterias de leche cruda y superficies. 35
7.2. Identificación de las Bacterias aisladas 49
7.3. Diferenciación de los resultados obtenidos en las muestras de leche cruda 57
7.4. Relevancia de las bacterias aisladas en la industria láctea. 59
8. CONCLUSIONES 64
9. RECOMENDACIONES 65
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Producción anual de leche fresca en el año 2018. 18

Figura 2 Producción de leche en el periodo 2012-2019. 20

Figura 3 Acopio anual de leche región 1. 21

Figura 4 Fuente de contaminación microbiana de la leche cruda a nivel de granja. 25

Figura 5 Morfología de los principales grupos de microorganismos comúnmente encontrados en la leche cruda. 26

Figura 6 Diagrama de flujo de la metodología desarrollada. 34

Figura 7 Características macroscópica y microscópica de algunos de los aislamientos obtenidos en TSA. 36

Figura 8 Total de pruebas positivas para las pruebas de oxidasa y catalasa. 39

Figura 9 Total, de características presentadas en los aislamientos obtenidos. 47

Figura 10 Clasificación de las bacterias aisladas a partir del muestreo de superficies. 55

Figura 11 Fluoresencia generada por Pseudomonas fluorescens. 62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Composición de la leche. 22

Tabla 2 Características fisicoquímicas de la leche..... 24

Tabla 3 Resultados obtenidos en pruebas de oxidasa, catalasa y tinción de Gram..... 37

Tabla 4 Descripción macroscópica, microscópica y condición de crecimiento de las bacterias aisladas de muestras de leche cruda..... 41

Tabla 5 Descripción morfológica macroscópica, microscópica y condición de crecimiento de las bacterias aisladas de muestras de superficies..... 44

Tabla 6 Identificación bioquímica de las cepas asociadas a las muestras de leche cruda mediante los resultados obtenidos por Vitek Compact 2. 49

Tabla 7 Clasificación bacteriana de los aislados a partir de la leche cruda. 51

Tabla 8 Identificación bioquímica de las cepas asociadas al muestreo de superficies en silos, canaletas y equipos mediante los resultados obtenidos por Vitek Compact 2..... 53

Tabla 9 Comparativa de los aislamientos obtenidos en los diferentes tipos de materia prima.... 57

Tabla 10 Microorganismos identificados a partir de las cepas aisladas. 59

RESUMEN

La calidad microbiológica de la leche cruda y de las superficies de contacto juegan un papel determinante en la calidad de los productos, estando directamente relacionados con la generación de enfermedades transmitidas por alimentos que podrían estar afectando a la seguridad alimentaria. El objetivo de este proyecto se basó en caracterizar las bacterias de la leche cruda y de las superficies de una planta de procesamiento de productos lácteos. Para esto se recolectó un total de 20 muestras correspondientes a leche cruda e hisopados de superficies entre equipos, silos y canaletas de las cuales se lograron aislar 43 cepas en donde se encontró una prevalencia del 40% de microorganismos patógenos, 35% de indicadores, 9% de alterantes y un 14% entre microbiota ambiental y humana, concluyendo que la microbiota presente difiere de lugar de muestreo y que los procesos térmicos si están siendo efectivos, sin embargo se resalta la presencia de algunos microorganismos patógenos y alterantes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Stenotrophomonas maltophilia*, en las superficies que más adelante podrían ser un problema en los productos terminados de la planta de procesamiento.

ABSTRACT

The microbiological quality of raw milk and contact surfaces play a determining role in the quality of the products, being directly related to the generation of foodborne diseases that could be affecting food safety. The objective of this project was based on characterizing the bacteria in raw milk and on the surfaces of a dairy processing plant. For this, a total of 20 samples corresponding to raw milk and swabs from surfaces between equipment, silos and gutters were collected, from which 43 strains were isolated where a prevalence of 40% of pathogenic microorganisms was found, 35% of indicators, 9 % of spoilers and 14% between environmental and human microbiota, concluding that the present microbiota differs from the sampling site and that the thermal processes are being effective, however the presence of some pathogenic and spoilage microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Stenotrophomonas maltophilia*, on surfaces that could later be a problem in finished products from the processing plant.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de leche es uno de los pilares fundamentales en muchos de los hogares a nivel mundial, ésta es generada por grandes y pequeños ganaderos que a lo largo de la cadena productiva aportan a la seguridad alimentaria y a la nutrición (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - [FAO], 2022-1). Incluso en Colombia, de acuerdo con la superintendencia de industria y comercio en el periodo del 2010 al 2020, se registró un total de 7.211 millones de litros de leche cruda gracias a los 321.000 productores de leche, lo cual indica que, a lo largo de la historia de nuestro país, es considerada como un alimento fundamental de consumo diario (Superintendencia de Industria y Comercio, 2021).

Estudios previos han señalado la importancia que poseen las superficies inertes de contacto pueden ser un gran espacio para permitir que varios microorganismos sean capaces de persistir por varios periodos de tiempo, incluso en equipos de acero inoxidable o en ambientes controlados (Caro & Tobar, 2019). Sin embargo, debido a su alto valor nutritivo la leche es uno de los alimentos con mayor probabilidad de deterioro, favoreciendo el desarrollo de una gran variedad de microorganismos patógenos y alterantes; entre los microorganismos patógenos más comúnmente encontrados se puede mencionar a *Clostridum botulimun, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Salmonella* spp., *Bacillus cereus, Mycobacterium bovis, Yersinia enterocolitica*, entre muchos otros (FAO, 2022-2).

Así mismo, otra fuente importante de contaminación de leche cruda e incluso de muchos productos lácteos pueden ser las superficies de contacto y equipos, pues estas sirven como reservorio para muchos agentes microbianos en especial para aquellas bacterias capaces de producir biofilms y de este modo afectar la calidad final de los productos. Por tanto, la presencia de microorganismos en superficies en los últimos años ha adquirido un papel fundamental ya que

es una de las principales fuentes de contaminación de diferentes productos alimenticios (Fuster-Valls, 2006).

En función de lo mencionado, el objetivo principal de este proyecto de investigación fue identificar los microorganismos presentes en la leche cruda y en las superficies y/o equipos de una planta de procesamiento de productos lácteos ubicada en Funza, Cundinamarca. Esto se logró gracias a los diferentes aislamientos realizados con microbiología tradicional y con determinaciones bioquímicas automatizadas, las cuales permitieron identificar los microorganismos recuperados. Los resultados obtenidos a partir del muestreo de leche cruda y de superficies, permitieron tener un panorama sobre la calidad y la inocuidad de los procesos empleados en la planta de procesamiento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Identificar las bacterias de muestras de leche cruda y de las superficies de una planta de procesamiento de productos lácteos.

2.2. Objetivos Específicos

- Aislar las bacterias presentes en muestras de leche cruda y las superficies de una planta de procesamiento de productos lácteos.
- Identificar las bacterias de la leche cruda y de las superficies de una planta de procesamiento de productos lácteos mediante caracterización bioquímica.
- Diferenciar las bacterias presente en la leche de la sabana y la leche proveniente de San Pedro de los milagros, Antioquia.
- Determinar la importancia en la industria láctea de las bacterias aisladas de la leche cruda y de las superficies de una planta de procesamiento de productos lácteos

3. JUSTIFICACIÓN

La leche es uno de los productos de mayor importancia a nivel nacional, por esta razón se debe asegurar a los consumidores que en cada uno de los procesos realizados en el sector lácteo incluyan estándares de calidad. Es importante mencionar que dependiendo de la calidad y/o características de la leche es la recompensa monetaria brindada por las industrias, puesto que con ella se pueden producir gran cantidad de derivados lácteos que aportan sin duda a la economía del país (Asociación Colombiana de Procesadores de la Leche – [Asoleche], 2017).

Sin embargo, la industria láctea en muchas ocasiones se ve afectada por factores que influyen en la calidad de la leche, esto está relacionado con las prácticas de ordeño, programas erróneos de limpieza y desinfección e incluso practicas inadecuadas de manipulación sanitaria, lo cual genera que el producto final se vea afectado (FAO, 2022-3). Según el Instituto Nacional de Salud (INS), en Colombia gran parte de las enfermedades son causadas por bacterias, virus, hongos e incluso parásitos siendo estos transmitidos por medio de los alimentos y generando Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)., De acuerdo con los reportes realizados en el año 2019 se generaron alrededor de 1010 brotes que afectaron a población de todas de las edades (Instituto Nacional de Salud [INS], 2019, p. 2-4).

Tras mencionar las implicaciones y/o riesgos que pueden generar los procesos erróneos de obtención de leche cruda, se debe mencionar otro factor crucial en los procesos de contaminación cruzada, el cual está relacionado con los equipos o superficies que tienen contacto con la materia prima e incluso con los productos terminados, puesto que una vez se presentan las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano, estos pueden generar mecanismos de resistencia como es el caso de las biopelículas generando problemas incluso en los procesos de desinfección (Ríos-Castillo, 2013).

Acorde a los resultados obtenidos en este proyecto, se permitió conocer sobre aquellas bacterias que podrían tener algún impacto negativo en la planta de procesamiento, ya sea porque están relacionados a procesos que son llevados a cabo de manera interna o porque están arraigados y su presencia se relaciona con la materia prima. Con este conocimiento se buscó generar medidas preventivas y/o correctivas que permitan apoyar los planes de monitoreo que se desarrollan actualmente.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Sector Lácteo a Nivel Mundial

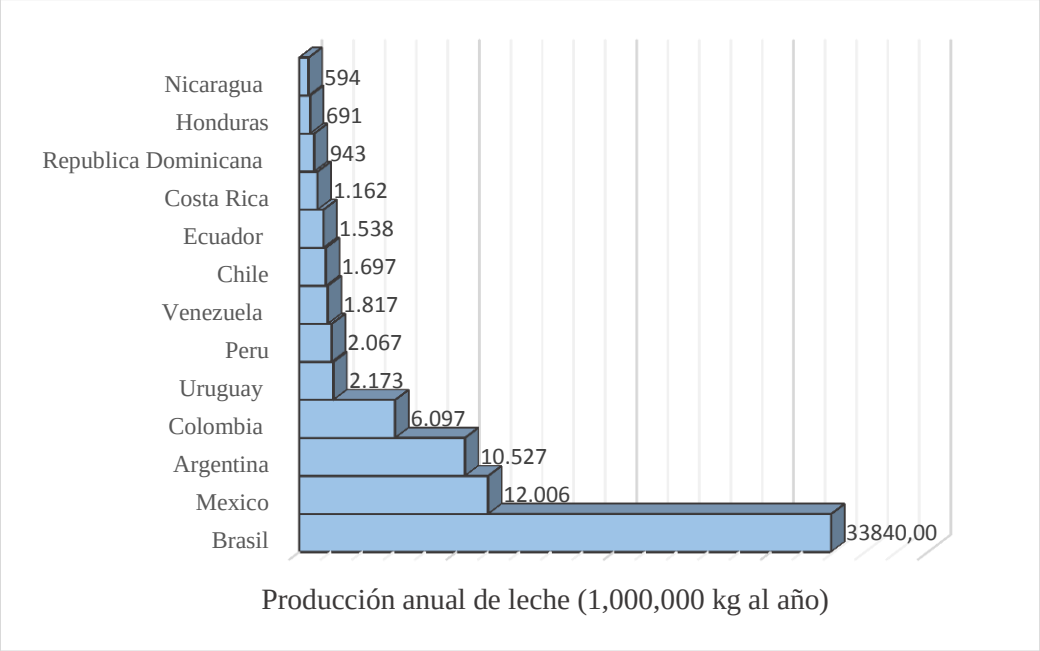
Debido a su alto valor nutricional la leche es considerada como uno de los alimentos primordiales en especial en los primeros años de vida; según la definición de leche dada por el Ministerio de Protección Social, Decreto 616 del 2006 en el Artículo 3, "*La leche es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior*".

A nivel mundial la leche entera fresca es considerada una de las materias primas de mayor producción y de más aporte económico, esta es obtenida por diferentes tipos de ganado representando los siguientes porcentajes; la leche de especies poco comunes como los camellos, yaks, renos entre otros animales representa un valor global de producción de un 0,5%, seguida del ganado ovino con un 1,2% y de ganado caprino con 2,4%, resaltando que los dos animales que más cantidad de leche producen son los bufalinos con un 15,3% y los vacunos con el 80,8%; en 2020 la producción total de leche excedió los volúmenes obtenidos en comparación a años anteriores logrando generar 910 millones de toneladas, a causa del aumento en la obtención de leche de búfala y de vaca en India (Observatorio de la Cadena Láctea Argentina [OCLA], 2022).

La cantidad de leche producida en América Latina y el Caribe (ALC) a lo largo de los años puede verse influencia por 3 variables determinantes: la producción anual de leche por ganado vacuno, el número de granjas por país y el número de ganado vacuno por granja, estos factores mencionados pueden ser determinantes en la producción de leche anual (Fariña et al., 2022).

En la figura 1 se muestra la producción de leche entera fresca producida en el año 2018 ocupando Brasil el primer lugar con 33.840 litros y Colombia el cuarto con 6.097 litros de leche (Fariña et al., 2022).

Figura 1
Producción anual de leche fresca en el año 2018.



Nota: El gráfico representa la producción de leche anual en latino América en el año 2018. Fuente: Fariña et al., 2022.

A lo largo de los años América Latina y el Caribe (ALC) aumentó un 42% logrando una producción de 22.400 millones de leche entre los años 1998 al 2018, sin embargo, no todos los países lograron aumentar su producción puesto que Chile, Argentina, Ecuador y Colombia mantuvieron su nivel de producción mientras que el resto de los países lograron aumentar entre un 0,5 y 5 % (Fariña et al., 2022).

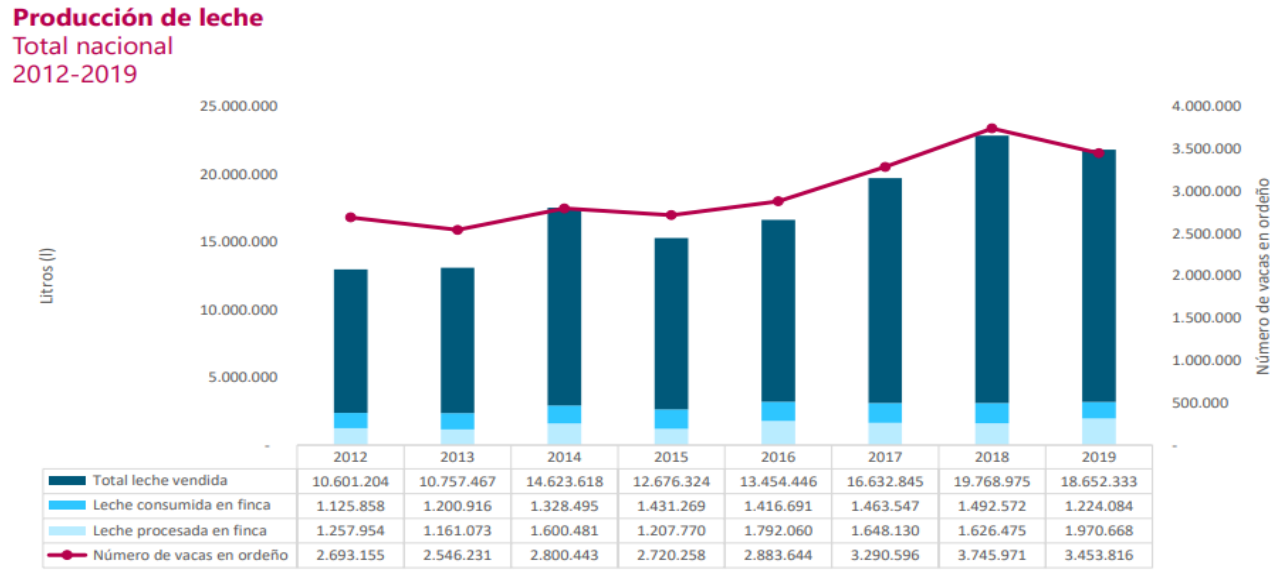
4.2. Sector Lácteo Nacional

Según el Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. (2016), en Colombia *"El sector Lácteo está compuesto por una cadena de seis eslabones: los productores primarios, los encargados del acopio de leche cruda, los procesadores, los comercializadores de productos lácteo, el consumidor final y los proveedores de insumos y servicios son transversales que impactan toda la cadena".*

De manera histórica en Colombia una de las actividades con mayor aporte económico y mayor actividad agropecuaria ha sido la producción de leche, a causa de sus características nutricionales y de su calidad, puesto que la leche también es utilizada para generar una gran cantidad de derivados lácteos que aportan a la alimentación, por tanto velar por su calidad se ha convertido en uno de los puntos más importantes a lo largo de la cadena productiva no solo para que cumpla con estándares de calidad, si no también debido a que depende de sus características es el valor monetario otorgado hacia los productores (Superintendencia de Industria y Comercio., 2021). La producción de leche en el territorio nacional desde el 2012 al 2019 ha tenido cambios significativos en producción de leche por litro (ver figura 2).

Figura 2

Producción de leche en el periodo 2012-2019.



	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Total leche vendida	10.601.204	10.757.467	14.623.618	12.676.324	13.454.446	16.632.845	19.768.975	18.652.333
Leche consumida en finca	1.125.858	1.200.916	1.328.495	1.431.269	1.416.691	1.463.547	1.492.572	1.224.084
Leche procesada en finca	1.257.954	1.161.073	1.600.481	1.207.770	1.792.060	1.648.130	1.626.475	1.970.668
Número de vacas en ordeño	2.693.155	2.546.231	2.800.443	2.720.258	2.883.644	3.290.596	3.745.971	3.453.816

Nota: La gráfica representa la producción total de leche a nivel nacional entre el periodo 2012-2019. Fuente: Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE

], 2020.

4.3. Sector Lácteo Regional

En Colombia se encuentran dos regiones que están divididas de acuerdo con la cantidad de leche que producen de manera anual, la primera de estas regiones aporta alrededor del 19% del volumen de leche recolectado por medio de canales oficiales o institucionales; entre los departamentos que son participes de este porcentaje se encuentran, Arauca, Amazonia, Sucre, La Guajira, Caquetá, Norte de Santander, Bolívar, Córdoba, Meta, Tolima, Cesar, Santander, Magdalena, Choco y la segunda región alcanza un 81% del volumen de leche recolectado a nivel nacional; en ella se encuentran los departamentos de Nariño, Quindío, Valle del Cauca, Risaralda, Caldas, Cauca, Boyacá, Antioquia y Cundinamarca (Garzón-Nivia, 2018).

Cundinamarca en el año 2013 registró un aporte de 5,4 millones de litros de leche cruda al día siendo esto un 19,3% del aporte a nivel nacional, esto según lo mencionado por la Federación Colombiana de Ganaderos (Fedegán)- Fondo Nacional del Ganado (2014). Después de Antioquia, Cundinamarca durante el periodo del 2018 al 2020, fue uno de los mayores productores de leche a nivel nacional, alcanzando un total de 221.693.271 litros de leche cruda acopiados en el año 2020 (ver figura 3) (Asoleche, 2020).

Figura 3

Acopio anual de leche región 1.



	ANTIOQUIA	BOYACÁ	CALDAS	CAUCA	CUNDINAMARCA	NARIÑO	QUINDÍO	RISARALDA	VALLE DEL CAUCA	TOTAL REGIÓN 1
2018*	313.091.458	56.257.785	20.785.602	6.313.044	248.785.725	27.465.103	11.711.439	3.235.514	16.194.688	703.840.359
2019*	286.417.959	60.141.880	17.095.536	6.234.445	217.687.363	28.505.506	10.627.891	3.333.215	12.354.927	642.398.721
2020*	317.665.036	61.430.215	14.545.222	5.611.196	221.693.271	31.032.013	8.384.385	3.326.511	13.475.175	677.163.024

Nota: En la gráfica se observa el volumen de leche anual recolectado en desde el año 2018 – 2020. Fuente: Asoleche 2020.

4.4. Composición de la Leche

Las caracteristicas nutricionales de la leche pueden verse influenciadas por factores tanto cualitativos como cuantitavos en las que se puede mencionar su composición, ya que esta puede variar dependiendo de la raza del animal, el tipo de alimentacion, etapa de lactancia e incluso por factores externos; entre los principales componentes de la leche podemos encontrar proteinas,

grasas, caseina, albumina, cenizas e hidratos de carbono que estan en pequeñas cantidades y el componente de mayor porcentaje hace referencia al agua, en la tabla 1 se muestra los componentes de la leche en porcentaje y su variación con el tipo de leche (López & Barriga, 2016).

Tabla 1
Composición de la leche.

Componentes (%)	**Tipo de leche**		
	Vaca	Cabra	Oveja
Agua	87,5	87,9	80,1
Proteínas	3,2	3,4	6,2
Grasas	3,6	3,8	7,9
Hidratos de carbono	4,7	4,1	4,9
Caseína	2,6	2,4	4,2
Albúmina, globulina	0,6	0,6	1,0
Cenizas	0,7	0,8	0,9

Fuente: López & Barriga, 2016.

Como se mencionaba anteriormente algunos componentes están en menor proporción en la leche en comparación con el agua, pero sin duda son parte fundamental de los valores nutricionales de la leche, uno de ellos son las proteínas las cuales hacen parte del elemento más importante desde el punto de vista nutricional, además son muy significativas en los procesos industriales ya que gracias a ellas se pueden realizar los procesos de elaboración de diferentes derivados lácteos como es el caso de los quesos (López & Barriga, 2016). La proteína más importante de la leche es la caseína ocupando el 80%. En cuanto a los lípidos, también son parte

fundamental de la leche debido a las características fisicoquímicas y organolépticas que le brindan. El 98% del perfil lipídico de la leche corresponde a los triglicéridos y el porcentaje restante hace parte de los fosfolípidos; asimismo, otro componente importante en la leche pertenece a la lactosa, el cual es un disacárido compuesto por galactosa y glucosa, siendo estos utilizados en nuestro organismo como fuente de energía. Finalmente, el agua que ocupa un porcentaje entre el 80 y 90% de la leche cruda (López & Barriga, 2016).

4.5. Características Fisicoquímicas

"Las características fisicoquímicas de la leche dependen fundamentalmente de la concentración y del grado de distribución de las partículas de sus componentes." (Zamora-Antia, 2006).

En la leche, la composición fisicoquímica es un factor determinante, esto debido a que a partir de los resultados se pudo determinar ver si la leche presenta alguna alteración, modificación o incluso determinar la presencia de sustancias u organismos que no hacen parte de ella y que afectan su composición química (López, & Barriga. 2016). Los rangos fisicoquímicos para la leche cruda están establecidos por el Ministerio de Protección social, en el decreto 616 de 2006 como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2
Características fisicoquímicas de la leche.

Parámetro /Unidad	Leche cruda	
Grasa % m / v mínimo	3.00	
Extracto seco total % m / m mínimo	11.30	
Extracto seco desengrasado % m / m mínimo	8.30	
	Min.	Max.
Densidad 15/15°C g/ml	1.030	1.033
Índice Lactométrico	8.40	
Acidez expresada como ácido láctico %m/v	0.13	0.17
Índice °C	-0.530	-0.510
Crioscópico °H	-0.550	-0.530

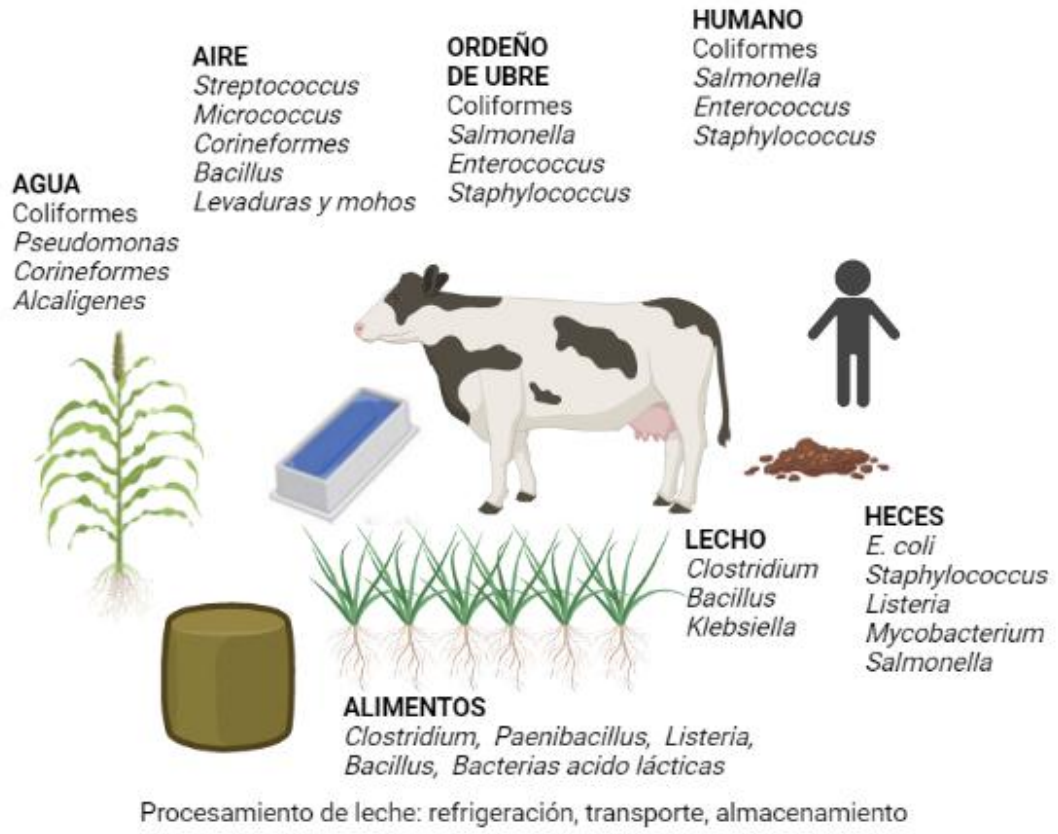
Nota: las siglas corresponden a los siguientes significados m: masa., v: volumen., g: gramo., ml: mililitro Fuente: Ministerio de Protección social, decreto 616 de 2006.

4.6. Bacterias en Leche Cruda

La leche cruda tiene una gran cantidad de Actividad acuosa (Aw) disponible en el medio, un alto valor nutricional y un pH neutro, esto la hace susceptible a contaminación bacteriana, generando alteraciones en sus características fisicoquímicas; dicha contaminación puede ocasionarse en los procesos de ordeño, equipos usados, transporte o almacenamiento (figura 4) (Olajide & LaPointe, 2022).

Figura 4

Fuente de contaminación microbiana de la leche cruda a nivel de granja.

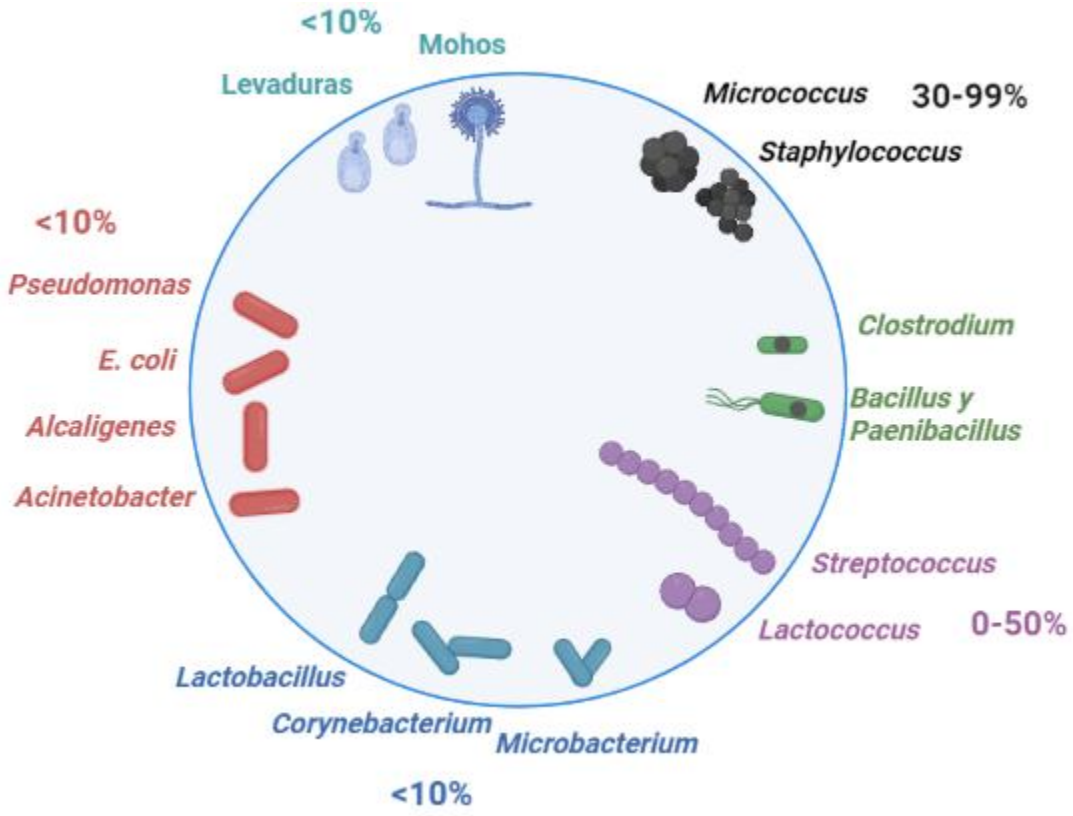


Fuente: Olajide & LaPointe, 2022.

La leche cruda inicialmente es considerada como un producto inocuo, sin embargo, al momento de su obtención puede verse expuesta a contaminantes externos, una vez se contamina deja de ser apta para consumo directo (Pineda-Portugal, 2014). Los diferentes géneros bacterianos pueden usar los valores nutricionales de la leche para su crecimiento, presentando diferentes morfologías e incluso pueden ser parte de diferentes grupos como patógenos (*Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7), alterantes (*Streptococcus lactis*, *Pseudomona Synxantha*, *Alcaligenes* spp, *Flavobacterium* y algunos coliformes) o beneficiosos (ver figura 5) (Olajide & LaPointe, 2022).

Figura 5

Morfología de los principales grupos de microorganismos comúnmente encontrados en la leche cruda.



Fuente: Olajide & LaPointe, 2022.

4.7. Buenas Prácticas de Ordeño y Buenas Prácticas Ganaderas

Los procesos de buenas prácticas de ordeño están establecidos con la finalidad de conseguir procesos de calidad y evitar o disminuir las posibilidades de contaminación cruzada; algunas de las especificaciones establecidas para estas prácticas incluyen, el lavado correcto de manos, así como también uñas cortas, cabello recogido, manos sin heridas y overol limpio, esto, debido a que en muchas ocasiones los procesos de ordeño se realizan manualmente y se tiene contacto directo con la materia prima; por otro lado, también es importante espacios específicos

que sean de uso exclusivo para la recolección leche como es el caso de equipos, insumos, establos o cuartos de insumos (FAO 2012).

En Colombia la entidad encargada de velar por que se lleven a cabo las buenas prácticas ganaderas es el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Algunos de los aspectos que se encarga de verificar son higiene en el ordeño, instalaciones y áreas de producción primaria, plan de saneamiento, sanidad animal, identificación y bioseguridad**,** bienestar animal y personal, uso de medicamentos veterinarios (BPUMV) y Buenas Prácticas en la Alimentación Animal- BPAA. (ICA Resolución 2304 de 2015). Según lo mencionado por FEDEGAN las buenas prácticas ganaderas hacen referencia "*a todas las acciones involucradas en el eslabón primario de la ganadería bovina, encaminadas al aseguramiento de la inocuidad de los alimentos carne y leche, la protección del medio ambiente y de las personas que trabajan en la explotación*" (Federación Colombiana de Ganaderos [FEDEGAN], 2023).

4.8. Superficies de Contacto

Las superficies también hacen parte de las fuentes importantes de contaminación para los alimentos, por lo que en la industria láctea se tienen en cuenta los diferentes planes que aporten al sistema de gestión de inocuidad. Algunos de ellos son el sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos críticos (HACCP), los estándares de Saneamiento (POES) y las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (Michanie, 2013).

Las bacterias son microorganismos que pueden tener capacidades adaptativas, en este caso si las superficies presentan condiciones óptimas para el crecimiento microbiano, proliferaran en este ambiente generando mecanismos de resistencia como es el caso de las

biopelículas, una vez generadas estas biopelículas incluso los procesos de limpieza y desinfección pueden verse afectados puesto que pueden llegar a ser resistentes y a sobrevivir en muchas plantas de procesamiento por periodos extensos aumentando el nivel riesgo por contaminación de los alimentos una vez tengan contacto con estas superficies (Cha & Ha, 2022).

4.9.Métodos automatizados de identificación bacteriana

Los métodos implementados para realizar identificaciones bacterianas se empezaron a utilizar desde 1970, desde ese momento a lo largo del tiempo han ido evolucionando de manera periódica (Stager & Davis, 1992). Gracias a los avances que se han tenido a lo largo de la historia con los sistemas de identificación, estos son de gran ayuda en los laboratorios microbiológicos, ya que se implementan en industrias de alimentos, clínicas o farmacéuticas con el fin de obtener resultados confiables y precisos en periodos de tiempo mas cortos, aportando a la confiabilidad y trazabilidad de los datos obtenidos; algunos de los métodos mas implementados son el Vitek l y ll, Phoenix y MicroScan (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2011).

Actualmente el Vitek compact 2 es uno de los mas utilizados, puesto que su capacidad para optimizar la productividad y la precisión de los datos es de gran ayuda en diferentes industrias, este equipo se basa en permitir una inoculación bacteriana dependiendo de las tarjetas de identificación implementadas siendo capaz de realizar una identificación microbiana (ID) a partir de los patrones de memoria, operando en combinación con el sistema experto avanzado (AES), conteniendo una extensa base de datos lo cual permite validar los resultados obtenidos. (Laboratorio Clínico de Especialidades Bolívar., 2022).

4.10. Normativa

En Colombia, existen algunas normativas que reglamentan los requisitos que se deben cumplir tanto en la leche cruda como en su etapa de recepción y en productos finales, estos reglamentos lo que quiere lograr es que en todo el territorio nacional se distribuyan productos inocuos y de calidad que cumplan con las necesidades de la canasta familiar.

Decretos:

Ministerio de la Protección Social. Decreto 616 del 2006: Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expenda, importe o exporte en el país.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 2838 del 2006: Por el cual se modifica parcialmente el Decreto 616 de 2006 y se dictan otras disposiciones.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 3411 del 2008: por el cual se modifica parcialmente el Decreto 2838 de 2006, modificado parcialmente por el Decreto 2964 de 2008, y se dictan otras disposiciones.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 1880 del 2011: Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional.

Resoluciones:

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 4142 de 2012: Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales, objetos, envases y equipamientos metálicos destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano en el territorio nacional.

5. METODOLOGÍA

5.1. Proceso de Muestreo

Para la recolección de las muestras se usaron tres procedimientos diferentes, de los cuales dos de ellos se utilizaron para la obtención de la leche cruda y uno para el muestreo de superficies. Teniendo en cuenta dichos procedimientos se logró recolectar un total de 19 muestras de las cuales 6 correspondían a muestras de leche cruda de la Sabana de Cundinamarca y de San Pedro, Antioquia y 13 pertenecientes al muestreo de superficies realizado.

5.1.1. Muestreo de leche cruda en mulas

El proceso de muestreo comenzó con ayuda de un operario de recibo de leche, quien homogenizó la materia prima contenida en los carrotanques con ayuda de un agitador manual de acero inoxidable, posteriormente en un frasco estéril de tapa precinto se tomó 50 ml de muestra, posteriormente fueron llevadas al laboratorio para su respectivo análisis.

5.1.2. Muestreo de leche cruda de silos

Se hizo desinfección con alcohol al 75% a la boquilla del silo y con un encendedor se flameó. Posteriormente se dejó correr la leche cruda por 5 segundos en una jarra plástica y pasado este tiempo se tomó la muestra de leche cruda en un frasco estéril de tapa precinto, se tomó 50 ml de muestra e inmediatamente se llevaron al laboratorio para su posterior análisis.

Las muestras de leche cruda se pre incubaron a 35°C durante 4 horas con el fin de estimular el crecimiento bacteriano y de esta manera poder recuperar la mayor cantidad de bacterias presentes en la leche cruda.

5.1.3. Muestreo de superficies

En cada muestreo se utilizaron dos hisopos estériles, los cuales se humedecieron en caldo BHI (Infusión cerebro corazón) y se pusieron en contacto en las zonas previamente establecidas. Se tomó un hisopado de 10x10 cm, estos frotis se realizaron en superficies planas y en superficies irregulares de difícil acceso como lo son silos, equipos y canaletas. Una vez realizado el frotis, los hisopos se sumergieron nuevamente en tubos de ensayo plásticos contenidos con 4 ml de caldo BHI y se llevaron a incubación de 35°C durante 24 horas.

5.2. Aislamiento Bacteriológico de la Leche Cruda

El aislamiento se realizó con base en las indicaciones brindadas por el Método ISO (4833: 2013) realizando algunas modificaciones. Este procedimiento consistió en sembrar por superficie algunas diluciones e incubar a temperaturas de 35°C en aerobiosis y anaerobiosis, a 55°C en aerobiosis, a 3,5 °C en aerobiosis y a 25 °C en aerobiosis durante 24 - 48 horas. Las modificaciones realizadas consistieron en cambiar la siembra por profundidad a superficie, no sembrar por duplicado, usar agar TSA y diferentes rangos de temperatura. (Agar Triptona-Soja).

Inicialmente se llevó a cabo una pre-incubación de cada una de las muestras de leche cruda durante 4 horas, posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 10^{-2} y 10^{-3} de estas diluciones se tomaron 100 ul y se inocularon sobre la superficie del agar TSA. Con ayuda de una espátula de Drigalsky estéril de acero inoxidable, se extendió la muestra sobre la superficie del agar y se llevó a incubar a cada una de las temperaturas mencionadas anteriormente durante 24 - 48h.

5.3. Aislamiento Bacteriológico de Superficies

Este aislamiento se realizó de acuerdo con lo establecido en la NTC 5230 de 2017. La metodología descrita se realizó con el fin de poder obtener una identificación microbiana y no para enumeración. De acuerdo a la suspensión inicial obtenida en el muestreo como se mencionó anteriormente, se llevaron a incubar los tubos de BHI con los hisopos por un periodo de 24 horas, pasado este tiempo se realizó una siembra directa tomando 100 ul de la suspensión e inoculando en medio TSA. Con ayuda de una espátula de Drigalsky estéril de acero inoxidable, se extendió la muestra sobre la superficie del agar y se llevó a incubar a temperaturas de 35°C en aerobiosis y anaerobiosis, a 55°C en aerobiosis, a 3,5 °C en aerobiosis y a 25 °C en aerobiosis durante 24 - 48 horas.

Finalmente, para ambas metodologías se realizaron nuevos repiques de las distintas colonias siguiendo las características mencionadas por Vargas & Vargas., (2014) donde se puede mencionar tamaño, color, textura y forma con el objetivo de aislar cada una de las cepas presentadas en cada muestra y de esta manera poder proceder con el proceso de identificación.

5.4. Tinción de Gram

Todas las cepas obtenidas de manera axénica fueron llevadas a determinación macroscópica y microscópica con el fin de conocer sus características morfológicas. Para ello se empleó el uso del sistema de tinción de Gram automatizado PREVI Color Gram de bioMérieux, Inc; este equipo permite hacer una tinción de 12 láminas de portaobjetos en un tiempo total de 5.1 minutos; donde se emplean 35 segundos de cristal violeta un lavado con un tiempo de 25 segundos, solución de yodo durante 30 segundos, 33 segundos de un segundo lavado, 39 segundos de decoloración, 20 segundos del tercer lavado, 70 segundos de fuscina y finalmente 55 segundos de secado; este último paso permite que las láminas salgan listas para observar de

manera inmediata en el microscopio logrando obtener resultados rápidos, precisos y estandarizados (bioMérieux., 2009).

5.5. Prueba de Oxidasa y Catalasa

5.5.1 Oxidasa

La determinación de oxidasa se llevo acabo empleando el uso de Microbiología Bactident® Oxidasa (Merck., 2007), se tomó una colonia de los cultivos axénicos con asa plástica de inoculación y se frotó sobre la zona reactiva de la varilla, después de 60 segundos el resultado se comparó con la escala colorimétrica dada por el fabricante.

5.5.2. Catalasa

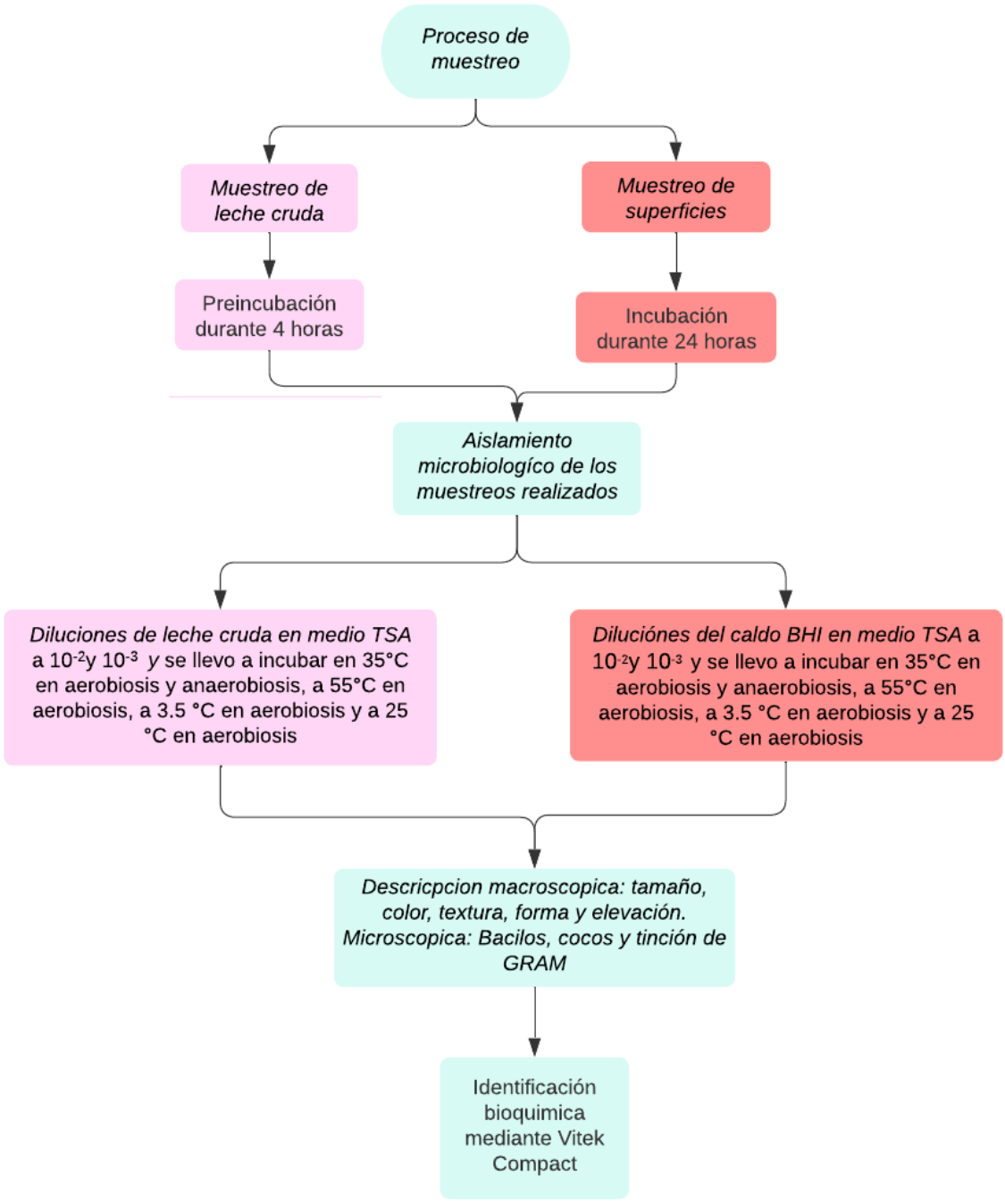
Se utilizó un portaobjetos donde se colocó peróxido de hidrogeno, posteriormente se tomo una colonia de los cultivos axénicos con asa plástica de inoculación y se realizó un frotis encima del portaobjetos (Pascual-Anderson y Calderón., 2000).

5.6. Identificación Bioquímica

Para llevar a cabo el proceso de identificación se realizó un repique de las cepas axénicas 24 horas antes al envió hacía un laboratorio externo el cual se encargó de emplear el uso del sistema de identificación Vitek Compact 2, este permitió la identificación microbiana de una gran variedad de bacterias que se encuentran relacionados con la contaminación de materias primas y productos terminados, relacionándose con las características bioquímicas de las bacterias; su sistema de identificación y su porcentaje de confianza se respaldan en la base de datos Vitek la cual garantiza la exactitud de los resultados para esto se emplearon tarjetas GN (BACILOS GRAM NEGATIVOS), GP (COCOS GRAM POSITIVOS) Y BCL (BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS) bioMérieux Industry (2023).

En la Figura 6 se presenta la metodología desarrollada de forma general durante el proyecto.

Figura 6
Diagrama de flujo de la metodología desarrollada.



Fuente: autor.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES		
SEMANALES Agosto-Febrero	SIEMBRA DE QUESO PERA	DIARIAS Agosto-Febrero	SIEMBRA DE CREMA DE LECHE
	SIEMBRA DE JUGOS		ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS
	SIEMBRA DE REFRESCOS		ANÁLISIS DE ENJUAGUES
	SIEMBRA DE INSUMOS		MUESTREO DE AMBIENTES
	SIEMBRA DE MATERIA PRIMA		MUESTREO DE SUPERFICIES
	SIEMBRA DE PRODUCTO EN PROCESO		MUESTREO DE PRODUCTO TERMINADO
	ANÁLISIS DE VIDA ÚTIL DE PRODUCTO TERMINADO		MANEJO DE CEPARIO
	ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS		AISLAMIENTO DE CEPAS NATIVAS
	ANÁLISIS DE AGUA POTABLE		PREPARACIÓN DE INÓCULOS MICROBIANOS
	ANÁLISIS DE ALIMENTOS		EJECUCIÓN DE PRUEBAS DE SELECTIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD
	MUESTREO DE INSUMOS		AISLAMIENTO *B. sporothermodurans* (crítico para el proceso)
	MUESTREO DE MANIPULADORES		CONTROL METROLÓGICO DE EQUIPOS
	MUESTREO DE ALIMENTOS		MANEJO DE INVENTARIO
	MUESTREO PARA MICROORGANISMO PATÓGENOS		MANEJO DE PRODUCTO NO CONFORME
	DETECCIÓN DE ESPORAS MESOFILAS		EVALUACIÓN DE PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL
	SIEMBRA DE MUESTRAS PARA ESTERILIDAD COMERCIAL		MUESTREO DE EMPAQUES
	LECTURA Y REPORTE PRUEBA ESTERILIDAD COMERCIAL		LECTURA INSTRUCTIVOS Y PROCEDIMIENTOS
DIARIO Oct-Dic	RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA MUESTREO DE SUPERFICIES IDENTIFICACIÓN MICROBIANA ELABORACIÓN PROYECTO DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA		
SEMESTRE Agosto-Febrero	APOYO EN LA ELABORACIÓN DE INFORMES DEL PROCESO APOYO EN SIEMBRA DE PRODUCTO UHT		

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, la leche es uno de los productos más perecederos, debido a sus características fisicoquímicas y nutricionales. Esto permite el crecimiento de bacterias que pueden proliferar en la leche cruda y así mismo en insumos y/o equipos que a largo plazo podrían generar una contaminación cruzada y alterar la calidad de los productos. Es por ello que a continuación se muestran los resultados obtenidos en el proceso de caracterización de bacterias de muestras de leche cruda y del muestreo de superficies.

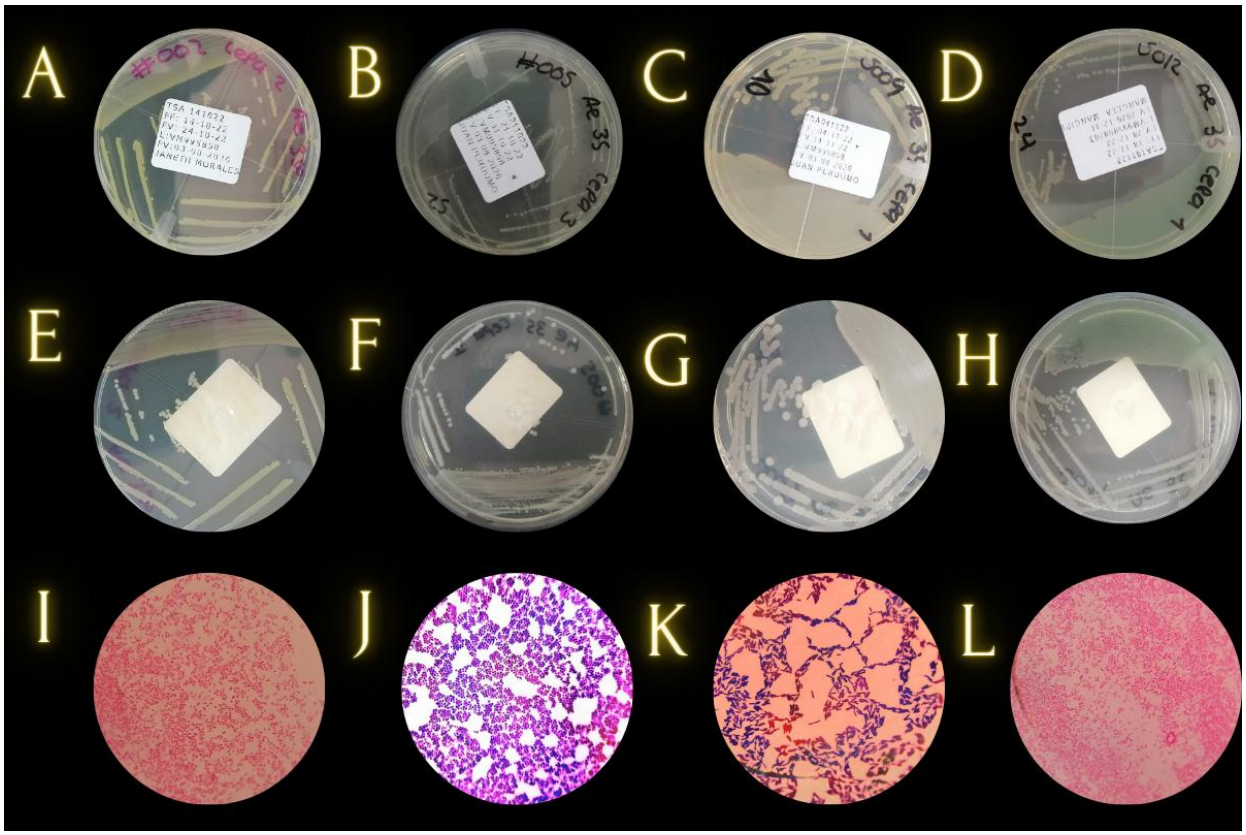
7.1. Aislamiento de las bacterias de leche cruda y superficies.

El aislamiento microbiano inicialmente se llevó a cabo teniendo en cuenta la diferencia macroscópica de las colonias considerando su color, pigmentación, bordeado, elevación, textura, comportamiento óptico (ver figura 7) y (Tablas 4 y 5), pruebas de oxidasa y catalasa (ver figura 8) y (tabla 3, 4 y 5). Así mismo se tuvo en cuenta sus características microscópicas como lo son forma y coloración como resultado de Gram, con fin de conseguir cepas axénicas para su

posterior identificación. Esto con el fin de poder determinar la importancia en la industria láctea de las bacterias aisladas de leche cruda y de superficies.

Figura 7

Características macroscópica y microscópica de algunos de los aislamientos obtenidos en TSA.



Nota: Cepas aisladas en medio de cultivo TSA A: #002 cepa 2; B #005 cepa 3; C S009 cepa 1; D S012 cepa 1: ANVERSO de las colonias. E 002 cepa; F #005 cepa; G S009 cepa 1; H S012 cepa 1 REVERSO de las colonias. I: #002 cepa 2, Bacilos Gram negativos; J: #005 cepa 3, Cocos Gram positivos; K: S009 cepa 1, Bacilos Gram positivos; L: S012 cepa 1, Bacilos Gram negativos Fuente: autor.

Las cepas aisladas en leche cruda y en superficies presentaron diferentes resultados en la determinación de oxidasa y catalasa (ver tabla 3). Es importante mencionar que se lograron

recuperar cepas aerobias y anaerobias de temperatura de 35°C y aerobias de 25 °C haciendo parte de bacterias mesófilos y psicrófilos respectivamente.

Tabla 3
Resultados obtenidos en pruebas de oxidasa, catalasa y tinción de Gram.

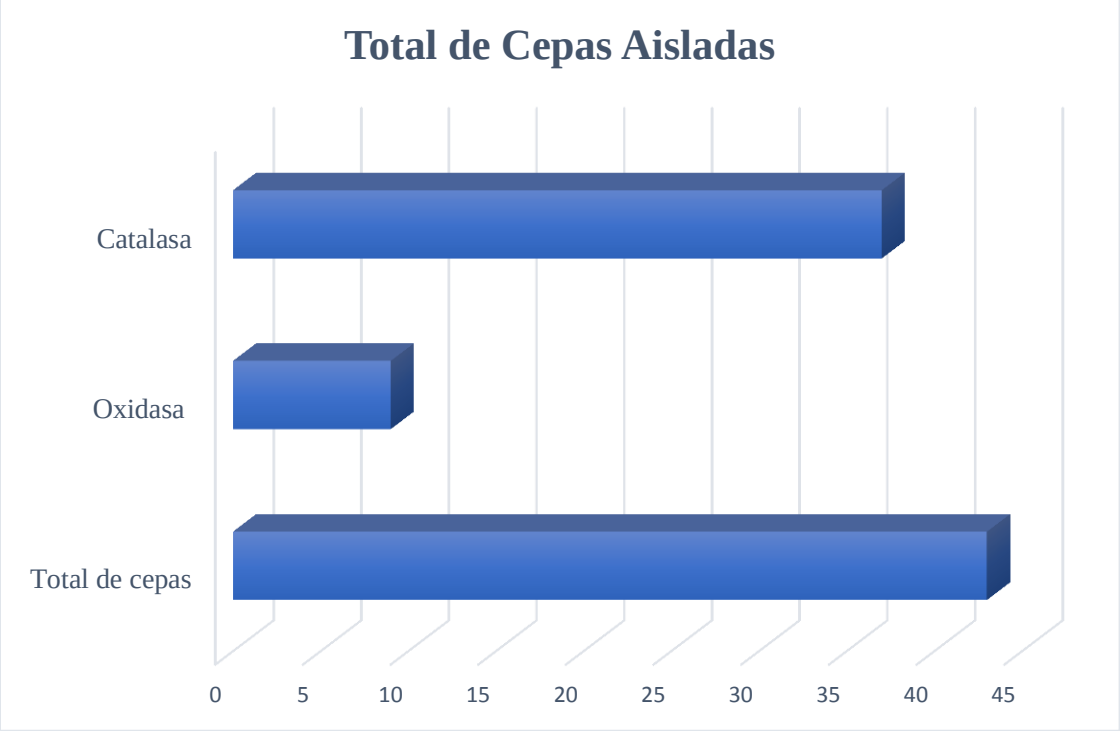
ID Asignado en planta	Oxidasa	Catalasa	Morfología Microscópica
#001 Cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#001 Cepa 2	Negativo	Negativo	Cocos Gram (+)
#002 Cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#002 Cepa 2	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#002 Cepa 3	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#002 Cepa 4	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#003 Cepa 1	Negativo	Negativo	Cocos Gram (+)
#003 Cepa 2	Negativo	Positivo	Cocos Gram (+)
#003 Cepa 3	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#003 An Cepa 1	Negativo	Negativo	Cocos Gram (+)
#004 Cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#004 Cepa 2	Negativo	Positivo	Cocos Gram (+)
#004 Cepa 3	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#004 An Cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#004 An Cepa 2	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#005 Cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#005 Cepa 3	Negativo	Negativo	Cocos Gram (+)
#006 Cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)

#006 An Cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#006 An Cepa 2	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S002 cepa 1	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S002 cepa 2	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S003 cepa 1	Negativo	Negativo	Cocos Gram (+)
#S003 cepa 1	Negativo	Negativo	Cocos Gram (+)
#S004 cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S004 cepa 2	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S004 An cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S005 cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S006 cepa 1	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S007 cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S008 Ae cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S002 PST cepa 1	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S008 cepa 2	Negativo	Positivo	Cocos Gram (+)
#S008 PST cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S008 cepa 3	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S009 cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (+)
#S010 PST cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S010 PST cepa 2	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S010 cepa 1	Negativo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S011 cepa 1	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S012 cepa 1	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)
#S013 cepa 1	Positivo	Positivo	Bacilos Gram (-)

Nota: Las siglas corresponden An: Anaerobio; PST: Psicrófilos. Fuente: autor

En la figura 8 se pueden observar los resultados obtenidos en la determinación de oxidasa y catalasa del total de aislamientos realizados.

Figura 8
Total de pruebas positivas para las pruebas de oxidasa y catalasa.



Fuente: autor.

Como se puede observar en la figura anterior, el total de cepas analizadas obtenidas a partir de los aislamientos de leche cruda y del muestreo de superficies, es de 43 muestras otorgando estas un 100% de los datos. De este total solo 9 de las cepas aisladas, es decir el 21%, arrojó un resultado positivo para la prueba de oxidasa. Del mismo modo solo 37 cepas, es decir

un 86% presentó un resultado positivo para la prueba de catalasa, todo esto se tuvo en cuenta junto con los resultados microscópicos y macroscópicos para la identificación de las cepas.

Las pruebas de catalasa, oxidasa y tinción de Gram juegan un papel importante en la identificación microbiana ya que permite conocer inicialmente algunas características de las bacterias. Una de ellas es que la enzima catalasa solo se encuentra presente en microorganismos aerobios o anaerobios facultativos, permitiendo que las bacterias crezcan en presencia de oxígeno. En cuanto a la oxidasa determina la presencia del citocromo c-oxidasa determinante en bacterias respiradoras (Madigan et al., 2015). Como se puede observar en la tabla 3 el 65% de los aislamientos es decir 28 de las cepas aisladas presentan una característica importante de las bacterias entéricas comprendidas en el grupo filogenético de las *Gammaproteobacterias*; ser catalasa positiva y oxidasa negativa; por otro lado, también encontramos a los *Pseudomonales* quienes se caracterizan por crecer en ambiente aerobios y ser catalasa y oxidasa positiva (Madigan et al., 2015), expresando estas un 21% de los resultados con 9 de las cepas aisladas. Finalmente, un 14% de las cepas obtenidas mostró un resultado de 6 cepas con oxidasa y catalasa negativa siendo esta una característica filogenética importante de los *Firmicutes*, comprendiendo el orden de los *Lactobacillales* conocidas como las bacterias de ácido láctico; estos dos factores junto con la tinción de Gram permitieron tener un resultado preliminar de las bacterias aisladas. (Madigan et al., 2015). Sin embargo, aunque estos resultados permiten tener un panorama de los posibles resultados es importante conocer los resultados de la identificación bioquímica.

Por otro lado, las cepas aisladas en leche cruda y en superficies presentaron diferentes características morfológicas al ser aisladas en el medio TSA, estas se describen de manera macroscópica y microscópica (ver tabla 4 y 5).

Tabla 4

Descripción macroscópica, microscópica y condición de crecimiento de las bacterias aisladas de muestras de leche cruda.

ID Asignado en planta	Morfología Macroscópica	Morfología Microscópica	Oxidasa	Catalasa	Condición
#001 Cepa 1	Colonias pequeñas, circulares, elevadas, margen entero, transparente, brillante, lisa, color crema.	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#001 Cepa 2	Colonias puntiformes, circulares, elevadas, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color blanco	Estreptococos Gram (+)	Negativo	Negativo	Aerobiosis
#002 Cepa 1	Colonias grandes, circulares, convexa, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#002 Cepa 2	Colonias puntiformes, circulares, elevadas, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color amarillo	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#002 Cepa 3	Colonias medianas, circulares, margen entero, planas, no transparente, brillante, lisa, color amarillo	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#002 Cepa 4	Colonias medianas, circulares, margen entero, convexa, no transparente, brillante, lisa, color crema	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#003 Cepa 1	Colonias puntiformes, circulares, margen entero, elevadas, no	Estreptococos Gram (+)	Negativo	Negativo	Aerobiosis

	transparente, brillante, lisa, color crema				
#003 Cepa 2	Colonias puntiformes, circulares, margen entero, elevadas, no transparente, brillante, lisa, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#003 Cepa 3	Colonias medianas, circulares, elevadas, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color amarillo claro	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#003 Cepa 1	Colonias pequeñas, circulares, elevadas, margen entero, transparente, brillante, lisa, color blanco	Estreptococos Gram (+)	Negativo	Negativo	Anaerobiosis
#004 Cepa 1	Colonias grandes, circulares, elevada, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color crema	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#004 Cepa 2	Colonias pequeñas, circulares, elevada, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color crema	Estafilococos Gram (+)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#004 Cepa 3	Colonias pequeñas, circulares, elevada, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#004 Cepa 1	Colonias pequeñas, circulares, elevadas, margen entero, transparente, brillante, lisa, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Anaerobiosis
#004 Cepa 2	Colonias pequeñas, circulares, elevadas,	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Anaerobiosis

	margen entero, transparente, brillante, lisa, color blanco				
#005 Cepa 1	Colonias medianas, circulares, elevada, margen entero, no transparente, brillante, rugosa, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#005 Cepa 3	Colonias puntiformes, circulares, elevada, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color blanco	Diplococos Gram (+)	Negativo	Negativo	Aerobiosis
#006 Cepa 1	Colonias medianas, circulares, elevadas, margen entero, no transparente, brillante, lisa, color crema	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#006 Cepa 1	Colonias medianas, circulares, elevadas, margen entero, transparente, brillante, lisa, color crema	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Anaerobios
#006 Cepa 2	Colonias medianas, circulares, planas, margen entero, transparente, brillante, lisa, color crema.	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Anaerobios

Tabla 5
Descripción morfológica macroscópica, microscópica y condición de crecimiento de las bacterias aisladas de muestras de superficies.

ID Asignado en planta	Morfología Macroscópica	Morfología Microscópica	Oxidasa	Catalasa	Condición
#S002 cepa 1	Colonias medianas, circulares, margen entero, translucido, brillante, lisa, pigmentado color verde	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#S002 cepa 2	Colonias irregulares, con bordes filamentosas, translucido, brillante, lisa, pigmentado color verde	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#S003 cepa 1	Colonias puntiformes, circulares, enteras, translucido, brillante, lisa, color blanco	Diplococos Gram (+)	Negativo	Negativo	Aerobiosis
#S003 An cepa 1	Colonias medianas, circulares, enteras, translucido, brillante, lisa, color blanco	Diplococos Gram (+)	Negativo	Negativo	Anaerobiosis
#S004 cepa 1	Colonias medianas, circulares, enteras, translucido, brillante, lisa, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#S004 cepa 2	Colonias pequeñas, circulares, enteras, elevadas, translucido, brillante, lisa, color crema	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#S004 An cepa 1	Colonias grandes, circulares, enteras, translucido, brillante, lisa, color crema	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Anaerobiosis
#S005	Colonias pequeñas,	Bacilos Gram	Negativo	Positivo	Aerobiosis

cepa 1	circulares, enteras, elevadas, translucido, brillante, lisa, color blanco	(-)			
#S006 cepa 1	Colonias puntiformes, circulares, enteras, elevadas brillante, lisa, translucido, color verde claro	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#S007 cepa 1	Colonias medianas, circulares, enteras, elevadas brillante, lisa, translucido, color crema	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#S008 Ae cepa 1	Colonias puntiformes, circulares, enteras, elevadas brillante, lisa, translucido, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#S002 PST cepa 1	Colonias pequeñas, circulares, elevadas, margen entero, no translucido, brillante, lisa, color crema	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#S008 cepa 2	Colonias medianas, circulares, elevadas, margen entero, no translucido, brillante, lisa, color crema	Diplococos Gram (+)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#S008 PST cepa 1	Colonias puntiformes, circulares, elevadas, margen entero, no translucido, brillante, lisa, color blanco	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#S008 cepa 3	Colonias puntiformes, circulares, enteras, planas, brillante, lisa, translucido, color crema	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobiosis
#S009 cepa 1	Colonias grandes, circulares, enteras, planas, brillante, lisa,	Bacilos Gram (+)	Negativo	Positivo	Aerobios

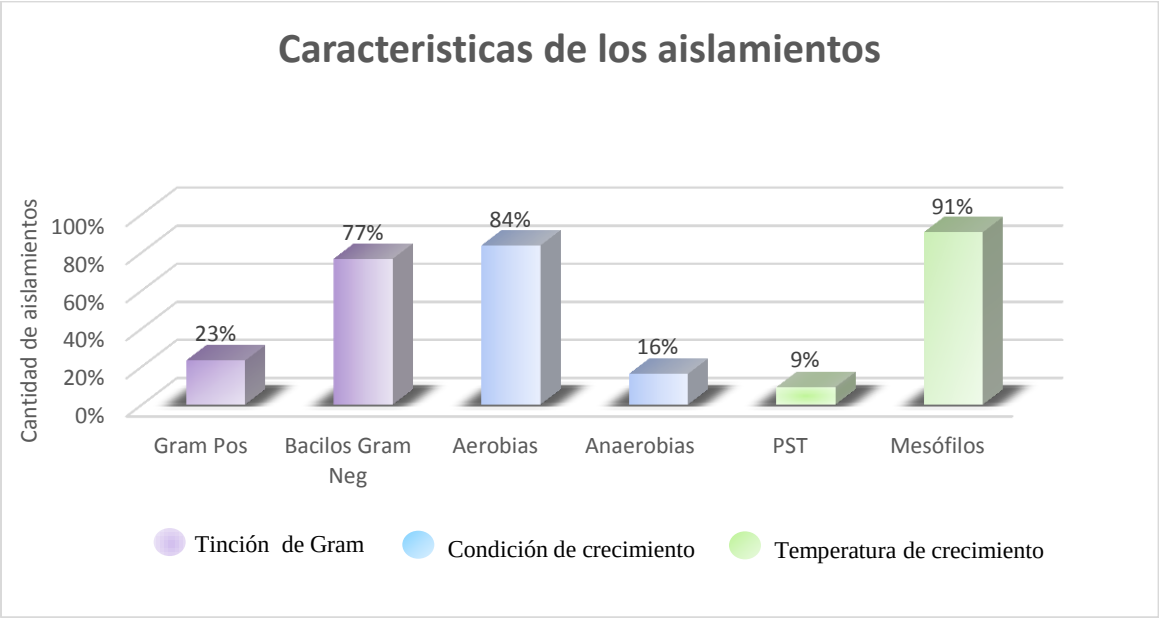
	translucido, color crema				
#S010 PST cepa 1	Colonias grandes, circulares, enteras, elevadas, brillante, lisa, no translucido, color amarillo	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobios
#S010 PST cepa 2	Colonias pequeñas, circulares, enteras, elevadas, brillante, lisa, no translucido, color amarillo	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobios
#S010 cepa 1	Colonias medianas, circulares, enteras, elevadas, brillante, lisa, translucido, color amarillo claro	Bacilos Gram (-)	Negativo	Positivo	Aerobios
#S011 cepa 1	Colonias medianas, circulares, enteras, planas, brillante, lisa, translucido, color verde claro	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#S012 cepa 1	Colonias medianas, circulares, enteras, planas, brillante, lisa, translucido, color verde claro	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis
#S013 cepa 1	Colonias medianas, circulares, enteras, planas, brillante, lisa, translucido, color verde claro	Bacilos Gram (-)	Positivo	Positivo	Aerobiosis

Fuente: autor.

En la figura 9 se muestran los resultados de los aislamientos obtenidos a partir de muestras de leche cruda y de muestras de superficies tomando como referencia los datos presentados en tablas anteriormente mencionadas.

Figura 9

Total, de características presentadas en los aislamientos obtenidos.



Nota: Clasificación otorgada de acuerdo con las características obtenidas en los diferentes aislamientos. PST: psicrótrofos. Fuente: autor.

Como se puede observar en la figura anterior, se obtuvo un total de 18 muestras de las cuales, 6 pertenecen a muestras de leche cruda y 12 a superficies entre equipos, silos y canaletas. A partir de ello, se logró recuperar 43 aislamientos de los cuales 20 forman parte de la microbiota presente en la materia prima de la sabana de Cundinamarca y de San pedro de los milagros – Antioquia y 23 aislamientos obtenidos a partir de superficies.

Del total de los aislamientos, el 23 % son bacterias Gram positivas las cuales pertecen a géneros bacterianos que generalmente en la industria de alimentos tienen varias repercusiones a causa de la generación de toxinas que pueden ser producidas por especies bacterianas como *Clostridium botulinum, Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, generando enfermedades

transmitidas por alimentos que podrían llegar a convertirse en una problemática para la salud pública (Rajkovic et al., 2020).

Así mismo, el 77% restante pertenecen a bacilos Gram negativos, estos microorganismos son de gran importancia, puesto que ellos también están relacionados con la formación de ETAs (Wolf-Hall et al., 2017), además una gran parte de estas bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* quienes presentan una serie de factores de virulencia y toxinas que producen en los alimentos y llegan a los seres humanos mediante el consumo de estos (Solomon, 2021).

En cuanto a las condiciones relacionadas como fuente energética muchos géneros bacterianos poseen características particulares para poder desarrollarse y adaptarse a diferentes medios, en el caso de las bacterias aerobias son bacterias que a partir de compuestos orgánicos logran obtener ATP (adenosín trifosfato), pero solo en presencia de oxígeno (Madigan et al., 2015). Estos mostraron un 84% de prevalencia en los aislados, por esta razón es que generalmente se usan como indicadores de calidad en la industria láctea (Aguirre, 2016).

En cuanto a los géneros bacterianos que crecieron en condiciones anaeróbicas es decir en ausencia de oxígeno se relacionaron en un 16% de los aislamientos. Estos microorganismos pueden estar involucrados con géneros termodúricos como el caso de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. siendo estos capaces de generar esporas y de sobrevivir en condiciones extremas ocasionando inconvenientes en la industria láctea (Calvo-Gómez, 2018).

Ahora bien, el 91% de los aislados crecieron a temperaturas de 35°C. Esta temperatura es característica de microorganismos mesófilos, siendo estos indicadores de calidad. En este grupo bacteriano se pueden encontrar desde bacterias patógenas como *Escherichia coli, Streptococcus pyogenes* o *Proteus vulgaris*, hasta algunos géneros bacterianos que hacen parte de las BAL (Bacterias ácido lácticas) usadas en la industria para muchos procesos de fermentación

(Schiraldi, & De Rosa, 2016) y por último, el 9% restante creció en condiciones psicrotróficas, es decir, que pueden desarrollarse incluso en condiciones de refrigeración, causando alteraciones en las características organolépticas o fisicoquímicas de la leche (Altunatmaz et al., 2012).

7.2. Identificación de las Bacterias aisladas

Cada una de las cepas aisladas a partir del muestreo de leche de cruda y de superficies, llevaron un proceso de identificación bioquímica mediante el uso del sistema Vitek Compact como se puede observar en la tabla 6 y 7.

Tabla 6
Identificación bioquímica de las cepas asociadas a las muestras de leche cruda mediante los resultados obtenidos por Vitek Compact 2.

ID asignado en planta	Identificación	Nivel de confianza	Trazabilidad
#001 CEPA 1	*Moraxella* group.	*LD*	2818831
#001 CEPA 2	*Streptococcus agalactiae*	*95%*	2818832
#002 CEPA 1	*Enterobacter cloacae* complex	*99%*	2818833
#002 CEPA 2	*Kluyvera intermedia*	*93%*	2818834
#002 CEPA 3	*Aeromonas hydrophila/punctata (caviae)*	*99%*	2818835
#002 CEPA 4	*Aeromonas hydrophila/punctata (caviae)*	*98%*	2818836
#003 CEPA 1	*Aerococcus viridans*	*90%*	2818837
#003 CEPA 2	*Pseudomonas luteola*	*90%*	2818838
#003 CEPA 3	*Buttiauxella agrestis*	*93%*	2818839
#003 CEPA 1	*Streptococcus sanguinis*	*86%*	2842357
#004 CEPA 1	*Pantoea* spp.	*86%*	2827639
#004 CEPA 2	*Staphylococcus epidermidis*	*95%*	2827640

#004 CEPA 3	*Ewingella americana*	*94%*	2827641
#004 CEPA 1	*Klebsiella oxytoca*	*99%*	2842359
#004 CEPA 2	*Klebsiella oxytoca*	*99%*	2842360
#005 CEPA 1	*Enterobacter cloacae* complex	*99%*	2827642
#005 Cepa 3	*Enterococcus faecalis*	*LD*	2827643
#006 Ae CEPA 1	*Klebsiella oxytoca*	99%	2827643
#006 An Cepa 1	*Pantoea* spp.	*88%*	2842361
#006 An CEPA 2	*Raoultella ornithinolytica*	*85%*	2842362

Fuente: autor.

Nota: el nivel de confianza lo determina el equipo de acuerdo a la base de datos Vitek y los resultados de trazabilidad son los códigos dados por el laboratorio externo.

Como se puede observar en la tabla presentada, los porcentajes del nivel de confianza arrojados por el equipo están por encima del 85% de similitud con el microorganismo dado. Del mismo modo, de las 20 cepas aisladas, 17 indican el género y la especie bacteriana y en solo 3 el resultado obtenido es hasta el taxón de género tal y como lo es la cepa 1- *Moraxella* group. (#001), la cepa 1 – *Pantoea* spp. (#004) y la cepa 1 - *Pantoea* spp. (#006 An).

En cuanto a los resultados obtenidos en los aislamientos cepa 1- *Moraxella* group (#001) y cepa 3 *Enterococcus faecalis* (#005), se puede observar un resultado de LD (baja discriminación detectada por el equipo), lo cual indica que el software emitió más de un resultado de identificación por lo cual se aconseja repetir el análisis o realizar pruebas adicionales.

El resultado de la identificación bioquímica de los aislados a partir de las muestras de leche cruda, muestra bacterias que pertenecen a diferentes grupos bacterianos como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7
Clasificación bacteriana de los aislados a partir de la leche cruda.

ID asignado en planta	Identificación	Clasificación	Criterio
#001 CEPA 1	*Moraxella* group	Patógeno	Yu et al., 2022
#001 CEPA 2	*Streptococcus agalactiae*	Patógeno	Liang et al., 2023
#002 CEPA 1	*Enterobacter cloacae* complex	Patógeno	Iglesias et al., 2023
#002 CEPA 2	*Kluyvera intermedia*	Patógeno	Yazici et al., 2018
#002 CEPA 3	*Aeromonas hydrophila/punctata (caviae)*	Patógeno	Rasmussen et al., 2016
#002 CEPA 4	*Aeromonas hydrophila/punctata (caviae)*	Patógeno	Rasmussen et al., 2016
#003 CEPA 1	*Aerococcus viridans*	Patógeno	Ezechukwu et al., 2019
#003 CEPA 2	*Pseudomonas luteola*	Patógeno	Barry, 2021
#003 CEPA 3	*Buttiauxella agrestis*	Patógeno	Patra et al., 2018
#003 CEPA 1	*Streptococcus sanguinis*	Comensal	Zhu et al., 2018
#004 CEPA 1	*Pantoea* spp.	Indicador	Giannino et al., 2009
#004 CEPA 2	*Staphylococcus epidermidis*	Comensal	Zheng et al., 2022

#004 CEPA 3	*Ewingella americana*	Patógeno oportunista	González et al., 2012
#004 CEPA 1	*Klebsiella oxytoca*	Patógeno emergente	Leitner et al., 2022
#004 CEPA 2	*Klebsiella oxytoca*	Patógeno emergente	Leitner et al., 2022
#005 CEPA 1	*Enterobacter cloacae* complex	Patógeno	Iglesias et al., 2023
#005 Cepa 3	*Enterococcus faecalis*	Patógeno oportunista	Rashid et al., 2017
#006 Ae CEPA 1	*Klebsiella oxytoca*	Patógeno emergente	Leitner et al., 2022
#006 An Cepa 1	*Pantoea* spp.	Indicador	Giannino et al., 2009
#006 An CEPA 2	*Raoultella ornithinolytica*	Patógeno	Goodman et al., 2022

Fuente: autor.

La tabla muestra que el 80% de los géneros bacterianos aislados hacen parte de aquellos denominados patógenos los cuales pueden llegar a ser patógenos en humanos o en animales, resaltando la incidencia de bacterias como *Aeromonas hydrophila/punctata (caviae)* y *Klebsiella oxytoca*, como lo menciona Pascual-Anderson y Calderón (2000), en la leche cruda el porcentaje de bacterias patógenas puede ser alto o bajo, éstas generalmente son procedentes de las heces del animal.

Ahora bien, en cuanto al 20% de los datos restantes hacen referencia a un 10% perteneciente a bacterias indicadoras, los cuales están relacionados con la calidad de la materia prima, como es mencionado por Martin et al., (2016), los mesófilos y coliformes, pueden ser usados como indicadores para evaluar las condiciones y los procesos empleados en la industria.

Los seres humanos presentan una gran variedad de microorganismos que hacen parte de su organismo, estos son los denominados comensales (Altves et al., 2020). En los resultados obtenidos un 10% se asocian a estas bacterias como lo es *Streptococcus sanguinis* y *Staphylococcus epidermidis*, lo cual se podría relacionar directamente con los procesos de ordeño empleados.

Tabla 8

Identificación bioquímica de las cepas asociadas al muestreo de superficies en silos, canaletas y equipos mediante los resultados obtenidos por Vitek Compact 2.

ID Asignado en planta	Microorganismo Aislado	Nivel de confianza	Trazabilidad
#S002 Ae cepa 1	*Pseudomonas aeruginosa*	*97%*	2844785
#S002 Ae cepa 2	*Pseudomonas aeruginosa*	*99%*	2844786
#S002 PST cepa 1	*Pseudomonas fluorescens*	*85%*	2853886
#S003 Ae cepa 1	*Enterococcus casseliflavus*	*LD*	2844779
#S003 An cepa 1	*Enterococcus faecium*	*95%*	2861813
#S004 Ae cepa 1	*Enterobacter cloacae* complex	*99%*	2844780
#S004 Ae cepa 2	*Enterobacter cloacae* complex	*99%*	2844781
#S004 An cepa 1	*Enterobacter cloacae* complex	*99%*	2861814
#S005 Ae cepa 1	*Citrobacter freundii*	*95%*	2844782
#S006 Ae cepa 1	*Pseudomonas fluorescens*	*99%*	2844783
#S007 Ae cepa 1	*Enterobacter asburiae*	*95%*	2844784
#S008 Aecepa 1	*Stenotrophomonas maltophilia*	*99%*	2844785
#S008 Ae cepa 2	*Kocuria kristinae*	*89%*	2853888
#S008 Ae cepa 3	*Stenotrophomonas maltophilia*	*99%*	2853889
#S008 PST cepa 1	*Enterobacter cloacae* complex	*93%*	2853887

#S009 Ae cepa 1	*Brevibacillus choshinensis*	*96%*	2853890
#S010 PST cepa 1	*Pantoea* spp.	*86%*	2853892
#S010 PST cepa 2	*Lelliottia amnigena 1*	*86%*	2853893
#S010 Ae cepa 1	*Pantoea* spp.	*99%*	2853891
#S010 Ae cepa 2	*Pantoea* spp.	*85%*	2870670
#S011 Ae cepa 1	*Pseudomonas aeruginosa*	*99%*	2870671
#S012 Ae cepa 1	*Pseudomonas aeruginosa*	*99%*	2870672
#S013 Ae cepa 1	*Pseudomonas aeruginosa*	*99%*	2870673

Nota: el nivel de confianza lo determina el equipo de acuerdo a la base de datos Vitek y los resultados de trazabilidad son los códigos dados por el laboratorio externo. Ae: Aerobiosis, PST: Psicrófilos. Fuente: autor.

Los datos presentados permiten observar que el 73% de los aislamientos evidenció un nivel de confianza superior 93% permitiendo conocer con certeza la identidad de las bacterias aisladas. De los 23 aislamientos el 87% de las cepas fueron dadas en identificación de género y especie y solo 3 de ellas es decir el 13% de los aislamientos fue dado hasta género como es el caso de los aislamientos identificados como cepa 1 (#S010 PST), cepa 1 (#S010 Ae), cepa 2 (#S010 Ae) quienes tuvieron un nivel de confianza de 86%, 99% y 85% respectivamente para el género de *Pantoea* spp.

Observando el resultado obtenido de la cepa 1 (#S003), identificada como *Enterococcus casseliflavus* mostro un resultado de LD (baja discriminación detectada por el equipo), lo cual nos indica que el software emitió más de un resultado de identificación por lo cual se aconseja repetir el análisis o realizar pruebas adicionales.

A partir del muestreo de superficies descrito en la tabla mencionada anteriormente se puede observar una variedad de géneros microorganismos que pertenecen a diferentes grupos bacterianos (ver figura 10).

Figura 10

Clasificación de las bacterias aisladas a partir del muestreo de superficies.



Fuente: autor.

En la figura 10 se muestran cada uno de las bacterias identificados mediante el sistema Vitek Compact 2, donde cada uno de los colores indicados hace referencia a un grupo microbiano. Las bacterias patógenas mostradas en color rojo son las de mayor prevalencia en la identificación microbiana con un total de 14 aislamientos; 5 de ellos correspondientes a *Pseudomonas aeruginosa*, un microorganismo patógeno Gram negativo, anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativa, de gran relevancia debido a su capacidad de formar biopelículas, gracias a la generación de polisacáridos que le permiten aumentar su nivel de patogenicidad (Madigan et al., 2015). Lo cual se relaciona con el mecanismo "*quorum sensing"*

QS este permite la expresión de genes de virulencia, aportando para emplear una colonización adecuada con una invasión, infección, diseminación, evasión inmunitaria y resistencia a los medicamentos (Tuón et al., 2022).

Enterobacter cloacae complex se presentó en 4 de las identificaciones correspondientes a los aislamientos cepa 1 (#S004), cepa 2 (#S004), cepa 1 (#S004 An), y cepa 1 (#S008 PST), mostrando que es un microorganismo capaz de crecer en condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y temperaturas de 35°C y 25°C, siendo este una bacteria patógena, que se ha asociado a enfermedades nosocomiales (Iglesias et al., 2023)

Stenotrophomonas maltophilia, se vio reflejada en los resultados obtenidos en 2 de los aislamientos pertenecientes a las bacterias patógenas, siendo este un patógeno oportunista, bacilo Gram negativo, catalasa positiva y oxidasa negativa, el cual al igual que *Pseudomonas aeruginosa* son microorganismos formadores de biopelículas (Li et al., 2019).

Citrobacter freundii, una bacteria patógena perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* causante de enfermedades subyacentes o relacionada con la afectación de pacientes con estados inmunodeprimidos solo se encontró en uno de los aislamientos siendo este el #S005 cepa 1, Así mismo *Enterobacter asburiae*, un patógeno oportunista relacionado con afectaciones de tejidos blandos, neumonías o infección en heridas (Mardaneh & Soltan, 2016) se observó en un aislamiento siendo este el # S007 cepa 1 y *Kocuria Kristinae* patógeno causante de infección invasivas se encontró en un aislamiento nombrado como #S008 cepa 2.

Ahora en cuanto, a los géneros bacterianos presentados en color azul, morado y verde hacen referencia a bacterias indicadoras, comensales y alterantes respectivamente.

En un estudio previo, se señaló la importancia de que las superficies inertes de contacto pueden ser un gran espacio para permitir que varios grupos bacterianos sean capaces de persistir por periodos de tiempo, incluso en equipos de acero inoxidable o en ambientes controlados (Caro & Tobar, 2019). Por ello es importante tener en cuenta las bacterias presentes en las superficies que se encuentran en contacto con materias primas, productos en proceso y productos terminados debido a que pueden ser puntos claves para generar situaciones de contaminación cruzada y así afectar la calidad de los productos.

La razón por la que muchas bacterias son capaces de sobrevivir en superficies inertes es gracias a la capacidad que tienen de generar biopelículas, es decir una especie de capacidad adaptativa que le permite a las bacterias tener ventajas sobre la posibilidad de supervivencia, ya que al estar inmersas en esta condición no requieren gran cantidad de nutrientes. Es por ello que, en la industria alimentaria, la presencia de estas biopelículas sea algo común ocasionando perdidas en productos terminados a causa de la contaminación por contacto directo entre materia prima y superficies e incluso en equipos ocasionando corrosión (Olanbiwoninu, & Popool, 2023).

7.3. Diferenciación de los resultados obtenidos en las muestras de leche cruda

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el proceso de identificación de las 20 cepas aisladas a partir de las muestras de leche cruda se logró realizar una diferenciación de las bacterias presentes en la leche cruda procedente de la sabana de Cundinamarca vs la leche cruda procedente de San pedro de los milagros – Antioquia.

Tabla 9
Comparativa de los aislamientos obtenidos en los diferentes tipos de materia prima.

Leche de la Sabana de Cundinamarca	Leche de San pedro de los Milagros-

		Antioquía.	
Patógenos		**Indicadores**	
Bacteria	Autor	Bacteria	Autor
Aeromonas hydrophila/punctata	Rasmussen et al., 2016	*Pantoea* spp.	Giannino et al., 2009
Enterococcus faecalis	Rashid et al., 2017	**Comensales**	
Enterobacter cloacae complex	Iglesias et al., 202	*Streptococcus sanguinis*	Zhu et al., 2018
Kluyvera intermedia	Yazici et al., 2018	*Staphylococcus epidermidis*	Zheng et al., 2022
		Patógenos	
		Moraxella group	Yu et al., 2022
		Pseudomonas luteola	Barry, 2021
		Streptococcus agalactiae	Liang et al., 2023
		Buttiauxella agrestis	Patra et al., 2018
		Ewingella americana	González et al., 2012
		Klebsiella oxytoca	Leitner et al., 2022
		Raoultella ornithinolytica	Goodman et al., 2022
		Aerococcus viridans	Ezechukwu et al., 2019

Nota: En la tabla anterior se presenta la clasificación bacteriana según criterio. Fuente: autor.

Los resultados encontrados permiten argumentar que la leche de la sabana de Cundinamarca presenta menos géneros bacterianos en comparación a la leche procedente de San pedro de los milagros – Antioquia, esto podría estar relacionado a los procesos de ordeño, pues la

leche se puede contaminar en dicho proceso, procesos externos y posteriores a su obtención, por ejemplo, un lavado de manos deficiente si la leche se obtiene de manera manual, refrigeración deficiente, animales cercanos en el momento de recolección de la materia prima, calidad higiénica en los implementos utilizados, transporte y almacenamiento, entre otros (Bastam et al., 2021).

7.4. Relevancia de las bacterias aisladas en la industria láctea.

Con base en los resultados obtenidos en el informe se presenta la Tabla 9 con el fin de poder clasificar cada una de las bacterias aisladas en este proceso de caracterización.

Tabla 10
Bacterias identificados a partir de las cepas aisladas.

Bacterias aisladas de leche cruda		**Bacterias aisladas del muestreo de superficies**	
Indicadores		**Indicadores**	
Bacterias	Fuente	Bacterias	Fuente
Pantoea spp.	Giannino et al., 2009	*Pantoea* spp.	Giannino et al., 2009
Comensales		*Brevibacillus choshinensis*	García, 2015.
Streptococcus sanguinis	Zhu et al., 2018	*Lelliottia amnigena 1*	Osei et al., 2022
Staphylococcus epidermidis	Zheng et al., 2022	**Comensal**	
Patógenos		*Enterococcus faecium*	Top et al., 2008
Enterobacter cloacae complex	Iglesias et al., 2023	*Enterococcus casseliflavus*	Yoshino, 2023
Pseudomonas luteola	Barry, 2021	**Alterantes**	
Enterococcus faecalis	Rashid et al., 2017	*Pseudomonas fluorescens*	Chen et al., 2023

Kluyvera intermedia	Yazici et al., 2018	**Patógenos**	
Ewingella americana	González et al., 2012	*Pseudomonas aeruginosa*	Wood et al., 2023
Aeromonas hydrophila/punctata	Rasmussen et al., 2016	*Stenotrophomonas maltophilia*	Garcia et al., 2023
Moraxella group	Yu et al., 2022	*Citrobacter freundii*	Liu et al., 2018
Streptococcus agalactiae	Liang et al., 2023	*Enterobacter cloacae* complex	Iglesias et al., 2023
Buttiauxella agrestis	Patra et al., 2018	*Enterobacter asburiae*	Mardaneh & Soltan, 2016
Klebsiella oxytoca	Leitner et al., 2022	*Kocuria kristinae*	Živković et al., 2019.
Raoultella ornithinolytica	Goodman et al., 2022		
Aerococcus viridans	Ezechukwu et al., 2019		

Nota: Clasificación bacteriana de las bacterias de muestras de leche cruda y de muestras de superficies, según criterio. Fuente: autor.

A continuación, se mencionan las bacterias de mayor relevancia en la industria láctea con el fin de poder mostrar la importancia de cada bacteria y así generar medidas preventivas en los procesos realizados en la planta de productos lácteos

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo patógeno relacionado con infecciones nosocomiales en huéspedes inmunocomprometidos (), Gram negativo conocido ya que es capaz de producir enfermedades en humanos; además, tiene una gran relevancia en la industria debido a que gracias a su diversidad metabólica la hace resistente a detergentes y desinfectantes; presenta un flagelo polar que le permite tener movilidad, responder a estímulos y localizar

sustratos de pequeñas cantidades; es un microorganismo ubico que se puede encontrar en sistemas terrestre o acuáticos y es formador de biopelículas y de pigmentos como la piocianina y pioverdina. (Valle-Molinares, 2020).

*Pseudomonas fluorescens e*s un microorganismo alterante, pero al igual que *P. aeruginosa* puede presentarse en ambiente ubicuos y es mucho más común en ambientes lácteos; esto a causa de que también presenta características psicrotróficas que le permiten soportar periodos de refrigeración, es muy común que se presente en leche por contaminación a causa de su presencia en equipos o insumos gracias a la generación de biopelículas que la hacen resistente a diferentes ambientes, por lo mencionado anteriormente su seguimiento es un factor determinante para prevenir perdidas a causa del deterioro de la leche (Bellassi et al, 2021).

Figura 11
Fluoresencia generada por Pseudomonas fluorescens.



Fuente: autor.

P. aeruginosa y P. fluorescens poseen una capacidad enzimática proteolítica y lipolítica lo que causa que sean resistentes a altas temperaturas; así mismo estas enzimas favorecen el deterioro de la leche o productos lácteos generado como la coagulación e incluso cambios en las características organolépticas de la leche (Bellassi et al, 2021).

Stenotrophomonas maltophilia es considerado un patógeno oportunista, aunque también es conocida por ser un microorganismo ubico, aunque generalmente se desarrolla mejor en ambientes acuáticos; su sustrato de preferencia es la malta, sin embargo, recientemente se han mostrado estudios donde se evidencia su capacidad adaptativa permitiéndose crecer en leche

generando deterioro en la calidad y perdidas económicas además de generar gran preocupación por su capacidad para crecer en bajas temperaturas (Zeinhom et al., 2020).

Aeromonas hydrophila/punctata **e**s un microorganismo patógeno que se puede encontrar en gran variedad de productos alimenticios incluyendo la leche cruda; este microorganismo posee la capacidad de generar enterotoxinas incluso en periodos de refrigeración así mismo su presencia puede generar cambios organolépticos en leche cruda, sin embargo, es susceptible a los procesos térmicos por ende su presencia en productos terminados se confiere a contaminaciones pospasteurizacion (Sadek et al, 2017).

Adicionalmente hay varias bacterias que se encuentran relacionadas por mastitis bovina, como es el caso de *Streptococcus agalactiae* quien está estrechamente relacionada con la mastitis contagiosa, pues se puede transmitir de vaca a vaca por instrumentos, equipos o manipulación del ordeñador (Ríos-Padilla, 2020). En cuanto a los géneros de *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp. y *Citrobacter* spp., también están relacionados con la mastitis bovina, sin embargo, son géneros bacterianos que son patógenos de origen ambiental que resisten condiciones adversas mientras logran infectar la ubre del animal y los patógenos oportunistas como el caso de *Staphylococcus epidermis* (Ríos-Padilla, 2020). Recientemente se está demostrando que la presencia de *Aerococcus viridans* un coco Gram positivo, se está volviendo más común en causar mastitis bovina (Xi et al., 2020).

8. CONCLUSIONES

A partir de muestras de leche cruda obtenida de la sabana de Cundinamarca y de San pedro de los milagros Antioquia se logró aislar y caracterizar un total de 20 cepas bacterianas. Así mismo del muestreo de superficies se logró aislar un total de 23 cepas que también pudieron ser caracterizadas. Finalmente, todos los aislamientos realizados pertenecieron a bacterias patógenas, alterantes, indicadores y comensales.

Se logró determinar que las bacterias de mayor prevalencia en la caracterización de leche cruda y del muestreo de silos, equipos y superficies fueron pertenecientes a bacterias patógenas

Se pudo diferenciar la microbiota presente en la materia prima obtenida de la sabana de Cundinamarca y de San pedro de los milagros, mostrando que entre ellas no se presentaron bacterias similares. Del mismo modo las bacterias que se aislaron en las muestras de leche cruda no fueron las mismas que se aislaron del muestreo de superficies, lo cual indica que los procesos térmicos empleados en la planta de procesamiento están siendo efectivos.

Se evidenciaron las bacterias presentes en superficies de la planta de procesamiento lo cual permitirá tomar medidas correctivas que nos logren mostrar en un análisis posterior la mejora de los resultados y de este modo poder evitar futuras perdidas por procesos de contaminación cruzada.

9. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar las concentraciones usadas en la limpieza de pisos, equipos y superficies con el fin de poder eliminar la microbiota aislada en el proyecto realizado.

Con la finalidad de obtener resultados más precisos se recomienda realizar un remuestreo a los diferentes puntos después de los procesos de desinfección y plantear un plan de muestreo más individual y riguroso con el fin de conocer las bacterias presentes en cada área.

Determinar la presencia de *Stenotrophomonas maltophilia* en productos terminados.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, M. (2016). Determinación del perfil microbiológico de la leche pasteurizada a través de su línea de producción en la planta procesadora Colanta - Planeta Rica. [Trabajo de grado, Universidad de Córdoba]. Repositorio, Universidad de Córdoba.

Altunatmaz, S, S., Issa, G. & Aydin, A. (2012). *Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerator. [Publication of the Brazilian Journal of Microbiology]*, (*43)*4, 1436-1443 https://doi.org/10.1590/S1517-8382201200040002

Altveş, S., Yildiz, HK. & Vural, HC. (2020). *Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. Biosci Microbiota Food Health.* (*2*):23-32. 10.12938/bmfh.19-023

Asociación Colombiana de Procesadores de la Leche [Asoleche]. (17 de abril de 2017) La leche en Colombia y la calidad de su evolución. https://asoleche.org/2017/04/17/la-leche-en-colombia-y-la-calidad-de-su-evolucion/

Asociación Colombiana de Procesadores de la Leche [Asoleche]. (24 de mayo de 2020) La leche en cifras https://asoleche.org/wp-content/uploads/2019/10/La-Leche-en-Cifras-mayo-2020.pdf

Barry, M. (2019). Pseudomonas luteola Bacteremia in Newly Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus. Hindawi (2021). https://doi.org/10.1155/2021/4051378

Bastam M, M., Jalili, M., Pakzad, I., Maleki, A & Ghafourian S. (2021) *Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk. Veterinary Medicine and Science. (6*):2445-2449. 10.1002/vms3.604

Bellassi, P., Rocchetti, G., Morelli, L., Senizza, B., Lucini, L y Cappa, F. (2021). *Milk foodomics investigation into the effect of Pseudomonas fluorescens growth under cold chain conditions. Foods. (6):*1173. https://doi.org/10.3390/foods10061173

bioMérieux Industry (2023). Sistema automatizado de identificación. https://www.biomerieux-industry.com/es/products/vitek-2-compact-sistema-de-deteccion-microbiana-para-aplicaciones-farmaceuticas

bioMérieux SA. (2009). Previ-color Gram user's manual. http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/automated_analyzer/user_manuals/Biomerieux%20Previ%20Color%20Gram%20-%20User%20Manual.pdf

Calvo-Gómez, M. E. (2018) Identificación de microorganismos termodúricos provenientes de leche cruda productores de enzimas de deterioro, y evaluación de su actividad en biofilms. [Trabajo de grado, Universidad de la República]. Udelar. FC.

Caro, P., y Tobar, J. (2019). Análisis microbiológico de superficies de contacto con alimentos. *Entramado*. *16*(1):240-249. https://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.6126

Cha, M, Y. y Ha, J. E. (2022). *Low-energy X-ray irradiation effectively inactivates major foodborne pathogen biofilms on various food contact surfaces. Food Microbiology. (106).* https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104054

Chen, J., Sun, Z., Jin, J., Wang, F., Yang, Q., Yu, H., Yu, J., & Wang Y. (2023). *Role of siderophore in Pseudomonas fluorescens biofilm formation and spoilage potential function. Food Microbiology. (109*) 104151. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104151

Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE]. (2020). Encuesta Nacional Agropecuaria-ENA. https://sociedadsostenible.co/wp-content/uploads/2020/09/Encuesta-Nacional-Agropecuaria-ENA-.pdf

Ezechukwu, I., Singal, M. & Igbinosa, O. (2019). *Aerococcus Viridans: Case Report, Microbiology, and Literature Review (20):697-700.* 10.12659/AJCR.914866

Fariña, S., Baudracco, J. & Bargo, F. (2022). Dairy Production in Diverse Regions: Latin America. Encyclopedia of Dairy Sciences. (3), 1354-1362. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00052-0

Federación Colombiana de Ganaderos (Fedegán)- Fondo Nacional del Ganado. (2014). Ganadería regional visión 2014 -2018. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/13.PlanCundinamarcaFINAL.pdf

Federación Colombiana de Ganaderos [FEDEGAN]. (2023). Buenas prácticas ganaderas. https://www.fedegan.org.co/programas/buenas-practicas-ganaderas#:~:text=Las%20Buenas%20Pr%C3%A1cticas%20Ganaderas%20(BPG,que%20trabajan%20en%20la%20explotaci%C3%B3n.

Fuster-Vall, N. (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. [Tesis de Doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5683/nfv1de1.pdf

Garcia, G., Girón, J., Yañez, J., & Cedillo, M. (2023). *Stenotrophomonas maltophilia and Its Ability to Form Biofilms. Microbiology research, 14(1),* 1-20. https://doi.org/10.3390/microbiolres14010001

Garzón-Nivia, L. (2018). Caracterización y tipificación de los sistemas de producción de leche de pequeños y medianos productores de la provincia de Ubaté, Cundinamarca. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio – Universidad Nacional de Colombia.

Giannino, M. L., Marzotto, M., Dellaglio, F., & Feligini, M. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent

methods. International Journal of Food Microbiology, 130(3), 188–195. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.022

González, A., Gea, F., Navarro, M. & Fernández, A. (2012). *Identification and RAPD-typing of Ewingella americana on cultivated mushrooms in Castilla-La Mancha, Spain. European Journal of Plant Pathology. (133):* 517-522. https://doi.org/10.1007/s10658-012-9952-1

Goodman, D., Murphy. & Dorairaj, J. (2022). Case Study: Soft tissue infection with *Raoultella ornithinolytica. JPRAS open. (33):17-20.* https://doi.org/10.1016/j.jpra.2022.04.004 https://doi.org/10.2147/IDR.S398739

Iglesias, P., Toro, M., Vásquez, X., García, E., Rosario, M. & Fernández, J. (2022). *High-risk international clones ST66, ST171 and ST78 of* Enterobacter cloacae *complex causing blood stream infections in Spain and carrying* bla_{OXA-48} *with or without* mcr-9. *(16):272-279.* https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.12.015

Instituto Nacional de Salud (2019). Informe de evento enfermedades transmitidas por alimentas, Colombia, 2020. Informe de evento. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ENFERMEDADES%20TRANSMITIDAS%20POR%20ALIMENTOS.pdf#search=Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos

Laboratorio Clínico de Especialidades Bolívar. (2022). Identificando un microorganismo en equipos automatizados. https://www.laboratoriobolivar.com/publicaciones/cientificas/identificando-un-microorganismo-en-equipos-automatizados

Leitner, E., Bozic, M., Kienesberger, S., Cosic, A., Landt, O., Högenauer, C. & Kessler, H. (2022). *Improved diagnosis of antibiotic-associated haemorrhagic colitis (AAHC) in*

faecal specimens by a new qualitative real-time PCR assay detecting relevant toxin genes of Klebsiella oxytoca *sensu lato. Clinical Microbiology and Infection. (28):*690-694. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.017

Li, D., Hong Wong, C., Fang Seet, M & Kuan, N. (2019). *Isolation, characterization, and inactivation of Stenotrophomonas maltophilia from leafy green vegetables and urban agriculture systems. Frontiers in Microbioly. (10)*:2718. doi: 10.3389/fmicb.2019.02718

Liang, T., Huo, G., Chen, L., Ding, L., Wua, J., Zhang, J., & Wang, R. (2023). *Antibacterial activity and metabolomic analysis of linalool against bovine mastitis pathogen Streptococcus agalactiae. Life Sciences. (313).* https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121299

Liu, L.-H., Wang, N.-Y., Wu, A. Y.-J., Lin, C.-C., Lee, C.-M., & Liu, C.-P. (2018). *Citrobacter freundii bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 51(4)*, 565–572. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.016

López, A, L. & Barriga, D. (2016) La leche, composición y características. Tecnología, Postcosecha e Industria Agroalimentaria. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/La%20leche,%20composicion%20y%20caracteristicas%20(1).pdf

Madigan, M. T., Martinko, J, M., Bender, K, S., Buckley, D, H y Stahl, D, A. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. *PEARSON EDUCACIÓN, S.A. (Vol 14).*

Mardaneh, J., & Soltan Dallal, M. (2016). *Isolation and Identification Enterobacter asburiae from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care*

Unit (NICU). Acta Med Iran, 54(1). 39-43. PMID: 26853289. https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/5387/4736

Martin, NH., Trmčić, A., Hsieh, TH., Boor, KJ. and Wiedmann, M. (2016). *The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods*. *Front Microbiol. (7):*1549. 10.3389/fmicb.2016.01549

Merck (2007). Microbiología Bactident® Oxidasa para detección de la citocromooxidasa en microorganismos.

Michanie, S. (2013). Monitoreo de la higiene de superficies. Britania. (*2*). [Archivo PDF]. https://www.laensenadacorp.com/documentos/ApunteII-MONITOREODEHIGIENE.pdf

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (30 de abril del 2020). Análisis situacional cadena láctea colombiana. https://www.andi.com.co/Uploads/20200430_DT_AnalSitLecheLarga_AndreaGonzalez.pdf

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. (2016). Sector lácteo. https://www.colombiaproductiva.com/ptpsectores/agroindustria/lacteos#:~:text=El%20sector%20L%C3%A1cteo%20est%C3%A1%20compuesto,que%20impactan%20toda%20la%20cadena.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 1880 del 2011: Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional. 27 de mayo de 2011.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 2838 del 2006: Por el cual se modifica parcialmente el Decreto 616 de 2006 y se dictan otras disposiciones. 24 de agosto de 2006.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 3411 del 2008: por el cual se modifica parcialmente el Decreto 2838 de 2006, modificado parcialmente por el Decreto 2964 de 2008, y se dictan otras disposiciones. 10 de septiembre de 2008.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 616 de 2006. Art. 3. 28 de febrero de 2006. https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006d616.aspx

Ministerio de la Protección Social. Decreto 616 de 2006. Art. 16. 28 de febrero de 2006.

Ministerio de la Protección social. Decreto 616 de 2006. Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expenda, importe o exporte en el país. 28 de febrero de 2006.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 4142 de 2012: Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales, objetos, envases y equipamientos metálicos destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano en el territorio nacional. 12 de diciembre de 2012.

Norma Técnica Colombiana. NTC 5230 de 2017. Microbiología de alimentos y alimento para animales. método horizontal de técnicas de muestreo de superficies, ambientes y manos. 21 de junio de 2017.

Observatorio de la Cadena Láctea Argentina [OCLA]. (2022). Situación de la lechería mundial durante el año 2020. https://www.ocla.org.ar/contents/news/details/21526508-situacion-de-la-lecheria-mundial-durante-el-ano-2020

Olajide, A, M. & LaPointe, G. (2022). *Microorganisms Associated with Raw Milk. Encyclopedia of Dairy Science. (3*), 3207-3216 https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00023-4

Olanbiwoninu, A, A. & Popoola B, M. (2023). *Biofilms and their impacto n the food industry. Saudi Journal of Biological Sciences. (30).* https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103523

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2012). Manual l de buenas prácticas de ordeño. [Archivo PDF]. https://www.fao.org/3/bo952s/bo952s.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2016). El sector lechero mundial: Datos. http://www.dairydeclaration.org/Portals/153/FAO-Global-Facts-SPANISH-F.PDF?v=1

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2022-2). Peligros para la salud. https://www.fao.org/dairy-production-products/products/peligros-para-la-salud/es/

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2022-3). Practicas lecheras. https://www.fao.org/dairy-production-products/production/farm-practices/es/.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2022-1). Producción lechera. https://www.fao.org/dairy-production-products/production/es/.

Organización Internacional de Normalización. ISO 4833 de 2013. *Microbiology of the food chain Horizontal method for the enumeration of microorganisms*. 1 de septiembre de 2013.

Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2011). Guía para el uso correcto de los equipos automatizados para identificación bacteriana y su correspondiente prueba de susceptibilidad. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Guia_inside_LR%20(1).pdf

Osei, R., Yang, C., Cui, L., Ma, T., Li, Z., Boamah, S. (2022). Is*olation, identification, and pathogenicity of Lelliottia amnigena causing soft rot of potato tuber in China. Microbial Pathogenesis, 164*, ISSN 0882-4010. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105441

Pascual-Anderson, M, R., Calderón, V. (2000). Microbiología alimentaria metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos. *(Ed. 2)*

Patra, N., Prakash, M. R., Patil, S., & Rao, M. B. (2018). First case report of surgical site infection due to Buttiauxella agrestis in a neurocare center in India. Archives of Medicine and Health Sciences, 6(1), 117. 10.4103/amhs.amhs_24_18

Pineda-Portugal, M, M. (2014). Importancia de la leche y productos lácteos. [Trabajo de grado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. Repositorio UNSA.

Rajkovic, A., Jovanovic, J., Monteiro, S., Decleer, M., Andjelkovic, M., Foubert, A., Beloglazova, N., Tsilla, V., Sas, B., Madder, A., De Saeger, S. & Uyttendaele, M. (2020). *Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* (*19*):1605-1657. 10.1111/1541-4337.12571

Rashid, R., Cazenave, A., Gao, I., Nair, Z., Kumar, J., Gao, L., Kline, K. & Wenk, M. (2017). *Comprehensive analysis of phospholipids and glycolipids in the opportunistic pathogen Enterococcus faecalis. Plos One.* https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175886

Rasmussen, C., Figueras, M., McGarey, D. & Liles, M. (2016). *Virulence Factors of Aeromonas hydrophila: In the Wake of Reclassification. Front.Microbiology.. (7).* https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337

Ríos Castillo, A, G. (2013). Evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo. Nuevos métodos. [Tesis de Doctorado,

Universitat Autònoma de Barcelona). https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/129381/agrc1de1.pdf?sequence=1

Rios-Padilla, C, A. (2020). Resistencia a antibióticos en bacterias causantes de mastitis bovina. [Trabajo de grado, Universidad de Cundinamarca]. Repositorio Universidad de Cundinamarca.

Sadek, O, A., Makar, N, H & El Berbawy, S, E. (2017). *Detection of aeromonas hydrophila in raw milk and some milk products with reference to its public health hazard. Assiut Veterinary Medical Journal. (63*): 43-53.10.21608/AVMJ.2017.169633

Schiraldi, C. & De Rosa, M. (2016) *Mesophilic organisms. Encyclopedia of Membranes*. (pp. 1-2). 10.1007/978-3-642-40872-4_1610-2

Solomon H, M. (2021). *Isolation and characterization of Gram-Negative bacterial species from pasteurized dairy products: potential risk to consumer health. Journal of Food Quality.* https://doi.org/10.1155/2021/8876926

Superintendencia de Industria y Comercio. (2021). Análisis del Sector Lácteo en Colombia: Evidencia para el periodo 2010 – 2020. [Archivo PDF] https://www.sic.gov.co/sites/default/files/documentos/032022/ES-SLC_Version-publica.pdf

Top, J., Willems, R. & Bonten, M. (2008). *Emergence of CC17 Enterococcus faecium: from commensal to hospital-adapted pathogen. EMS Immunology & Medical Microbiology. (52)*:297–308. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x

Tuón, F., Dantas, L., Suss., P. & Tasca Ribeiro, V. (*2022). Pathogenesis of the Pseudomonas aeruginosa Biofilm: A Review. Pathogens. 11(3),* 300. https://doi.org/10.3390/pathogens11030300

Valle-Molinares, R, H. (2020). Diversidad genética de *Pseudomonas aeruginosa* y su relación con la resistencia bacteriana y producción de biopelículas en la ciudad de Cartagena de Indias D.C.T.-Colombia. [Trabajo de grado, Universidad de Cartagena]. Repositorio – Universidad de Cartagena.

Vargas Flores, T & Vargas Alvin, K. (2014). Morfología Bacteriana. Revista de Actualización Clínica. (*49*). http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/pdf/raci/v49/v49_a02.pdf

Wolf Hall, C & Nganje, W. (2017). *Gram-negative bacteria. Microbial food safety: a food systems approach. (pp.59).* 10.1079/9781780644806.0059

Wood, S., Goldufsky, J., Seu, M., Dorafshar, A., & Shafikhani, S. (2023). *Pseudomonas aeruginosa Cytotoxins: Mechanisms of Cytotoxicity and Impact on Inflammatory Responses. Cells, 12(1*), 195. https://doi.org/10.3390/cells12010195

Xi, H., He, D., Li, D., Liu, S, S., Wang, G., Ji, Y., Wang, X., Wang, Z., Bi, L., Zhao, R., Zhang, H., Yang, L., Guo, Z., Han, W. & Gu, J. (2020). *Bacteriophage protects against Aerococcus viridans infection in a murine mastitis model. Frontiers in Veterinary Science. (7)*. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00588

Yazici, E., Birbir, M., & Caglayan, P. (2018). *Phenotypic characterization and antibiotic susceptibilities of Ewingella americana and Kluyvera intermedia isolated from soaked hides and skins. International Conference on Advanced Materials and Systems, 7th*. https://doi.org/10.24264/icams-2018.VI.15

Yoshino, Y. (2023). *Enterococcus casseliflavus Infection: A Review of Clinical Features and Treatment. Infect Drug Resist*. *(16)*:363-368

Yu, X., Wang, L., Zheng, X., Wenc, Y., Zhang, Z., Lingxia, V., Zhoua, Q., Yang, X., Xue, B. & Lin, Y. (2022). Moraxella occupied the largest proportion in the nasal microbiome in

healthy children, which potential protect them from COVID-19. *Microbial Pathogenesis*. (170). https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105685

Zamora Antia, G, A. (2006). Análisis fisicoquímico de leches en la cooperativa Colanta Ltda sede Armenia. [Trabajo de grado, Universidad del Quindío]. Repositorio Digital – Universidad del Quindío.

Zeinhom, M, M, A., Hassan, G. M., H., Salem, H. A & Corke, A. (2021). *Prevalence and survival of Stenotrophomonas species in milk and dairy products in egypt. Foodborne Pathogens and Disease*. (*18*):337-345. 10.1089/fpd.2020.2893

Zheng, Y., Hunt, R., Villaruz, A., Fisher, E., Liu, R., Liu, Q., Cheung, G., Li, M. & Otto, M. (2022). *Commensal* Staphylococcus epidermidis *contributes to skin barrier homeostasis by generating protective ceramides. Cell Host & Microbe. (30):301-313.* https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.01.004

Zhu, B., Macleod, L., Kitten, T & Xu, P. (2018*). Streptococcus sanguinis biofilm formation & interaction with oral pathogens. Future Microbiology. (13).* https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0043

Živković Zarić, R. S., Pejčić, A. V., Janković, S. M., Kostić, M. J., Milosavljević, M. N., Milosavljević, M. J., & Opančina, V. D. (2019). *Antimicrobial treatment of Kocuria kristinae invasive infections: Systematic review. Journal of Chemotherapy, 31(3),* 109–119. https://doi.org/10.1080/1120009X.2018.1542551