Verificación del método de esterilidad comercial de la Norma Técnica Colombiana 4433 del 2015 aplicando modificación, en matrices UHT, en la pasteurizadora Santo Domingo S.A

Jessica Alexandra Garzón Muñoz

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Departamento de Microbiología

Pamplona, Norte de Santander

Julio 2024

Verificación del método de esterilidad comercial de la Norma Técnica Colombiana 4433 del 2015 aplicando modificación, en matrices UHT, en la pasteurizadora Santo Domingo S.A

Jessica Alexandra Garzón Muñoz

Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga

Tutor académico:

Francisco Rodríguez Rincón, Ph.D.
Profesor titular
Departamento de Microbiología

Tutor empresarial:

ING. Héctor Eduardo Sánchez Antonio

Universidad de pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Departamento de Microbiología

Pamplona, Norte de Santander

Julio 2024

NOTA DE ACEPTACIÓN:

_____

FIRMA DEL JURADO

_____

FIRMA DEL JURADO

Pamplona, Abril de 2024.

Agradecimientos

En primer lugar, le agradezco a Dios, por bendecirme, cuidarme y acompañarme en esta hermosa transición de la vida.

A mis padres, Mery Leticia y Alexander, por los valores inculcados, el amor, respeto, empatía, soy la persona que soy, gracias a todo lo que me han inculcado, por siempre creer en mí. y el gran apoyo que me brindaron, por nunca haber permitido que perdiera la motivación frente a obstáculos que se presentaban en el camino.

Mis abuelos, por apoyarme en el transcurso de mi carrera, siendo parte fundamental de que hoy un sueño se materialice.

Mi hermano, mi compañero de vida, por el apoyo, por cada palabra de ánimo, por la colaboración, por escucharme las veces que fue necesario. Y junto a él a toda mi familia, tías, primos, primas; ya que fueron parte fundamental de mi proceso con su apoyo.

Agradezco a los amigos que hice en mi etapa como estudiante, aportaron grandes aprendizajes.

Gracias a Pasteurizadora Santo Domingo SA, por la oportunidad que se me brindo al poder desarrollar mi practica universitaria allí. De manera especial, a las analistas del laboratorio de control de calidad, por todo lo que me enseñaron.

Gracias a los docentes del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona, fueron pilares importantes en todo el camino, por todo el aprendizaje que me brindaron.

Resumen

El procedimiento utilizado para evaluar la esterilidad comercial de alimentos en Colombia, conforme a la "Norma Técnica Colombiana 4433 de 2015", proporciona pautas específicas para realizar pruebas de esterilidad en diferentes tipos de alimentos. En la pasteurizadora Santo Domingo S.A, se implementó una adaptación del método, pasando de utilizar tubos (medio líquido) a cajas de Petri (medio sólido), empleando matrices UHT que incluyeron leche entera (400 ml), leche saborizada con chocolate (200 ml), bebida láctea con avena (200 ml) y crema de leche entera (200 g). Se llevó a cabo la productividad del medio de cultivo BHI en el crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. Posteriormente se aplicó el método estándar de la Norma técnica colombiana 4433 de 2015 y del método modificado con el fin de averiguar si esta versión modificada cumple con los mismos requisitos normativos que la metodología estándar de la Norma técnica colombiana 4433 de 2015. Adicionalmente, se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad de las metodologías. Para el análisis de datos se hizo uso de gráficos de control, observándose que no hay variación de los datos entre las matrices UHT por cada repetición de las técnicas y entre diferente analista no hubo diferencia alguna. La comparación de resultados por cada matriz UHT entre el método estándar de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y su modificación, cumplió con los requisitos necesarios de esterilidad comercial de los productos UHT empleados, Así mismo la técnica modificada no altera la capacidad de garantizar la esterilidad de los productos, siendo efectiva y una alternativa viable para realizar como método de esterilidad comercial.

Palabras claves: Esterilidad comercial, matriz UHT, Verificación, ultrapasteurización, Minitab.

Abstract

The procedure used to evaluate the commercial sterility of foods in Colombia, in accordance with the "Colombian Technical Standard 4433 of 2015", provides specific guidelines for performing sterility tests on different types of foods. At the Santo Domingo S.A pasteurizer, an adaptation of the method was implemented, going from using tubes (liquid medium) to Petri dishes (solid medium), using UHT matrices that included whole milk (400 ml), chocolate-flavored milk (200 ml), dairy drink with oats (200 ml) and whole milk cream (200 g). The productivity of the BHI culture medium was carried out in the growth of Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953. Subsequently, the standard method of the Colombian Technical Standard 4433 of 2015 and the modified method were applied in order to find out if this modified version meets the same regulatory requirements as the standard methodology of the Colombian Technical Standard 4433 of 2015. Additionally, the repeatability and reproducibility of the methodologies was evaluated. For data analysis, control charts were used, observing that there is no variation in the data between the UHT matrices for each repetition of the techniques and there was no difference between different analysts. The comparison of results for each UHT matrix between the standard method of the commercial sterility standard NTC 4433 of 2015 and its modification met the necessary commercial sterility requirements of the UHT products used. Likewise, the modified technique does not alter the capacity of guarantee the sterility of the products, being effective and a viable alternative to carry out as a commercial sterility method.

Keywords: Commercial sterility, UHT matrix, Verification, ultrapasteurization, Minitab.

Índice General

Introducción 13

Objetivos 14

Objetivo general 14

Objetivos específicos 14

Justificación 15

Marco Teórico 17

Pasteurizadora Santo Domingo S.A 17

Procesamiento UHT 17

Matrices UHT Pasteurizadora Santo Domingo SA 18

Leche Entera 18

Leche Saborizada 18

Bebida con leche y avena 19

Crema de leche entera 20

Método de referencia 20

Método alternativo 21

Microbiología de la leche cruda 21

Microorganismos patógenos en la leche cruda 21

Microorganismos que deterioran la leche 23

Genero *Bacillus* 24

Bacillus sporothermodurans 25

G. stearothermophilus 26

Norma de esterilidad comercial NTC 4433 DE 2015 26

Marco legal 28

Decreto 616 del 2016 28

Resolución 2115 22 de junio de 2007 28

Norma técnica colombiana 4433 de 2015 28

Metodología 29

Selección de matrices 29

Productividad en el medio BHI de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 30

Cálculo del índice de crecimiento Absoluto (ICA) 31

Comparación de Protocolo estandarizado de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y técnica modificada 32

Evaluación de los Matrices e incubación 32

Procedimiento de acuerdo a la NTC 4433 del 2015 33

Modificación de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 33

Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y método modificado 34

Análisis estadístico del sistema de medición en el estudio repetibilidad y reproducibilidad (R&R) usado en Minitab 34

Cronograma de actividades 35

Resultados y discusión 38

Productividad del medio de cultivo BHI 38

Comparación de protocolo estandarizado de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y técnica modificada 39

Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método de esterilidad

comercial NTC 4433 de 2015 y método modificado 50

Conclusiones 54

Recomendaciones o sugerencias 55

Glosario 56

Referencias 58

Anexos 61

Lista de tablas

Tabla No.1 *Plan de muestreo de selección de matrices UHT en la pasteurizadora Santo Domingo SA* 30

Tabla No.2 *Productividad del medio de cultivo frente al índice de crecimiento absoluto (ICA) para el microorganismo de interés* 32

Tabla No.3 *Cronograma de actividades durante seis meses en pasteurizadora Santo Domingo S.A* 3

Tabla No.4 *Resultado Test ecométrico para Geobacillus stearothermophilus* 42

Tabla No.5 *Resultados de la técnica estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, Leche entera (400 ml). Lote: 273001-283001* 44

Tabla No.6 *Resultados de la técnica estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, Leche Saborizada Dominguita con sabor a chocolate (200ml). Lote: 253004- 263004* 47

Tabla No.7 *Resultados de la técnica estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, bebida con leche y avena (200ml) con sabor artificial a canela. Lote: 253005.* 49

Tabla No.8 *Resultados de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, Crema de leche (200g). Lote:283041* 50

Tabla No.9 *Resultados del control positivo, cepa de G. stearothermophilus ATCC 7953 inoculada en matriz UHT Entera* 51

Tabla No.10 *Resultados cualitativos obtenidos del método de repetibilidad en la aplicación de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y método modificado* 54

Tabla No.11 *Resultados cualitativos obtenidos del método de reproducibilidad* 55

Lista de figuras

Figura No.1 *Leche entera Santo Domingo, 400ml* 21

Figura No.2 *Leche saborizada UAT-UHT entera Dominguita, 200 ml* 22

Figura No.3 *Bebida con leche y avena con sabor artificial canela UAT-UHT Santo Domingo 200ml* 22

Figura No.4 *Crema de leche entera UHT x 900 y 200 gramos* 23

Figura No.5 *Características morfológicas de Bacillus spp* 27

Figura No.6 *Esquema de la técnica del test ecométrico* 34

Figura No.7 *Esquema metodológico del protocolo de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015* 36

Figura No.8 *Esquema metodológico de la modificación de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 de tubos a cajas de petri* 37

Figura No.9 *Test ecométrico de G. stearothermophilus en agar PC; Figura A y agar BHI; Figura B* 41

Figura No.10 *Grafica lineal de la técnica estándar y modificada vs el control positivo de la matriz UHT de leche entera Santo Domingo de 400 ml* 45

Figura No.11 *Grafica de serie de tiempo de los resultados en los diferentes días en el desarrollo de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y modificación en las 4 Matrices UHT* 52

Figura No.12 *Informe de repetibilidad y reproducibilidad (R&R) del método de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y método modificado en matrices UHT* 72

Lista de anexos

Anexo A. *Trazabilidad leche entera de 400 ml* 66

Anexo B. *Trazabilidad matriz de leche saborizada con sabor a chocolate "Dominguita"* 82

Anexo C. *Trazabilidad matriz de avena con sabor artificial a canela* 84

Anexo D. *Trazabilidad matriz UHT, crema de leche de 200g* 85

Anexo E. *Registro fotográfico morfología microscópica de la cepa G. stearothermophilus ATCC 7953 a partir de los medios utilizados en el test ecométrico* 90

Anexo F. *Tabla del registro de la morfología Macroscópica de la cepa G. stearothermophilus ATCC 7953* 90

Anexo G. *Registro fotográfico procesamiento de muestras - 10 días de incubación en cámara de 35ºC y 55ºC* 91

Anexo H. *Registro fotográfico del diseño experimental para la validación de la NTC 4433 del 2015 y la técnica modificada* 92

Anexo I. *Registro fotográfico de reactivación de G. stearothermophilus ATCC 7953 Duo Kwik Stik Microbiologics* 93

Anexo J. *NTC 4433 de 2015* 93

Anexo K. *Tablas del sistema de medición repetibilidad y reproducibilidad* 95

Introducción

La Norma Técnica Colombiana 4433 de 2015, establece los requisitos y directrices para los procesos de esterilización en la industria de alimentos. Esta norma, emitida por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), brinda pautas sobre la validación y el control de la esterilidad en la producción de alimentos, enfocada en garantizar la inocuidad alimentaria, garantizando que los productos estén libres de microorganismos y sean aptos para su consumo. El cumplimiento de esta norma es esencial para garantizar la seguridad alimentaria y la calidad de los productos, protegiendo la salud de los consumidores y satisfaciendo las expectativas de los organismos reguladores. Evaluar la esterilidad comercial de los productos lácteos es de importancia para asegurar que durante la vida útil de las matrices de leche no haya presencia de microorganismos que afecten la calidad. Los productos con tratamiento de ultra pasteurización (UHT), poseen una vida útil extendida cuando están envasados y sin abrir.

Pasteurizadora Santo Domingo S.A es una industria láctea, produce gran variedad de productos UHT y derivados lácteos; Leche entera, leche semidescremada deslactosada, descremada deslactosada, leche saborizada, crema de leche y bebida con leche y avena. El presente trabajo busca verificar que la modificación de la técnica estándar satisfaga los requisitos y parámetros establecidos por la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015, garantizando así los requisitos legales por cada matriz UHT que se produce en Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

Objetivos

Objetivo General

Verificar una modificación del método de esterilidad comercial de la Norma Técnica Colombiana 4433 del 2015, en matrices UHT, en la Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

Objetivos Específicos

- Comparar y contrastar los datos de las matrices UHT derivados del método estandarizado de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 con el método modificado.
- Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 del 2015 y en la modificación del método.

Justificación

La leche, al tener una composición diversa en nutrientes, con un alto nivel de agua y un pH casi neutro, es altamente perecedera, siendo favorable el crecimiento microbiano. Toda empresa procesadora de alimentos debe efectuar controles para asegurar la comercialización de alimentos inocuos, no es suficiente con la realización de pruebas de calidad que establecen el buen sabor o el correcto empaquetado, también se debe optimizar la esterilidad de los productos destinados al consumo humano. La mitigación de patógenos en la industria láctea se logra mediante un proceso de Ultrapasteurización, también conocido como leche UHT (Ultra-High Temperature processed milk). Este proceso implica el calentamiento rápido de la leche a una temperatura de 130 a 150°C, manteniéndola a esta temperatura durante 2 a 4 segundos. En pasteurizadora Santo Domingo S.A, la temperatura empleada en el proceso de Ultrapasteurización es de 141ºC+/- 2ºC durante 2 a 4 segundos. El proceso elimina los microorganismos que estén presentes en la leche cruda, siendo el único punto crítico de control (PCC) de la planta, controlando un peligro biológico como la supervivencia de microorganismos esporulados altamente resistentes a los tratamientos de ultrapasteurización (HHRS).

Con el fin de garantizar que el proceso de ultrapasteurización al cual son sometidos los productos UHT de Pasteurizadora Santo domingo S.A, sean eficientes y que cumplen con los requisitos legales de esterilidad, se requirió verificar la técnica de esterilidad comercial establecida en la norma técnica colombiana 4433 de 2015, realizando modificación de la técnica estándar de medio liquido (en tubos) a medio solido (cajas de Petri), esta modificación es necesaria para la empresa con el fin de mitigar tiempo y costos.

El protocolo estándar de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015, implementa el uso de caldo BHI en tubos, por lo cual, para identificar la presencia o ausencia de microorganismos, se requieren pasos adicionales, debido a que las muestras de leche por su color, no permite diferenciar la turbidez del medio, se requiere del pase de tubo a medio nutritivo, para luego realizar tinción de Gram. El protocolo modificado permite disminuir tiempo, mitigando el procedimiento de pasar el medio líquido en tubos a un medio nutritivo en cajas, la muestra UHT al ser inoculada al medio sólido en cajas directamente se observa la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC).

Marco Teórico

Pasteurizadora Santo Domingo S.A

Hace años, en el pueblo de Simijaca-Cundinamarca, un emprendedor visionario comenzó a comprar leche de hatos de vacas y granjas y distribuirla a negocios del pueblo y sus alrededores. Gracias al amplio reconocimiento del producto, se iniciaron las gestiones para liquidar la fábrica de lácteos y el proyecto se hizo realidad en 1988, convirtiéndose así en un producto lácteo propio bajo el nombre de SANTO DOMINGO.

El 21 de marzo de 1996, la empresa se consolidó en una empresa legalmente registrada con sede en Bogotá y plantas productivas en Simijaca- Cundinamarca (Rincon, 2013).

La empresa Pasteurizadora SANTO DOMINGO SA cuenta con una amplia variedad de productos UHT como; Leche entera, Leche semidescremada, Leche semidescremada deslactosada, bebida con leche y Avena, crema de leche; Productos pasteurizados como; Yogurt yoggi, yogurt entero, kumis, cereal con bebida láctea Dominguín y gelatinas.

Procesamiento UHT

El tratamiento de la leche UHT radica en tratar la leche a 138-145 °C durante 2- 10 segundos. Este proceso asegura la esterilidad comercial con un efecto minúsculo en el valor nutricional del producto (Rosenberg, 2022).

Según Deeth, H. (2021) el procesamiento de un producto a temperatura ultra alta, convierte a un alimento perecedero naturalmente en un producto de larga vida útil.

Leche Entera

La leche entera de Pasteurizadora Santo Domingo SA, es tratada térmicamente con alta temperatura con tecnología UAT (Ultra alta temperatura) o por sus siglas en ingles UHT, por lo cual el producto es apto para mantenerlo a temperatura ambiente.

Figura No.1

Leche entera Santo Domingo, 400ml.



Fuente: Santo Domingo S.A.

Leche Saborizada

La leche con sabor artificial a chocolate de Santo Domingo S.A, distintiva por su nombre Dominguita, es sometida a proceso de Ultra alta temperatura (UAT-UHT), El tratamiento térmico UAT-UHT, le permite al producto mantener sus características viables a temperatura ambiente antes de su consumo. Hay 3 referencias de sabores, vainilla, fresa y chocolate.

Figura No.2

Leche saborizada UAT-UHT entera Dominguita, 200 ml.



Fuente: Santo Domingo S.A.

Bebida con Leche y Avena

Es una bebida de leche con una mezcla de hojuelas de avena, tratada con la tecnología de Ultra alta temperatura UAT-UHT. Aporta un alto contenido de fibra, manteniéndose el calcio y proteína que aporta la leche. (Pasteurizadora Santo Domingo SA, 2021)

Figura No.3

Bebida con leche y avena con sabor artificial canela UAT-UHT Santo Domingo 200ml.



Fuente: Santo Domingo S.A.

Crema de Leche Entera

La crema de leche Santo Domingo es un producto creado a partir de la grasa de la leche que es higienizada obteniéndose un producto de alta calidad. La grasa permite que las vitaminas liposolubles se absorban aportando energía.

Figura No.4

Crema de leche entera UHT por 900 y 200 gramos.



Fuente: Santo Domingo S.A.

Método de Referencia

Técnica de interés que es investigado a profundidad, describe las condiciones y metodologías necesarias para medir los valores de una o más propiedades, demostrando la exactitud y precisión para su respectivo uso. De esta forma puede utilizarse para determinar la exactitud de otras técnicas empleadas para evaluar la misma medición o para caracterizar algún material de referencia. Por lo general, se evalúa normas nacionales o internacionales (Muñoz, 2016).

Método Alternativo

Es un método que estima que el objeto de estudio (analito, microorganismos, sus componentes) para una categoría dada de productos, como lo hace el método de referencia (Muñoz, 2016).

Microbiología de la Leche Cruda

La leche se secreta de los alveolos de la ubre de los animales, siendo un fluido estéril, sin embargo, a partir de algunos factores esta se puede contaminar, como ejemplo, la higiene a nivel de ordeño. La leche por ser un líquido de composición rica en nutrientes y con un pH neutro, es propicio para el crecimiento de microorganismos. Los principios de contaminación directa de la leche incluyen la parte de la ubre de la vaca, los instrumentos de ordeño y el almacenamiento de la leche.

Los microorganismos presentes en la leche cruda son diversos, incluyendo los que hacen parte de forma natural en animales sanos, presentes en la piel o tracto gastrointestinal. También microflora presente del suelo, del agua, vegetación y otros de la alimentación animal. Los alimentos para animales y los ingredientes de alimentos, han sido comprometidos como una fuente importante de contaminación microbiana de la leche a nivel de granja (Deeth, 2021).

Microorganismos Patógenos en la Leche Cruda

La leche puede contener microrganismos patógenos transmitidos de forma zoonótica a través de las vacas lecheras, también desde el entorno ambiental cuando se está en el proceso de ordeño o por el personal.

La mastitis tiene mayor incidencia en la microbiología de la leche cruda, es una inflamación de las glándulas mamarias causada por patógenos internos en la glándula mamaria. La mastitis puede ser asintomática o sintomática, ubre hinchada, leche acuosa con coágulos. La mastitis al ser asintomática es un factor de riesgo importante en la transmisión de patógenos, liberados por medio de la leche de un animal enfermo. Los patógenos encargados que causan esta condición esta *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Son bacterias que hacen parte de forma natural en la ubre de las vacas pueden colonizar y crecer en el pezón. Otros patógenos incluyen *E. coli, Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus uberis* y *Bacillus* spp (Deeth, 2014).

La leche de animales enfermos es la causa primordial de transmisión de patógenos por la leche con *S. aureus* enterotoxigénico, se sabe que el consumo de leche cruda es un factor de riesgo principal en la transmisión de patógenos zoonóticos, causando infecciones sistémicas en animales lecheros. Incluyen *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP) que causan tuberculosis bovina (TB) y enfermedad de Johnes. La transmisión de *M. bovis,* a través de la leche cruda, es rara en países desarrollados debido a la pasteurización, sin embargo, aun ocurren casos esporádicos, debido al consumo de leche cruda en granja. Los animales lecheros presentan patógenos asintomáticos como serotipos de *Salmonella*, *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes,* por lo general, estos organismos se albergan como huéspedes en el tracto gastrointestinal y se introducen en la leche durante el ordeño a través de la contaminación fecal de la ubre. La higiene en el momento de ordeño es un causal fundamental para mitigar la transmisiónde enfermedades a través de la leche cruda. La ubre de los animales lecheros al tener contacto directo con el suelo se contamina con

estiércol, así que la limpieza de la ubre es fundamental para reducir la contaminación por patógenos (Deeth, 2014).

Microorganismos que Deterioran la Leche

No es un factor de riesgo para la salud del consumidor, este deterioro se debe al resultado de crecimiento microbiano, siendo un tema de preocupación para las empresas lácteas. Este deterioro se da al resultado de crecimiento microbiano y la producción de enzimas que degradan lípidos y proteínas liberando metabolitos que tienen un resultado negativo en la calidad de la leche.

La acidificación de la leche es uno de los principales inconvenientes, ocurre si la leche cruda no se refrigera, el mayor desafío es el desarrollo de bacterias psicrotróficos en leche cruday leche pasteurizada almacenada a bajas temperaturas, se debe principalmente al crecimiento de *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. en leche cruda o como contaminantes posteriores a la pasteurización. La contaminación con *Pseudomonas* spp, puede venir del agua, las superficies de los tanques de leche a granel, pezones de las ubres o del equipo de ordeño.

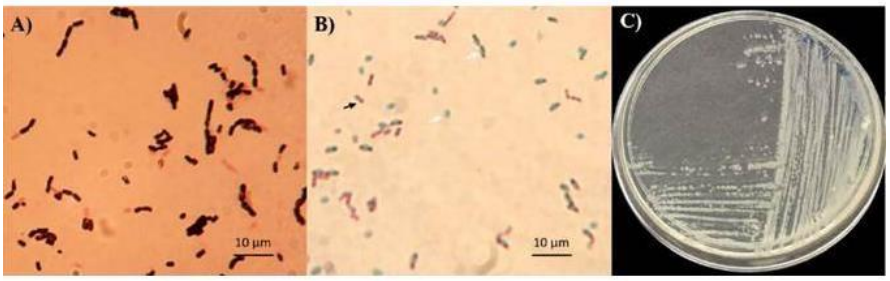
Además, el deterioro de la leche también puede ser causado por bacterias formadoras de esporas psicrotolerantes, los formadores de esporas psicrotolerantes Gram positivos incluye *Bacillus* spp. (*Bacilluslicheni formis, Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Bacillus sporothermodurans, Bacillus weihenstephanensis*), y *Paenibacillus* spp. (*Paenibacillus odorifer, Paenibacillus graminis y Paenibacillus amylolyticus*). Las esporas se encuentran en el suelo, granjas, vegetación, el ensilaje y en el tracto gastrointestinal de los animales lecheros (Quigley Let al., 2013).

Genero *Bacillus*

El género *Bacillus* está distribuido a nivel mundial por su capacidad de formar endosporas, otorgándole resistencia y crecimiento en distintos hábitats como terrestres y acuáticos, incluso soportando ambientes en condiciones extremas. Se destaca su crecimiento aeróbico o anaeróbico facultativo, Gram positivas, bacilar, tamaño entre 0.5 a 10 μm, crecimiento optimo a pH neutro, presenta variedad de rangos de temperatura de crecimiento, la mayoría de especies son mesófilas temperatura entre 30 y 40 ºC. Presenta capacidad de producir endosporas ovaladas o cilíndricas (Villareal, 2018).

Figura No.5

Características morfológicas de Bacillus spp. *A) Células bacilares, Gram positivas; B) endosporas (flecha blanca) y células bacilares (flecha negra); y C) morfología macroscópica*



Fuente: (Villareal María Fernanda et al, 2018).

Las endosporas le dan una característica al género de *Bacillus* capacidad le confiere capacidad de difusión y prevalencia en diferentes ecosistemas, estas endosporas se desarrollan en la segunda fase de su ciclo de vida, la cual se divide en dos fases, fase de crecimiento vegetativo y de esporulación. La primera fase, la bacteria crece de forma exponencial por fisión binaria, ya que se encuentra en un medio con las condiciones favorables para su crecimiento. La segunda fase comienza es una habilidad de supervivencia en presencia de algún tipo de estrés (alta densidad de población, escasez de nutrientes, factores externos como salinidad, temperatura, pH,

entre otros) (Villareal, 2018).

Bacillus sporothermodurans

Las bacterias formadoras de esporas pueden producir enzimas resistentes al calor, como proteasas y lipasas, lo que somete la vida útil de los productos lácteos, *B. sporothermodurans* produce endosporas altamente resistentes al calor (HRS). Presente en las plantas forma biopelículas en las superficies de los equipos de la industria láctea. Se inactiva a 148 °C durante 10 s o 150 °C durante 6 s. Consigue permanecer en la leche a temperatura ultra alta (UHT) después de un tratamiento térmico inadecuado. Es común en el concentrado y harina de soja para animales, ensilaje, cultivos verdes y forrajes. *B. sporothermodurans* es Gram-positivo, con un aumento óptimo a 37 °C, pH de 5 a 9 y una concentración de NaCl de hasta el 5%. Esta bacteria no es patógena, pero si se ha convertido en un problema para las industrias lácteas, ya que resiste a altas temperaturas por la generación de endosporas cuando las condiciones ambientales son aptas para su desarrollo. Su espora ha sido clasificada como altamente resistente al calor y se define como HHRS por sus siglas en inglés (**H**ighly **H**eat-**R**esistant **S**pores) siendo una bacteria mesófila productora de esporas de gran resistencia a la temperatura que pueden transportar a variaciones en la eficiencia de los procesos industriales y en la estabilidad de los productos alimenticios (Pérez et al., 2021).

Las biopelículas inducen corrosión y huecos en el acero inoxidable, lo que obstaculiza aún más la eliminación de este microorganismo siendo un inconveniente para la industria láctea (Pérez et al., 2021).

La esporulación es provocada por el agotamiento de nutrientes en el medio, antes de que los niveles de energía de la célula vegetativa hundan por debajo de valores mínimos. La contestación inmediata de la célula al agotamiento de nutrientes es la inhibición de síntesis

proteica. Los primordiales factores que asisten a la resistencia a las esporas son la impermeabilidad de su núcleo, el bajo contenido de agua y los altos niveles de ácido piridina-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico (DPA)) y los cationes divalentes en el núcleo de la espora (Kmiha et al., 2016).

G. stearothermophilus

Es una bacteria Termofílica, aeróbica, formador de esporas elipsoidales. Su temperatura máxima de crecimiento es de 65 a 75ºC, temperatura mínima de crecimiento de 40ºC, y una tolerancia limitada al acido, la bacteria no crece a 37ºC, su crecimiento optimo es a 55ºC con un tiempo generacional de 15 a 20 minutos. La hidrolisis de almidón es común, aunque algunas cepas no lo hidrolizan. El crecimiento en NaCl al 5% es escaso (Kotzekidou P., 2014).

La bacteria fue aislada por primera vez del maíz estilo crema por P.J. Donk en 1917, el hábitat natural es común del suelo, aguas termales, aguas árticas, arena del desierto, abono, sedimentos oceánicos y alimentos. En los alimentos la distribución se da a través del suelo, el agua y las plantas. La leche contiene minerales, calcio, magnesio que estimula el desarrollo de esporas de *Geobacillus* spp, en los procesos lácteos. *Geobacillus stearothermophilus* hace parte de la microflora usual de la fermentación del grano de cacao y del cacao en polvo. Es el microorganismo dominante del azúcar de remolacha y se aísla de la leche pasteurizada, la leche tratada a temperaturas ultra altas y la leche en polvo (Kotzekidou P., 2014).

Norma de Esterilidad Comercial NTC 4433 DE 2015

Método para evaluar la esterilidad comercial en alimentos, describe el método estandarizado para evaluar la esterilidad en alimentos envasados herméticamente, con el fin de detectar si estos alimentos cumplen con los requisitos de esterilización comercial, catalogados como estériles.

La esterilidad comercial de un producto tratado térmicamente, es decir, aplicando calor suficiente

al alimento, solo o combinado con otras tecnologías, se desarrolla para liberar al producto de patógenos u otros microorganismos que sean capaces de producirse en el durante su almacenamiento y distribución (ICONTEC, 2019).

Marco legal

De acuerdo con la normativa vigente se encuentra:

Decreto 616 del 2016:

El presente decreto tiene por objeto establecer el reglamento técnico a través del cual se señalan los requisitos que debe cumplir la leche de animales bovinos, bufalinos y caprinos destinada para el consumo humano.

En el artículo 11 estipula Las plantas para enfriamiento practicarán a la leche cruda para verificar la aptitud para el procesamiento las siguientes pruebas: Registro de temperatura, Control de densidad, Prueba de alcohol a toda recepción de leche por proveedor, Control de adulterantes, neutralizantes y conservantes de la leche cruda por muestreo, Lactometría o crioscopia, Recuento microbiano y Prueba de detección de antibióticos (INVIMA, 2006).

Resolución 2115 22 de junio de 2007:

Estipula las Características microbiológicas del agua para el consumo humano en el Artículo 11, deben enmarcarse dentro de los siguientes valores máximos aceptables desde el punto de vista microbiológico, los cuales son establecidos teniendo en cuenta los límites de confianza del 95% y para técnicas con habilidad de detección desde 1 Unidad Formadora de Colonia (UFC) ó 1 microorganismo en 100 cm3 de muestra. (MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL DE COLOMBIA, 2007).

Norma técnica colombiana 4433 de 2015:

Establece el procedimiento para evaluar si los alimentos en lata o bolsa herméticamente cerradas, cumplen con los requisitos de esterilización comercial a los que se sometieron, aplicándose en los alimentos considerados como comercialmente estériles. (ICONTEC, 2015).

Metodología

Basándonos en la norma de esterilidad comercial NTC 4433 del 2015 (Anexo K), se modificó el protocolo estándar de medio líquido (tubos) a medio sólido (cajas de Petri) (Anexo I), con el fin de reducir costos y tiempo en el que se obtiene resultados con la metodología estándar. Para ello se utilizaron diferentes reactivos, medios, equipos y materiales especificados en el apéndice A. Se utilizó el medio Plate Count como medio de cultivo control, ya que es un medio que aporta condiciones de crecimiento óptimas para el microorganismo (Bourgeois, 2001).
La norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 implementa en su protocolo almidón al 0.1%, a continuación, se adicionó la cantidad de almidón necesario dependiendo la cantidad de agua (ml) en el caldo BHI y en medio BHI sólido en el protocolo estándar y modificado; almidón y sin almidón, ya que *G. stearothermophilus* es una bacteria termofílica capaz de hidrolizar el almidón. La implementación sin almidón en la técnica, es con el fin de que la bacteria mesófila *Bacillus sporothermodurans* pueda crecer en el medio y detectar un posible crecimiento del microorganismo.

Selección De Matrices:

Se seleccionaron 4 matrices UHT de Pasteurizadora Santo Domingo SA: Leche entera (400ml), leche saborizada con sabor a chocolate (200ml), bebida con leche y avena sabor artificial a canela (200 ml) y crema de lecha entera (200g).
Se realizó un plan de muestreo para la selección de las matrices UHT, se incubaron seguidamente durante 10 días en condiciones de temperatura de 35°C y 55°C. Se utilizó un total de 176 matrices UHT.

Tabla No.1

Plan de muestreo de selección de matrices UHT en la Pasteurizadora Santo Domingo SA.

QUE	COMO	CUANDO	CUANTO	DONDE
1 lote Leche entera 400 ml del esterilizador 1 o 2	Una vez acordada la fecha de producción de la referencia a utilizar en el proceso. Lote: 283001	Directamente del proceso	44 muestras	22 muestras en 35ºC 22 muestras en 55ºC
1 lote Leche Saborizada chocolate (esterilizador 1 o 2)	Una vez acordada la fecha de producción de la referencia a utilizar en el proceso. Lote: 253004	Almacenamiento en ambiente	44 muestras	22 muestras en 35ºC 22 muestras en 55ºC
1 lote Bebida con leche y Avena 200 ml (esterilizador 1 o 2)	Una vez acordada la fecha de producción de la referencia a utilizar en el proceso. Lote: 283005	Almacenamiento en ambiente	44 muestras	22 muestras en 35ºC 22 muestras en 55ºC
1 lote Crema de leche entera 200g (esterilizador 1 o 2)	Una vez acordada la fecha de producción de la referencia a utilizar en el proceso. Lote: 283041	Almacenamiento en ambiente	44 muestras	22 muestras en 35ºC 22 muestras en 55ºC

Fuente: Autor

Productividad en el Medio BHI con *G. stearothermophilus* ATCC 7953

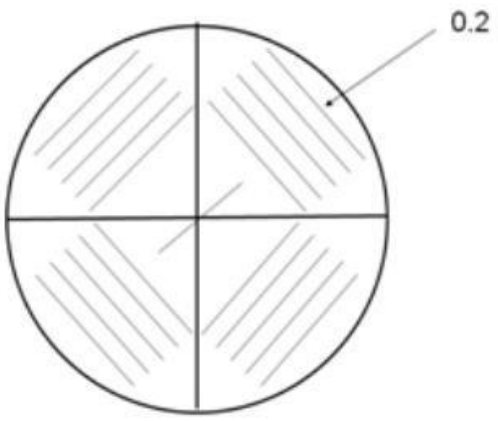
Para evaluar la productividad del medio de cultivo BHI con la cepa de *G. stearothermophilus,* esta es una cepa de referencia ATCC, las características de la cepa se detallan en el apéndice B, se llevó a cabo recuperación de la misma como se indica en el apéndice B1 para el desarrollo del test ecométrico descrito por Mossel, et al. (1983). La cepa es el microorganismo referente y el único de interés. Se tomó un cultivo fresco de la cepa en fase estacionaria.

El desarrollo del método consistió en dividir cada caja de medio de cultivo BHI en 4 cuadrantes y sobre cada cuadrante se inoculó cinco líneas, una última línea en el centro de la caja, esto de forma continua sin esterilizar el asa.

Se llevó a cabo el crecimiento de la cepa *de G. stearothermophilus* en agar Plate Count, siendo un medio de enumeración de microorganismos viables en una muestra (Clinisciences, s.f). La figura 6 enseña el esquema de la técnica del test ecométrico sobre el agar.

Figura No.6

Esquema de la técnica del test ecométrico de siembra sobre el agar a evaluar



Fuente: (Méndez M et al, s.f).

Las cajas se incubaron a 55° C durante 24 horas. Al finalizar este periodo, se procedió a realizar las lecturas, teniendo en cuenta que cada estría tiene un valor de 0.2 y la estría central de 1.0. (Méndez M et al, s.f).

Cálculo del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA)

A cada estría de cada cuadrante donde se evidenció crecimiento se adjunta un valor de 0.2, este valor se multiplica por el número de estrías donde hubo crecimiento, al presentarse

crecimiento en todas las líneas por cuadrante el resultado es 1.0. Cuando se presenta crecimiento en todas las líneas por los 4 cuadrantes y la línea central el ICA es igual a 5.0. (ICA, 2001).

El ICA determinó el grado de productividad del medio según el caso; otra medida es el índice de crecimiento relativo ICR que relaciona el resultado de ICA del medio por evaluar con el ICA del medio control, determinando la capacidad que tiene el medio a analizar de recuperar la cepa, frente a un medio nutritivo como lo es el de control (Mossel et al., 1983).

Tabla No.2

Productividad del medio de cultivo frente al índice de crecimiento absoluto (ICA) para el microorganismo de interés.

PRODUCTIVIDAD	ICA
ALTA	4.5 – 5.0
MEDIA	2.5 - 4.5
BAJA	< 2.5
NO PRODUCTIVO	0

Fuente: (Romero C et al, 2018).

Primeramente, para confirmar que los métodos; estándar y modificada son capaces de detectar el microorganismo objetivo, se empleó a *G. stearothermophilus* como control positivo, para ello en el apéndice C se detalla cómo se estandarizó el microorganismo para la inoculación en la matriz UHT; leche entera, siendo la que más se produce en la Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

Protocolo Estandarizado de la Norma de Esterilidad Comercial NTC 4433 de 2015 y Técnica Modificada

Evaluación de las Matrices e Incubación

Inicialmente en la toma de muestreo se tuvo en cuenta una inspección de las muestras antes de ejecutar el protocolo de esterilidad comercial. Se examinó visualmente todos los días cada envase de matriz UHT, durante el proceso de incubación de 10 días, donde se observó si

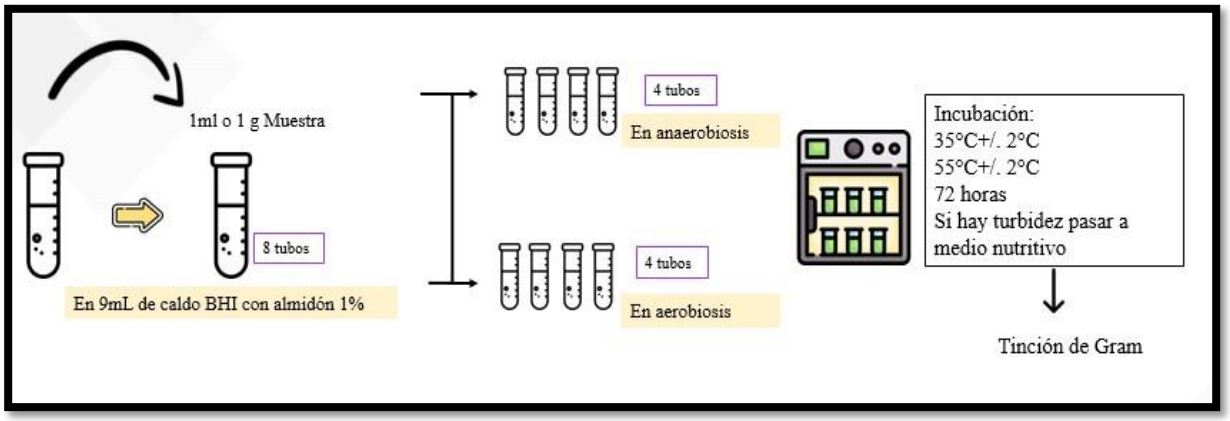
presentaba llenado excesivo o insuficiente, para descartar fugas de producto por filtración o producción de gas, lo cual se observa por abombamiento de las muestras.

Procedimiento de Acuerdo a la NTC 4433 de 2015

A partir de la matriz a analizar se tomó 1 ml y se transfirió en tubos con 9 mL de caldo BHI con almidón al 0.1%, cuatro tubos en anaerobios y cuatro tubos en aerobiosis, a una temperatura de incubación de 35°C y 55°C durante 72 horas. Los tubos con turbidez se transfirieron una asada a agar nutritivo para el análisis de tinción de Gram.

Figura No.7

Esquema metodológico del protocolo de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015.



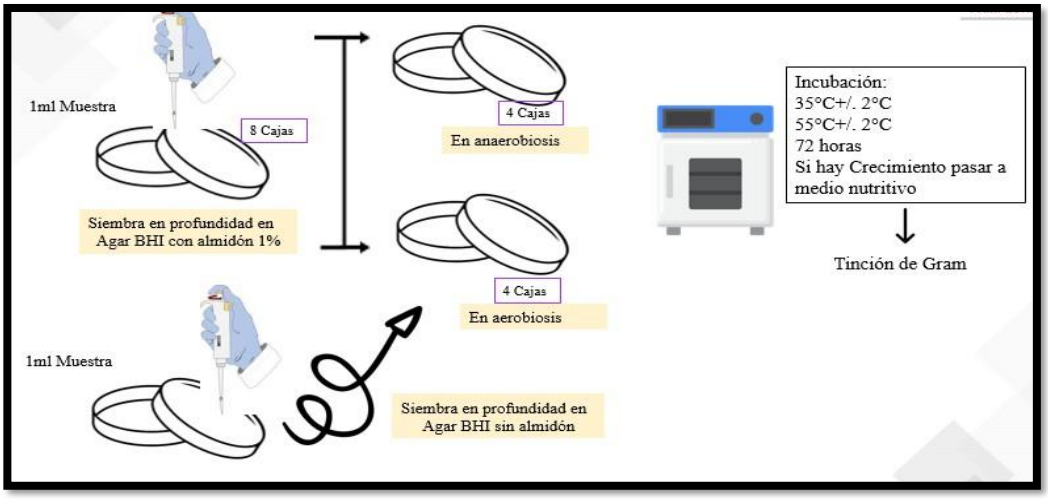
Fuente: Autor

Modificación de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015

La modificación de la técnica llevada a cabo en Pasteurizadora Santo Domingo S.A, se implementó el mismo procedimiento estandarizado de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015, cambiando únicamente el material de tubos a cajas de petri, se sembró por profundidad 1 ml de la matriz respectiva, incubando a 35°C y 55° C por 72 horas. En las cajas que presento crecimiento se transfiere una asada por aislamiento en cajas de medio nutritivo para finalmente realizar el análisis de tinción de Gram.

Figura No.8

Esquema metodológico de la modificación de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 del 2015 de tubos a cajas de petri.



Fuente: Autor

Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y método modificado.

Para la repetibilidad de las matrices UHT, el protocolo de la técnica estándar y modificada se realizó tres veces por cada matriz. Ejecutándolo una sola analista.

La prueba de reproducibilidad, se desarrolló para las dos metodologías; estándar y modificada, tres veces para cada matriz UHT, cambiando el analista que ejecuto el procedimiento.

El software estadístico Minitab versión 21.4.2.0, se utilizó para el análisis de los datos, proporciona una gama amplia de funcionalidades en herramientas estadísticas.

El reporte de datos por cada matriz UHT esta presentado en tablas, teniendo en cuenta que los resultados son cualitativos, para graficar los datos se expresaron en dos valores numéricos.

Análisis Estadístico del Sistema de Medición en el Estudio Repetibilidad y Reproducibilidad (R&R) usado en Minitab:

Cuando la interacción Operador*Parte (analista*matriz) se incluye en el modelo ANOVA, los componentes de la varianza se calculan de la siguiente forma:

Repetibilidad:

Repetibilidad = CMRepetibilidad

CM= Las diferentes fuentes tienen diferentes números de niveles o valores posibles

Operaaor:

$$\text{Operador} = \frac{CM_{\text{Operador}} - CM_{\text{Operador * Parte}}}{a * n}$$

a= número de partes; n=número de replicas

Operador*Parte:

$$\text{Operador * Parte} = \frac{CM_{\text{Operador * Parte}} - CM_{\text{Repetibilidad}}}{n}$$

***Entre las partes*:**

$$\text{Entre las partes} = \frac{CM_{\text{Parte}} - CM_{\text{Operador * Parte}}}{b * n}$$

b= numero de operadores; n=número de replicas

Reproducibilidad:

Reproducibilidad = CompVarOperador +CompVarOperador*Parte

CompVar= Componentes de la varianza, variación causada por las fuentes del error de medición.

R&R total del sistema de medición:

R&R total del sistema de medición = CompVarRepetibilidad + CompVarReproducibilidad

Variación total:

Variación total = CompVarR&R total del sistema de medición + CompVarEntre las partes

(Minitab, LLC. 2024).

Cronograma de Actividades

Tabla No. 3

Actividades realizadas durante 6 meses en pasteurizadora Santo Domingo S.A

ACTIVIDAD	JULIO				AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE				ENERO			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inducción en la planta																												
Análisis rutinario de las materias primas																												
Control de ambiente y superficies																												
Análisis de muestras UHT																												
Análisis de derivado lácteo terminado pasteurizado																												
Análisis gelatina sabores (mora azul, fresa, uva…)																												
Análisis de aguas																												
Análisis de empaque Polietileno UHT y derivado lácteo																												
Preparación de soluciones químicas																												
Calibración de equipos y materiales																												
Análisis frotis de manipuladores Planta UHT y lácteos																												
Análisis Frotis maquinas planta Lácteos																												
Redacción de actividades a realizar para la validación																												
Presentación inicial de anteproyecto																												
Presentación final de anteproyecto																												
Inicio de la verificación																												

Procesamiento de matrices UHT																												
Reactivación *Geobacillus stearothermophilus*																												
Productividad del medio de cultivo (Test Ecométrico)																												
Recuperación de *Geobacillus stearothermophilus* como control positivo																												
Pruebas de Repetibilidad y reproducibilidad																												
Recolección de datos para análisis estadístico																												
Análisis de resultados																												
Revisión bibliográfica																												
Entrega del informe final a tutor empresarial para su aval																												
Entrega del trabajo																												

Fuente: Autor

Resultados y discusión

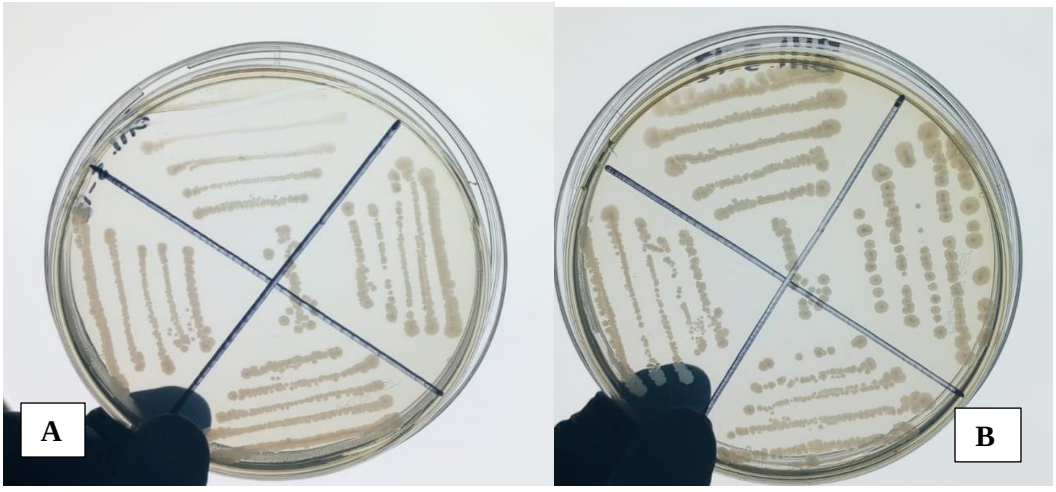
Para garantizar la fiabilidad de los resultados se realizó diariamente control de ambientes y superficies en el área de siembra detallado en el apéndice D.

Productividad del medio de cultivo BHI:

La eficacia del medio de cultivo BHI en la recuperación de la cepa de *G. stearothermophilus* se evidencia en la Figura 9, se observa el crecimiento del microorganismo en cada cuadrante en los medios de cultivo Plate Count y Agar Brain Heart Infusion (BHI), representado por cada línea.

Figura No.9

Test Ecométrico de G. stearothermophilus en agar PC; Figura A y BHI; Figura B.



Fuente: Autor

Tabla No.4

Resultado Test Ecométrico para G. stearothermophilus.

Cepa	Medio de cultivo	ICA	ICR
***Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953**	Agar BHI	5	1
	Agar PC	5	N/A

ICA**:** Índice de crecimiento absoluto, ICR: Índice de crecimiento relativo, N/A: No aplica
Fuente: Autor

En la tabla 4 se muestra los resultados de la técnica del test ecométrico por cada medio de cultivo según la sumatoria de cada línea, usando la cepa *G. stearothermophilus* y teniendo en cuenta los niveles de productividad de la tabla 2, el medio BHI es altamente productivo, con un ICA de 5, indicando una alta capacidad de crecimiento. Un valor de 5 refiere que el medio proporciona condiciones óptimas para el desarrollo de la cepa en cuestión, siendo indicativo de su idoneidad para su uso como medio de cultivo solido en la técnica modificada. (Stumbo, 1973).

El ICR confirma el buen desarrollo de *G. stearothermophilus*, donde su valor es de 1. El ICR confirma la comparabilidad de los dos medios, esto sugiere que el medio de referencia Plate Count, proporciona condiciones adecuadas para el desarrollo del microorganismo dándole fiabilidad a los resultados obtenidos en el medio de prueba. El anexo F muestra fotografías de la morfología microscópica a partir del medio de cultivo BHI utilizado en el test ecométrico.

Se llevó a cabo un control positivo con *G. stearothermophilus*, para verificar que las condiciones de las técnicas son adecuadas para el crecimiento y detección del microorganismo. garantizando que los métodos de detección funcionan correctamente, asegurando la validez de los resultados obtenidos, el paso a paso de este control positivo se especifica en el apéndice D.

Comparación de Datos por cada Matriz UHT en el desarrollo del protocolo Estandarizado de la Norma de Esterilidad Comercial NTC 4433 de 2015 y Técnica Modificada

En las tablas 5, 6, 7 y 8 se muestran los resultados obtenidos una vez realizado el muestreo directamente en las envasadoras desde la fecha de producción escogida para cada matriz UHT, incubando a temperaturas de 35ºC y 55ºC durante 10 días (Anexo H), estipulado en la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015, para cada una de las matrices UHT: Leche entera, leche saborizada sabor chocolate, bebida con leche y avena y crema de leche entera, productos

de Pasteurizadora Santo domingo S.A. Los días 1, 2 y 3 ubicado en las tablas indica el tiempo en el que se ejecutó las dos técnicas para cada matriz.

En la tabla 5, se observan los resultados de la matriz de leche entera Santo Domingo de 400ml, en el desarrollo y aplicación de la norma técnica colombiana 4433 de 2015 estándar y la técnica modificada por pasteurizadora Santo Domingo S.A. La modificación de la técnica se basó en el cambio de material del protocolo de la norma de esterilidad comercial de medio liquido en tubos a medio solido en cajas de petri, en condiciones de crecimiento aeróbico y anaeróbico.

La norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 (Anexo K), es un estándar establecido para garantizar la calidad y seguridad de los productos comerciales mediante la evaluación de su esterilidad, el análisis con la matriz de leche entera determina la conformidad con los requisitos establecidos por la norma. Los datos recopilados se presentan en forma de tabla, con presencia o ausencia de microorganismos siendo de carácter cualitativo con los indicadores específicos de esterilidad según los criterios definidos por la norma.

Tabla No.5

Resultados obtenidos de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, Leche entera (400ml). Lote: 273001-283001.

TIEMPO		NTC 4433 2015 ESTANDAR							
DIAS	Matriz UHT	Tubo 35ºC aerobiosis sin almidón	Tubo 35ºC aerobiosis con almidón	Tubo 35ºC anaerobiosis sin almidón	Tubo 35ºC anaerobiosis con almidón	Tubo 55ºC aerobiosis sin almidón	Tubo 55ºC aerobiosis con almidón	Tubo 55ºC anaerobiosis sin almidón	Tubo 55ºC anaerobiosis con almidón
1	Leche entera	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
DIAS	Matriz UHT	NTC 4433 2015 MODIFICADA							
		Caja 35ºC aerobiosis sin almidón	Caja 35ºC aerobiosis con almidón	Caja 35ºC anaerobiosis sin almidón	Caja 35ºC anaerobiosis con almidón	Caja 55ºC aerobiosis sin almidón	Caja 55ºC aerobiosis con almidón	Caja 55ºC anaerobiosis sin almidón	Caja 55ºC anaerobiosis con almidón
1	Leche entera	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Nota: Para graficar los resultados presencia equivale a 1, y ausencia a 0.
Fuente: Autor

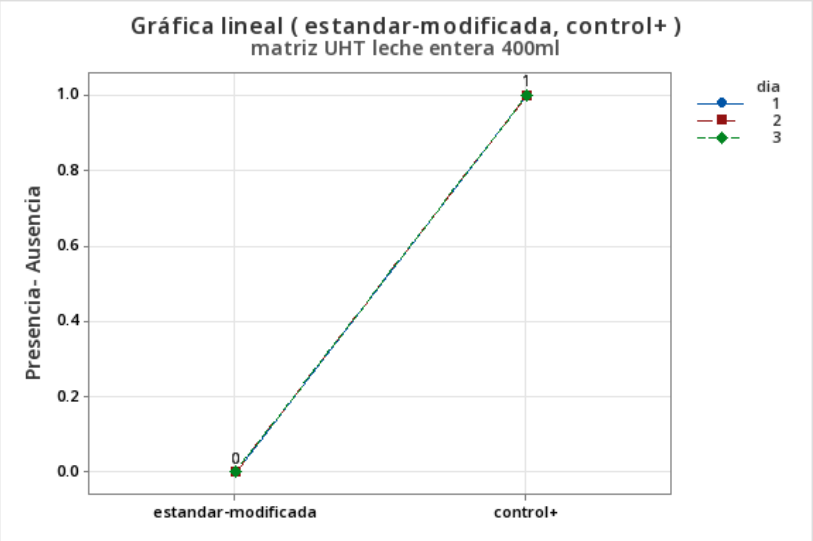
Para tener un muestreo representativo de cada uno de los lotes aplicados en la verificación se ejecutó un muestreo del inicio, mitad y final de la producción, se seleccionó la muestra UHT inicial incubada a una temperatura de 35ºC (mesófilos) y la muestra UHT final a una incubación de 55ºC (termófilos). Este es un proceso interno de Pasteurizadora Santo Domingo S.A para el procesamiento de muestras UHT rutinarias.

La figura 10 muestra el análisis de los datos de la matriz UHT entera y el control positivo, la presencia con un valor de uno, y la ausencia con un valor de cero, con el fin de llevar a cabo la representación gráfica de los valores obtenidos durante la aplicación de la técnica estándar y

modificada.

Figura No.10

Gráfica lineal de la técnica estándar y modificada vs el control positivo de la matriz UHT de leche entera Santo Domingo de 400ml.



Fuente: Minitab, LLC. Versión 21.4.2.0 (Garzón, 2024).

Nota: Grafica lineal de los resultados obtenidos de la técnica estándar y modificada de NTC 4433de 2015 en matriz UHT, Leche entera 400 ml, en el transcurso de tiempo de tres días; línea azul: día 1; línea roja: día 2; línea verde: día 3; presencia que equivale a 1 y ausencia a 0 de microorganismos vs el control inoculado con *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953.

Los datos según la ausencia y presencia de la metodología estándar NTC 4433 de 2015 y modificación para la matriz UHT entera en la figura 10, se realizó con el fin de comparar los valores obtenidos de las metodologías vs el control positivo de la muestra de leche entera, se evidenció que a lo largo del tiempo (días) los resultados fueron los mismos, observándose que las metodologías están ubicadas en el mismo punto de la gráfica, es decir en el valor asignado como 0. La norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 modificada es confiable para su aplicación reproduciendo los mismos resultados que la técnica estándar y cumpliendo con los

criterios de aceptación del método estándar de la NTC 4433 de 2015.

Para detectar la presencia o ausencia de microorganismos en los resultados obtenidos por el protocolo de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 estandarizada, es necesario el pase de medio liquido (en tubo) a un medio nutritivo sólido, el medio utilizado fue el medio Plate Count para posteriormente realizar tinción de Gram. Gran parte de los productos UHT del proceso, el principal ingrediente es la leche, siendo productos con una tonalidad blanca, el caldo BHI presenta siempre tonalidad oscura dependiendo el color de la muestra, siendo difícil de establecer para el ojo humano, la presencia de microorganismos.

Esta complicación se debe a los contaminantes naturales de la leche que pueden contribuir a esa turbidez, como grasas, proteínas y minerales. Esto puede dificultar la distinción entre la turbidez causada por microorganismos y la turbidez inherente a la leche (Hillerton & Berry, 2003). Por ello la necesidad de modificar la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015, ya que el cambio de medio liquido a medio sólido mejora la detección de los microorganismos que puedan estar presentes en algún alimento. Los medios sólidos como el agar BHI pueden permitir una mejor visualización de las colonias microbianas en comparación con los medios líquidos, esto facilita el recuento de microorganismos presentes en una matriz UHT. Asimismo, la modificación de la técnica permite reducir costos y tiempo, reduciéndose el uso de láminas de portaobjeto, disminuyendo el pase de medio liquido a un medio sólido.

La tabla 6, presenta los resultados obtenidos en la matriz UHT de leche saborizada con sabor artificial a chocolate, en el contexto de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y la técnica que fue modificada empleando un medio sólido en cajas de petri. Los resultados muestran ausencia de crecimiento, esto indica que el producto cumple con los criterios de esterilidad establecidos por la norma.

Tabla No.6

Resultados de la técnica estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, Leche Saborizada Dominguita con sabor a chocolate (200ml). Lote: 253004- 263004

Fuente: Autor

TIEMPO		NTC 4433 2015 ESTANDAR							
DIAS	Matriz UHT	Tubo 35ºC aerobiosis sin almidón	Tubo 35ºC aerobiosis con almidón	Tubo 35ºC anaerobiosis sin almidón	Tubo 35ºC anaerobiosis con almidón	Tubo 55ºC aerobiosis sin almidón	Tubo 55ºC aerobiosis con almidón	Tubo 55ºC anaerobiosis sin almidón	Tubo 55ºC anaerobiosis con almidón
1	Leche saborizada chocolate	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
DIAS	Matriz UHT	NTC 4433 2015 MODIFICADA							
		Caja 35ºC aerobiosis sin almidón	Caja 35ºC aerobiosis con almidón	Caja 35ºC anaerobiosis sin almidón	Caja 35ºC anaerobiosis con almidón	Caja 55ºC aerobiosis sin almidón	Caja 55ºC aerobiosis con almidón	Caja 55ºC anaerobiosis sin almidón	Caja 55ºC anaerobiosis con almidón
1	Leche saborizada chocolate	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Pasteurizadora Santo Domingo S.A cuenta con tres referencias de leche saborizada; con sabor artificial a fresa, vainilla y chocolate, para el proceso de verificación de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015, se optó por la leche saborizada con sabor artificial a chocolate, ya que *G. stearothermophilus* es un tema de preocupación en la calidad de los alimentos a base de cacao, debido a la presencia del microorganismo en materias primas y por la capacidad de las esporas de resistir el procesamiento térmico (Pereira et al, 2019).

La diversidad microbiana en las fermentaciones del grano de cacao se ve influenciada por factores como la ubicación geográfica y los diversos parámetros del proceso, como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH y la tensión de oxígeno. De hecho, (Rodríguez et al, 2022) aislaron *G. stearothermophilus* de granos de cacao que se sometieron a temperaturas de secado y tostado de 150°C. La pulpa de cacao en un aumento de la aireación, con pH (3.5 a 5)

y temperatura aproximadamente a 45 °C en la masa de cacao para las últimas etapas de la fermentación se asocian con el desarrollo de bacterias aerobias formadoras de esporas del género *Bacillus*. Muchos *Bacillus* spp. son termotolerantes y otros crecen bien a temperaturas elevadas, por ejemplo *G. stearothermophilus*.

Con respecto a los resultados de la matriz UHT de la bebida con leche y avena de 200 ml en la tabla 7, la tabla muestra ausencia de crecimiento en las dos metodologías; Técnica estándar de la norma y la modificación de la misma.

Tabla No.7

Resultados de la técnica estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, bebida con leche y avena (200ml) con sabor artificial a canela. Lote: 253005.

TIEMPO	**Matriz UHT**	**NTC 4433 2015 ESTANDAR**							
DIAS		**Tubo 35ºC aerobiosis sin almidón**	**Tubo 35ºC aerobiosis con almidón**	**Tubo 35ºC anaerobiosis sin almidón**	**Tubo 35ºC anaerobiosis con almidón**	**Tubo 55ºC aerobiosis sin almidón**	**Tubo 55ºC aerobiosis con almidón**	**Tubo 55ºC anaerobiosis sin almidón**	**Tubo 55ºC anaerobiosis con almidón**
1	**Avena Sabor a canela**	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
DIAS	**Matriz UHT**	**NTC 4433 2015 MODIFICADA**							
		Caja 35ºC aerobiosis sin almidón	**Caja 35ºC aerobiosis con almidón**	**Caja 35ºC anaerobiosis sin almidón**	**Caja 35ºC anaerobiosis con almidón**	**Caja 55ºC aerobiosis sin almidón**	**Caja 55ºC aerobiosis con almidón**	**Caja 55ºC anaerobiosis sin almidón**	**Caja 55ºC anaerobiosis con almidón**
1	**Avena Sabor a canela**	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: Autor

La bebida con leche y avena Santo Domingo, contiene un sabor artificial a canela, la fécula tiene

propiedades espesantes y gelificantes, es una fuente de carbohidratos, contiene fibra, es ricaen proteínas, grasas saludables e hidratos de carbono. Contiene minerales como Calcio, hierro y potasio (Pérez B, 2015).

En la tabla 7, la ausencia de crecimiento de microorganismos en la bebida UHT, se debe al proceso de ultra alta temperatura (UHT) al que fue sometida el producto, ya que este proceso elimina en su totalidad los microorganismos presentes en la bebida con leche y avena, lo que contribuye a su larga vida útil. Además, el envasado hermético y las condiciones de almacenamiento también son factores clave para evitar el crecimiento de microorganismos.

La tabla 8, muestra los resultados obtenidos en el laboratorio utilizando la matriz UHT de crema de leche Santo Domingo x 200 gramos, en donde no se detectó presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) en ninguna de las dos metodologías evaluadas.

Tabla No.8

Resultados de la técnica estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y técnica modificada en la matriz UHT, Crema de leche (200g). Lote:283041

TIEMPO	**Matriz UHT**	**NTC 4433 2015 ESTANDAR**							
DIAS		**Tubo 35ºC aerobiosis sin almidón**	**Tubo 35ºC aerobiosis con almidón**	**Tubo 35ºC anaerobiosis sin almidón**	**Tubo 35ºC anaerobiosis con almidón**	**Tubo 55ºC aerobiosis sin almidón**	**Tubo 55ºC aerobiosis con almidón**	**Tubo 55ºC anaerobiosis sin almidón**	**Tubo 55ºC anaerobiosis con almidón**
1	**Crema de leche**	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
DIAS	**Matriz UHT**	**NTC 4433 2015 MODIFICADA**							
		Caja 35ºC aerobiosis sin almidón	**Caja 35ºC aerobiosis con almidón**	**Caja 35ºC anaerobiosis sin almidón**	**Caja 35ºC anaerobiosis con almidón**	**Caja 55ºC aerobiosis sin almidón**	**Caja 55ºC aerobiosis con almidón**	**Caja 55ºC anaerobiosis sin almidón**	**Caja 55ºC anaerobiosis con almidón**

1	**Crema de leche**	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: Autor

Los resultados del control positivo en la tabla 9, muestran la presencia del crecimiento de *G. stearothermophilus,* sometiendo la cepa a choque térmico a 80°C durante 10 minutos y sembrando directamente sin ningún otro proceso.

Tabla No.9

Resultados del control positivo, cepa de G. stearothermophilus ATCC 7953 inoculada en matriz UHT Entera.

Matriz UHT + *G. stearothermophilus* ATCC 7953		**NTC 4433 2015 ESTANDAR**							
		Tubo 35ºC aerobiosis sin almidón	**Tubo 35ºC aerobiosis con almidón**	**Tubo 35ºC anaerobiosis sin almidón**	**Tubo 35ºC anaerobiosis con almidón**	**Tubo 55ºC aerobiosis sin almidón**	**Tubo 55ºC aerobiosis con almidón**	**Tubo 55ºC anaerobiosis sin almidón**	**Tubo 55ºC anaerobiosis con almidón**
Leche entera	**Choque Térmico**	Presencia	Presencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
	Directo	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Matriz UHT + *G. stearothermophilus* ATCC 7953		**NTC 4433 2015 MODIFICADA**							
		Caja 35ºC aerobiosis sin almidón	**Caja 35ºC aerobiosis con almidón**	**Caja 35ºC anaerobiosis sin almidón**	**Caja 35ºC anaerobiosis con almidón**	**Caja 55ºC aerobiosis sin almidón**	**Caja 55ºC aerobiosis con almidón**	**Caja 55ºC anaerobiosis sin almidón**	**Caja 55ºC anaerobiosis con almidón**
Leche entera	**Choque Térmico**	Presencia	Presencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
	Directo	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

Fuente: Autor

La verificación de la norma de esterilidad comercial técnica colombiana 4433 del 2015 y el método modificado, se lleva a cabo bajo el uso de un control positivo con *G. stearothermophilus*

ATCC 7953, con el fin de evidenciar la validez de la metodología detectando la presencia de microorganismos presentes en la leche UHT.

Figura No.11

Grafica de serie de tiempo de los resultados en los diferentes días en el desarrollo de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y modificación en las 4 Matrices UHT.



Fuente: Minitab, LLC. Versión 21.4.2.0 (Garzón, 2024).

La figura 11, muestra el resultado para cada una de las matrices usadas en el proceso de verificación; en este caso se observa solapamiento en los resultados de cada una de las matrices, debido a que el resultado unánime fue ausencia de crecimiento o desarrollo microbiológico, todo esto comprobando que el proceso de ultrapasteurización utilizado en Pasteurizadora Santo Domingo S.A es afectivo y garantiza la calidad e inocuidad de sus productos UHT.

Se ha demostrado que algunas condiciones son capaces de inducir la producción de esporas mucho más resistentes aplicando choques térmicos a células en esporulación (Gómez, 2016). Según (Vargas, 2002) el microorganismo *G. stearothermophilus* puede crecer en presencia de

almidón ya que lo hidroliza, debido a que las amilasas producidas mayormente por hongos y bacterias del género de *Bacillus* spp producen mayormente la enzima α-amilasa siendo estas enzimas que degradan el almidón.

G. stearothermophilus es utilizado como indicador biológico ya que proporciona un medio para afirmar la muerte de un microorganismo asegurando la calidad y validar procesos de esterilidad. Las esporas de esta bacteria son termotolerantes, encontrándose normalmente en suelo y agua. Debido a esto estas esporas son empleadas para determinar el efecto esterilizante del proceso de pasteurización, incluso el proceso UHT (Gómez, 2016).

G. stearothermophilus no se considera patógeno, ya que no hay reportes de que cause enfermedades en el hombre o en animales, sin embargo, produce desbalances económicos, al ser un microorganismo deteriorante para ciertos productos. Esto debido a que el microorganismo puede contaminar muchos ambientes por su capacidad de producir esporas (Gómez, 2016).

La presencia de estos microorganismos también se asocia con biopelículas en los equipos, producen enzimas resistentes al calor, como proteasas y lipasas, lo que reduce la vida útil de los productos lácteos, ejemplo, *Bacillus sporothermodurans* produciendo endosporas altamente resistentes al calor (HRS) y *G. stearothermophilus* formador de esporas termófilas (Pérez et al, 2021).

Comparando los resultados de la técnica estándar de la norma de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y la modificación en medio solido en cajas de petri se evidencia con los resultados representados en las tablas 6,7, y 8, siendo este último el control positivo, el proceso UHT de Pasteurizadora Santo Domingo S.A, garantiza la seguridad microbiológica de los productos al someterlos a altas temperaturas durante un periodo corto de tiempo y luego envasarlo en condiciones asépticas permitiendo que la leche tenga una vida útil prolongada sin la necesidad de

refrigerar.

Desde el anexo A hasta el D, se muestra las trazabilidades de los lotes por cada matriz UHT empleados en la verificación de las técnicas, esto permite conocer la procedencia de la leche utilizada en el proceso de producción. Es fundamental llevar estos registros para garantizar la seguridad, calidad y cumplimiento normativo en la industria alimentaria.

Análisis de la Repetibilidad y Reproducibilidad entre el Método de Esterilidad Comercial NTC 4433 de 2015 con el Método Modificado:

Para la verificación de la norma de esterilidad comercial y el método modificado se realizó el estudio de repetibilidad y reproducibilidad con el objetivo de identificar la experticia de los analistas en la aplicación de las técnicas en el procesamiento de muestras en el laboratorio.

Las tablas 10 y 11 presentan los datos recopilados por los dos analistas según las 4 matrices UHT analizadas, donde se observó ausencia de crecimiento, observando la concordancia entre analistas llegando a los mismos resultados para todas las muestras en ambas metodologías aplicadas.

Tabla No.10

Resultados cualitativos obtenidos del método de repetibilidad en la aplicación de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y método modificado.

Día	Repetibilidad	NTC 4433 de 2015	Método Modificado
1	Leche entera, Leche saborizada chocolate, avena y crema de leche.	Ausencia	Ausencia
2		Ausencia	Ausencia
3		Ausencia	Ausencia

Nota: Para la repetibilidad de las muestras, Por cada matriz UHT el método de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y el método modificado en cajas de Petri se repitió 3 veces en días distintos. Para graficar los datos también se tomó los resultados de Presencia con un valor de 1 y Ausencia como 0.

Fuente: Autor

Tabla No.11

Resultados cualitativos obtenidos del método de reproducibilidad.

Analista	Reproducibilidad	NTC 4433 de 2015	Método modificado
Analista 1	Leche entera, Leche saborizada chocolate, avena y crema de leche.	Ausencia	Ausencia
Analista 2	Leche entera, leche saborizada chocolate, avena y crema de leche.	Ausencia	Ausencia

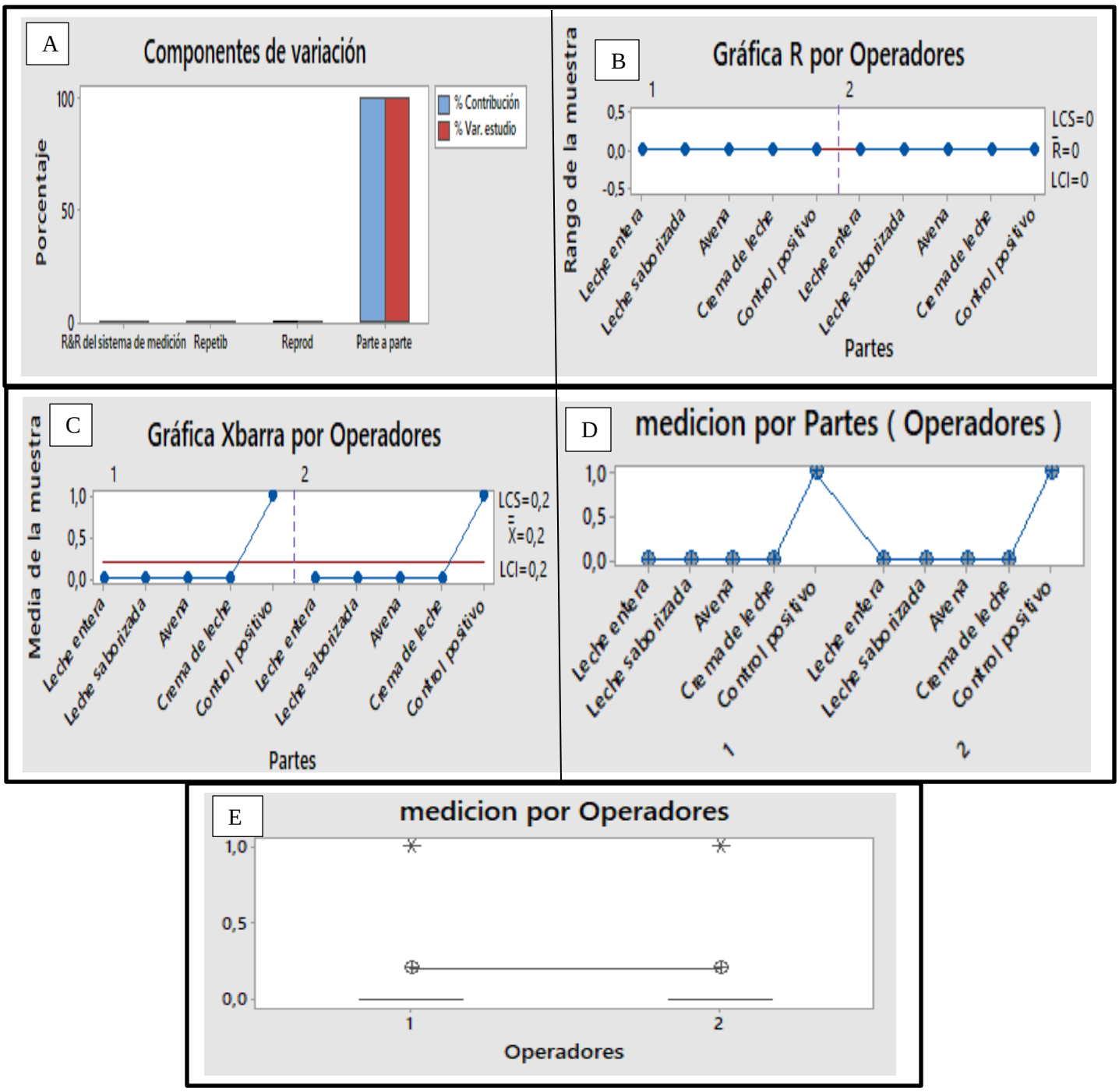
Nota: La reproducibilidad fue evaluada por una analista diferente desarrollando las dos metodologías en las mismas condiciones en intervalos de tiempo (días) entre cada matriz UHT.
Fuente: Autor

La evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad en una metodología estándar y modificada es esencial ya que determina si los resultados obtenidos son consistentes y confiables. Al comparar la metodología estándar y modificada, es importante analizar si ambas técnicas ofrecen resultados similares y reproducibles. Esto garantiza que la modificación introducida no afecte la precisión de los resultados.

En la figura 12 se observa el estudio R&R realizado con Minitab, este gráfico muestra las medias o los rangos de las medidas tomadas por distintos operadores o en distintos periodos de tiempo. Se buscó identificar si hay diferencias significativas entre las mediciones de los analistas y si hay variabilidad excesiva en el proceso.

Figura No.12

Informe de repetibilidad y reproducibilidad (R&R) del método de esterilidad comercial NTC 4433 de 2015 y método modificado en matrices UHT.



Minitab, LLC. Versión 21.4.2.0 (Garzón, 2024).

De acuerdo a las directrices de AIAG (Automotive Industry Action Group), si la variación del sistema de medición es inferior al 10% de la variación del proceso, entonces el sistema de medición es catalogado aceptable o excelente; por tanto, en la figura 12 el porcentaje de R&R es de 0% considerando la precisión de las técnicas eficiente y la aplicación de la misma aceptable.

El panel B de rango de la muestra por operadores en la figura 12, los puntos de las muestras indican el rango para la aceptabilidad de las metodologías NTC 4433 de 2015 y la modificación, se observa que ninguna de las matrices esta fuera del rango.

El panel C de media de las muestras, representa la variación entre las muestras por cada analista, graficándose el control positivo como referencia de la presencia de la cepa de *G. stearothermophilus* ATCC 7953.

En la figura 12, panel D, se observa la dispersión de las mediciones por cada matriz UHT: Leche entera, leche saborizada sabor chocolate, bebida con leche y avena y crema de leche entera, indicando si las múltiples mediciones por muestra están cercanas entre sí, no hay dispersión de los resultados obtenidos por matriz UHT.

El panel E, indica la medición por Operador, es una representación visual de lo que sucede con los dos sistemas de medición frente a los dos analistas, con el fin de conocer y comparar que analista tiene una medición más precisa en el desarrollo de las técnicas, la imagen arroja las cajas para los sistemas de medición por analista 1 y 2, presentan un sistema de medición del mismo tamaño, debido a que a lo largo del desarrollo del diseño experimental ninguna de las analistas presento falsos positivos en los resultados obtenidos.

Conclusiones

Se determinó que el medio de cultivo Brain Heart Infusión (BHI) es altamente productivo, proporcionándole a *G. stearothermophilus* ATCC 7953, los nutrientes necesarios para su crecimiento.

La comparación de resultados por cada matriz UHT en la aplicación del método estandarizado de la NTC 4433 de 2015 indicó el cumplimiento de los parámetros como alimentos comercialmente estériles de manera satisfactoria. Se observó la concordancia de los resultados por matriz UHT obtenidos entre el protocolo modificado con el método estándar, indicando que la técnica modificada podría ser una alternativa viable a la metodología estándar.

En el estudio R&R, se encontró que las condiciones de repetibilidad a lo largo del tiempo (días) no mostraron variaciones atribuibles a las metodologías empleadas. Además, se observó que el cambio de material no afecta los resultados en cuanto al método de esterilidad comercial. En cuanto a la reproducibilidad del estudio, se obtuvieron resultados consistentes bajo las mismas condiciones, independientemente del analista que llevase a cabo la metodología, ya que el sistema de medición permaneció constante.

Recomendaciones o sugerencias

Para la inoculación en la matriz UHT como control positivo, se recomienda usar siempre en la estandarización del inoculo a partir de la solución 0.5 McFarland ($1,5*10^8$ UFC/mL).

Realizar la verificación de la norma sumándole otro microorganismo de referencia ATCC como *Bacillus sporothermodurans* siendo un microorganismo también de interés por su capacidad de producir endosporas resistentes a altas temperaturas, esto permitiría tener una mayor confiabilidad de los resultados obtenidos.

Para las metodologías de repetibilidad y reproducibilidad se recomienda realizar más repeticiones de la técnica de referencia y modificada, para obtener variabilidad de los datos o precisión a través del tiempo.

Glosario

Alveolos: capa de células que rodean la cavidad central de la ubre de la vaca

Acidificación: Aumento de la concentración de ácido láctico

Aeróbico: Proceso que hace uso del oxígeno para obtención de energía y crecimiento

Anaeróbico facultativo: Proceso que no depende del oxígeno para su crecimiento

Autoclave: Esterilizador a vapor

Asa bacteriológica: Instrumento de laboratorio hecho de platino utilizada para transvasar un inoculo

Biopelículas: Capa de bacterias u otros microbios que crecen y se adhieren a la superficie de una estructura

Cepa ATCC: Cepa de referencia para el control de calidad interno en la microbiología

Crioscopia: Parámetro basado en el punto de congelación de la leche

Contador de colonias: visualizador digital semiautomático para contar los microorganismos

Esterilidad: Consiste en la eliminación de microorganismos en alimentos

Esporulados termorresistentes (HHRS): Microorganismos capaces de producir esporas y con gran resistencia al calor

Fisión binaria: Proceso que las bacterias utilizan para la división celular

Frasco Schott: Proporciona almacenamiento con alta resistencia química

Inoculación: Introducir artificialmente una porción de muestra en un medio adecuado

Incertidumbre: Es una indicación cuantitativa de la calidad del resultado, generando más confiabilidad

Índice de crecimiento absoluto (ICA): Denota la recuperabilidad del organismo en el medio de cultivo

Lactometría: Técnica en la que se usa un lactómetro para medir la densidad de la leche

Microbiota: principales microorganismos que residen en tracto gastrointestinal

Microflora: principales microorganismos que residen en el suelo, agua, vegetación o alimentación animal

Mastitis: infección dolorosa del tejido mamario en bovinos

Paratuberculosis: Especie de infección bacteriana crónica y contagiosa

Repetibilidad: Variación causada por el dispositivo de medición

Reproducibilidad: Capacidad de un experimento de ser reproducido o replicado

Unidad formadora de colonia (UFC): Indicador de la cantidad de microorganismos vivos en el líquido

Ultrapasteurización (UHT): proceso térmico utilizado para la eliminación de microorganismos

Referencias

Boque, R. (2004). El límite de detección de un método analítico. ISSN 0371-5728, págs. 878-881

Bourgeois, C. M. (2001). Enumeration of microorganisms. In Modern Food Microbiology (7th ed., pp. 66-91). Springer.

Bruckner, D. A. (2012). McFarland Standards as the Reference of Choice for Bacterial Cell Density Measurements. Journal of Microbiology & Biology Education, 13(2), 121–123. https://doi.org/10.1128/jmbe.v13i2.446.

Cangliang, S., & Zhang, Y. (2022). External conditions for bacterial growth (temperature,pH, oxygen, osmotic). *Introductory Microbiology Lab Skills and Techniques in Food Science.* Cap 13. 59-64.

Clinisciences. (s.f.). Plate Count Agar (PCA). Non-selective. Recuperado de https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-plate-count-agar-pca-non-selective-5497.html

Deeth, H. (2021). Improving UHT processing and UHT milk products. WoodheadPublishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Pag 302-329.

Gómez, M. (2016). Actividad Termoprotectora de Exometabolitos en microorganismos esporulados. [como requisito parcial para obtener el grado de doctor en ciencias con especialidaden microbiología]. Universidad Autónoma de Nuevo Leon.

Gilligan, P. H., & Shapiro, D. S. (2014). Cases in Medical Microbiology and Infectious Diseases (4th ed.). ASM Press.

Hillerton, J. E., & Berry, E. A. (2003). Interpretation of Bacteriological Results from Milk Samples. In: Mastitis Control in Dairy Herds. CABI Publishing.

ICONTEC (2019*). Norma técnica colombiana de 2015.* Metodo para evaluar la esterilidad commercial en alimentos. Colombia.

INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) (2006). Decreto 616. 28 de febrero de 2006.

Kotzekidou, P. (2014). *Geobacillus stearothermophilus* (Formerly *Bacillus stearothermophilus Encyclopedia of Food Microbiology. (Second Edition).*

Minitab, LLC. (2024). Minitab Inc. Versión 21.4.2.0. https://app.minitab.com

Ministerio de la protección social. (2007). Resolución 2115. 22 de junio de 2007.

Muñoz, A. (2016). Validación de métodos microbiológicos. INVIMA. [Archivo PDF]. https://www.invima.gov.co/sites/default/files/el-instituto/red-laboratorios/Validación%20cualitativa%20Microbiología.pdf

https://hive.blog/hive-196387/@emiliomoron/la-qu-mica-detr-s-de-1586870871

Pasteurizadora Santo Domingo. (2021). Alimentamos. https://santodomingo.com.co/portfolio/avena/

Pereira Ana P, et al. (2019). Inactivation kinetics of Bacillus cereus and Geobacillus stearothermophilus spores through roasting of cocoa beans and nibs. Volume 111, Pages 394-400.

Pérez, B. (2015). Los beneficios de consumir avena a diario. [Página web].FarmaciaQuintalegre. Recuperado de: https://farmaciaquintalegregranada.es/farmacia/nutricion-y-dietética/beneficios-consumir-avena/

Pérez et al. (2021). Incidence of *Bacillus cereus, Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra-high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates. International Journal of Food Microbiology. Volume 354, 16 September 2021

Quigley L et al., (2013). The complex microbiota of raw milk. Pubmed. Obtenido de: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23808865/

Rincón, M. (2013, 8 de febrero). *Pasteurizadora SantoDomingo S.A.*[publicación]. Facebook.https://www.facebook.com/sabornacionalcafe/photos/a.206838419460085/215122958631631/?t ype=3

Rosenberg, M. (2022). UHT Sterilized Milks. Encyclopedia of Dairy Sciences (Thirdedition). Pag 477-488

Rodríguez, et al. (2022). El cultivo del cacao, sus características y su asociación con microorganismos durante la fermentación. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Santo Tomás. C.P. 11340. Ciudadde México, México. http://doi.org/10.5281/zenodo.6326782

Romero C, et al. (2018). Evaluación de medios de cultivo naturales para el mantenimiento de Colletotrichum sp., y Saccharomyces cerevisiae. Universidad Popular del Cesar, Colombia. https://doi.org/10.22517/23447214.17881

Stumbo, C. R. (1973). Thermobacteriology in Food Processing (2nd ed.). Academic Press.

Vargas, S. (2002). Selección y evaluación de bacterias del género de Bacillus productoras de amilasas en cultivos sumergidos. [Tesis para optar el grado académico de Magister en Biotecnología]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Villa Real, M. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Rev. mex. fitopatol vol.36 no.1

Anexos

Anexo A. *Trazabilidad leche entera de 400 ml.*

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	1 DE 3

1. MOTIVO DE LA TRAZABILIDAD

Queja o reclamo		Fecha	26/12/2023	Cliente		Consecutivo	100-23
Programado	X	Externo		Motivo	VALIDACIÓN NORMA DE ESTERILIDAD COMERCIAL		

2. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO

REFERENCIA	LOTE/ BOQUILLA	FECHA FABRICACION	FECHA VENCIMIENTO
Leche Entera UAT-UHT Santodomingo x 400 ml	273001 283001	27/10/2023	26/12/2023

3. ANALISIS FISICOQUIMICO Y MICROBIOLOGICO PRODUCTO TERMINADO

							Concepto
Densidad 15/15ºC g/mL	1,03	Estabilidad Proteica	Negativo	Análisis Microbiologico			Cumple
Grasa %m/v	3,1	Ebullición	Cumple	Recuento Mesofilos 48 Horas 35ºC		≤ 1 UFC/ml	
Crioscopia ºH	-0,534	Acidez %m/v	0,143				
pH	6,6	Sensorial	Cumple	Esterilidad Comercial	Aerobia 35ºC	Ausente	
Proteina %m/m	2,90	Temperatura ºC	25,62		Anaerobia 35ºC	Ausente	
Extracto seco desengrasado % m/m	8,26	Peroxidasa	Negativo		Aerobia 55ºC	Ausente	
Extracto seco total % m/m	11,36	Fosfatasa	Negativo		Anaerobia 55ºC	Ausente	

Insumo/ Material de empaque	Lote	Proveedor	Código de Analisis	Codigo de liberación	Fecha de Recepción	Fecha de liberación
Polietileno Entera 400 ml	1400131077	Novalene	556 FMPU 168 MMPU	574U	18/10/2023	24/10/2023
Tripolifosfato de sodio	10171653	Multingredientes	554 FMPU 166 MMPU	576U	18/10/2023	24/10/2023

5. CONTROL DE PESO, SELLADOS Y TRAZABILIDAD

Control de peso	Cumple	Control de sellados	Cumple	Control Trazabilidad-Rotulado	Cumple

6. ENVASADORA ASEPTICA

Codigo / Causa	Hora Inicio	Hora Final	Boquilla	Motivo	
Durante el proceso de envasado unicamente se presentaron paradas normales propias del proceso por cambios de rollos, lo cual no afecta la inocuidad del producto.					
Temp. de peroxido ºC	35°C	Concentración de peroxido %	39%		

7. ANALISIS FISICOQUIMICO PRODUCTO EN PROCESO

Silo	Temp ºC	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Estabilidad Rasmdell	Sensorial	Concepto
1	6ºC	1,0307	3,01	-0,535	0,131	6,78	2,92	Negativo	Caracteristico	**Cumple**
3	6ºC	1,031	3,3	-0,53	0,137	6,78	3,03	Negativo	Caracteristico	**Cumple**
9	6ºC	1,0305	3,14	-0,535	0,135	6,78	2,93	Negativo	Caracteristico	**Cumple**

8. CONTROL DE PRODUCCIÓN

Equipo	Fecha	Hora	Actividad	% Soda	% Acido	Concepto
Esterilizador 2 y Envasadora 2	27/10/2023	0:10	Lavado general Inicial	2,42	1,37	Cumple
Esterilizador 2 y Envasadora 2	28/10/2023	0:40	Lavado general Final	2,59	1,41	
Área	**Fecha**	**Hora**	**Actividad**	**Desinfectante**	**Concentración**	
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	03:00	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	
AMBIENTE ESTERILIZADOR	27/10/2023	03:00	Nebulización del área	BIGUDEX	200	
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	8.15	Nebulización del área	BIGUDEX	200	
AMBIENTE ESTERILIZADOR	27/10/2023	11.30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	13:30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	

Fecha	Hora inicio	Hora Final	Envasadora	Esterilizador	Cantidad entregada a Logistica
27/10/2023	4:04	14:00	2	2	64.892

9. ANALISIS FISICOQUIMICO MATERIA PRIMA

Fecha del recibo	Ruta	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Antibiotico	Sensorial	Concepto
RECIBO JUEVES PM (26/10/2023)	FRIAS	1,0303	3,52	-0,540	0,141	6,6	2,95	No dectectable	Caracteristico	Cumple
	GUACHETA	1,0302	3,66	-0,535	0,145	6,6	3,11	No dectectable	Caracteristico	
	ESMERALDA	1,0306	3,73	-0,537	0,150	6,6	3,09	No dectectable	Caracteristico	
	CHIQUINQUIRA	1,0297	4,03	-0,531	0,147	6,6	3,08	No dectectable	Caracteristico	
RECIBO VIERNES AM (27/10/2023)	PAICAUITA	1,0301	3,50	-0,536	0,150	6,6	3,01	No dectectable	Caracteristico	
	CAPELLANIA	1,0306	3,41	-0,537	0,145	6,6	3,03	No dectectable	Caracteristico	
	FICAL	1,0302	3,35	-0,542	0,145	6,6	2,97	No dectectable	Caracteristico	

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	2 DE 3

10. CONTROL FISICOQUIMICO DE AGUA POTABLE

Fecha	Punto de muestreo	Cloro residual ppm	pH	Dureza mg/L CaCO3	Sensorial	Concepto
27/10/2023	Subterráneo principal	0,3	7,28	30	Conforme	Cumple
27/10/2023	Acueducto	0,3	7,12	40	Conforme	

12. CONTROL MICROBIOLOGICO ENJUAGUES

Fecha	Punto de muestreo	Hora	Rto Coliformes totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Rto. Mesófilos Aerobios	Concepto
27/10/2023	ENJUAGUE 273001 MP 3:18	3:18	<1	<1	<1	Cumple
27/10/2023	ENJUAGUE 283001 MP 3:22	3:22	<1	<1	<1	

13. CONTROL MICROBIOLOGICO MANIPULADORES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/ml	Rto. Coliformes Totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Concepto
29/09/2023	Operador Envasadora	4	<1	<1	Cumple
29/09/2023	Operador Esterilizador	25	<1	<1	

14. CONTROL MICROBIOLOGICO AMBIENTES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/cm2	Rto. Mohos y Levaduras UFC/cm2	Concepto
21/10/2023	Ambiente esterilizadores	2	1	Cumple
21/10/2023	Ambiente Cabina UHT	<1	<1	

15. OBSERVACIONES

17. CONCLUSIONES

No se han presentado novedades de este lote

Elaboró	Aura Peñaranda	Revisó	Hector Sanchez

Anexo B. *Trazabilidad matriz de leche saborizada con sabor a chocolate "Dominguita".*

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	1 DE 3

1. MOTIVO DE LA TRAZABILIDAD

Queja o reclamo		Fecha	28/12/2023	Cliente		Consecutivo	103-23
Programado	X	Externo		Motivo	VALIDACIÓN NORMA DE ESTERILIDAD COMERCIAL		

2. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO

REFERENCIA	LOTE/ BOQUILLA	FECHA FABRICACION	FECHA VENCIMIENTO
LECHE SABORIZADA UHT ENTERA CHOCOLATE DOMINGUITA 200 ml	253004 263004	27/10/2023	25/01/2024

3. ANALISIS FISICOQUIMICO Y MICROBIOLOGICO PRODUCTO TERMINADO

							Concepto
Densidad 15/15ºC g/mL	1,045	Estabilidad Proteica	Negativo	Análisis Microbiologico			Cumple
Grasa %m/v	3,1	Ebullición	Cumple	Recuento Mesofilos 48 Horas 35ºC		≤ 1 UFC/ml	
pH	6,6	Acidez %m/v	0,12				
		Sensorial	Cumple	Esterilidad Comercial	Aerobia 35ºC	Ausente	
Proteina %m/m	N/A	Temperatura ºC	20		Anaerobia 35ºC	Ausente	
Extracto seco desengrasado % m/m	12,01	Peroxidasa	Negativo		Aerobia 55ºC	Ausente	
Extracto seco total % m/m	15,11	Fosfatasa	Negativo		Anaerobia 55ºC	Ausente	

4. MATERIAL DE EMPAQUE E INSUMOS

Insumo/ Material de empaque	Lote	Proveedor	Código de Analisis	Codigo de liberación	Fecha de Recepción	Fecha de liberación
Base Chocolate	210868	Tecnas	469 FMPU 139 MMPU	482U	06/09/2023	11/09/2023
Mix Leche Saborizada	210151	Tecnas	551 FMPU 163 MMPU	566U	12/10/2023	18/10/2023
Polietileno Leche Saborizada Chocolate 200 ml	2308-25866	Flexo Spring	130 FMPU 103 MMPU	435U	18/08/2023	23/08/2023
Azúcar Refinada	105291103000	Riopaila Castilla	59 FMPU 49 MMPU	62L	08/05/2023	16/05/2023

4. MATERIAL DE EMPAQUE E INSUMOS

Insumo/ Material de empaque	Lote	Proveedor	Código de Analisis	Codigo de liberación	Fecha de Recepción	Fecha de liberación
Base Chocolate	210868	Tecnas	469 FMPU 139 MMPU	482U	06/09/2023	11/09/2023
Mix Leche Saborizada	210151	Tecnas	551 FMPU 163 MMPU	566U	12/10/2023	18/10/2023
Polietileno Leche Saborizada Chocolate 200 ml	2308-25866	Flexo Spring	130 FMPU 103 MMPU	435U	18/08/2023	23/08/2023
Azúcar Refinada	105291103000	Riopaila Castilla	59 FMPU 49 MMPU	62L	08/05/2023	16/05/2023

5. CONTROL DE PESO, SELLADOS Y TRAZABILIDAD

Control de peso	Cumple	Control de sellados	Cumple	Control Trazabilidad-Rotulado	Cumple

6. ENVASADORA ASEPTICA

Codigo / Causa	Hora Inicio	Hora Final	Boquilla	Motivo
Durante el proceso de envasado se presentaron paradas normales propias del proceso por lavado intermedio, lo cual no afectan la inocuidad del producto.				
Temp. de peroxido ºC	35°C	Concentración de peroxido %	35%	

7. ANALISIS FISICOQUIMICO PRODUCTO EN PROCESO

Silo	Temp ºC	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Estabilidad Rasmdell	Sensorial	Concepto
Tina	6ºC	1,05	3,1	N/A	0,12	6,78	N/A	Negativo	Caracteristico	**Cumple**

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	2 DE 3

8. CONTROL DE PRODUCCIÓN

Equipo	Fecha	Hora	Actividad	% Soda	% Acido	Concepto
Esterilizador 2 y Envasadora 2	27/10/2023	0:10	Lavado general Inicial	2,42	1,37	Cumple
Esterilizador 2 y Envasadora 2	28/10/2023	0:40	Lavado general Final	2,59	1,41	
Área	**Fecha**	**Hora**	**Actividad**	**Desinfectante**	**Concentración**	
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	3:00	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	
AMBIENTE ESTERILIZADOR	27/10/2023	3:00	Nebulización del área	BIGUDEX	200	
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	8.15	Nebulización del área	BIGUDEX	200	
AMBIENTE ESTERILIZADOR	27/10/2023	11.30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	13:30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	

Fecha	Hora inicio	Hora Final	Envasadora	Esterilizador	Cantidad entregada a Logistica
27/10/2023	18:35	19:14	2	2	4.692

9. ANALISIS FISICOQUIMICO MATERIA PRIMA

Fecha del recibo	Ruta	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Antibiotico	Sensorial	Concepto
RECIBO JUEVES PM (26/10/2023)	FICAL	1,0309	3,49	-0,551	0,142	6,6	2,98	No dectectable	Caracteristico	Cumple
	PAICAUITA	1,0300	3,84	-0,533	0,150	6,6	3,06	No dectectable	Caracteristico	

10. CONTROL FISICOQUIMICO DE AGUA POTABLE

Fecha	Punto de muestreo	Cloro residual ppm	pH	Dureza mg/L CaCO3	Sensorial	Concepto
27/10/2023	Subterráneo principal	0,3	7,28	30	Conforme	Cumple
27/10/2023	Acueducto	0,3	7,12	40	Conforme	

12. CONTROL MICROBIOLOGICO ENJUAGUES

Fecha	Punto de muestreo	Hora	Rto Coliformes totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Rto. Mesófilos Aerobios	Concepto
27/10/2023	ENJUAGUE 253001 RP 3:38	3:38	<1	<1	<1	Cumple
27/10/2023	ENJUAGUE 263001 RP 3:41	3:41	<1	<1	<1	

13. CONTROL MICROBIOLOGICO MANIPULADORES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/ml	Rto. Coliformes Totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Concepto
27/10/2023	Operador Envasadora	18	<1	<1	Cumple
27/10/2023	Operador Esterilizador	15	<1	<1	

14. CONTROL MICROBIOLOGICO AMBIENTES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/cm2	Rto. Mohos y Levaduras UFC/cm2	Concepto
21/10/2023	Ambiente esterilizadores	2	<1	Cumple
21/10/2023	Ambiente Cabina UHT	<1	<1	

15. OBSERVACIONES

17. CONCLUSIONES

No se han presentado novedades de este lote

Elaboró	Aura Peñaranda	Revisó	Hector Sanchez

Anexo C. *Trazabilidad matriz de Avena con sabor artificial a canela.*

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	1 DE 3

1. MOTIVO DE LA TRAZABILIDAD

Queja o reclamo		Fecha	28/12/2023	Cliente		Consecutivo	101-23
Programado	X	Externo		Motivo	VALIDACIÓN NORMA DE ESTERILIDAD COMERCIAL		

2. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO

REFERENCIA	LOTE/ BOQUILLA	FECHA FABRICACION	FECHA VENCIMIENTO
Bebida con leche y avena con sabor artificial canela UAT-UHT Santodomingo x 200 ml	253005 263005	27/10/2023	14/02/2024

3. ANALISIS FISICOQUIMICO Y MICROBIOLOGICO PRODUCTO TERMINADO

							Concepto
Densidad 15/15ºC g/mL	1,05	Estabilidad Proteica	Negativo	Análisis Microbiologico			Cumple
Grasa %m/v	2,1	Ebullición	Cumple	Recuento Mesofilos 48 Horas 35ºC		≤ 1 UFC/ml	
pH	6,6	Acidez %m/v	0,085				
		Sensorial	Cumple	Esterilidad Comercial	Aerobia 35ºC	Ausente	
Proteina %m/m	N/A	Temperatura ºC	20		Anaerobia 35ºC	Ausente	
Extracto seco desengrasado % m/m	13,06	Peroxidasa	Negativo		Aerobia 55ºC	Ausente	
Extracto seco total % m/m	15,16	Fosfatasa	Negativo		Anaerobia 55ºC	Ausente	

4. MATERIAL DE EMPAQUE E INSUMOS

Insumo/ Material de empaque	Lote	Proveedor	Código de Analisis	Codigo de liberación	Fecha de Recepción	Fecha de liberación
Sabor avena Canela	211488	Tecnas	515 FMPU 153 MMPU	528U	28/09/2023	02/10/2023
Fecula agro	22454080	Enzicol	431 FMPU 126 MMPU	443U	18/08/2023	25/08/2023
Azúcar Refinada	105291	Riopaila Castilla	18 FMPU 15MMPU	15L	13/02/2023	17/02/2023
Polietileno Bebida con Leche y Avena 200 ml	2334	Lactopack	503 FMPU 166 MMPU	503U	26/09/2022	30/09/2022

5. CONTROL DE PESO, SELLADOS Y TRAZABILIDAD

Control de peso	Cumple	Control de sellados	Cumple	Control Trazabilidad-Rotulado	Cumple

6. ENVASADORA ASEPTICA

Codigo / Causa	Hora Inicio	Hora Final	Boquilla	Motivo
Durante el proceso de envasado no hubo ninguna novedad que pueda afectar la inocuidad del producto terminado				
Temp. de peroxido ºC	35°C	Concentración de peroxido %	35%	

7. ANALISIS FISICOQUIMICO PRODUCTO EN PROCESO

Silo	Temp ºC	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Estabilidad Rasmdell	Sensorial	Concepto
7	6ºC	1,05	2,16	N/A	0,085	6,78	N/A	Negativo	Caracteristico	Cumple

8. CONTROL DE PRODUCCIÓN

Equipo	Fecha	Hora	Actividad	% Soda	% Acido	Concepto
Esterilizador 2 y Envasadora 2	27/10/2023	0:10	Lavado general Inicial	2,42	1,37	Cumple
Esterilizador 2 y Envasadora 2	28/10/2023	0:40	Lavado general Final	2,59	1,41	

Área	Fecha	Hora	Actividad	Desinfectante	Concentración
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	3:00	Nebulización del área	ANFOCUAT	400
AMBIENTE ESTERILIZADOR	27/10/2023	3:00	Nebulización del área	BIGUDEX	200
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	8.15	Nebulización del área	BIGUDEX	200
AMBIENTE ESTERILIZADOR	27/10/2023	11.30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400
AMBIENTE CABINA UHT	27/10/2023	13:30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400

Fecha	Hora inicio	Hora Final	Envasadora	Esterilizador	Cantidad entregada a Logistica
27/10/2023	20:20	21:22	2	2	6.988

9. ANALISIS FISICOQUIMICO MATERIA PRIMA

Fecha del recibo	Ruta	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Antibiotico	Sensorial	Concepto
RECIBO JUEVES PM (26/10/2023)	FICAL	1,0309	3,49	-0,551	0,142	6,6	2,98	No dectectable	Caracteristico	Cumple
	PAICAUITA	1,0300	3,84	-0,533	0,150	6,6	3,06	No dectectable	Caracteristico	

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	2 DE 3

10. CONTROL FISICOQUIMICO DE AGUA POTABLE

Fecha	Punto de muestreo	Cloro residual ppm	pH	Dureza mg/L CaCO3	Sensorial	Concepto
27/10/2023	Subterráneo principal	0,3	7,28	30	Conforme	Cumple
27/10/2023	Acueducto	0,3	7,12	40	Conforme	

12. CONTROL MICROBIOLOGICO ENJUAGUES

Fecha	Punto de muestreo	Hora	Rto Coliformes totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Rto. Mesófilos Aerobios	Concepto
27/10/2023	ENJUAGUE 253001 RP 3:38	3:58	<1	<1	<1	Cumple
27/10/2023	ENJUAGUE 263001 RP 3:41	3:41	<1	<1	<1	Cumple

13. CONTROL MICROBIOLOGICO MANIPULADORES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/ml	Rto. Coliformes Totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Concepto
27/10/2023	Operador Envasadora	18	<1	<1	Cumple
27/10/2023	Operador Esterilizador	15	<1	<1	

14. CONTROL MICROBIOLOGICO AMBIENTES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/cm2	Rto. Mohos y Levaduras UFC/cm2	Concepto
21/10/2023	Ambiente esterilizadores	2	<1	Cumple
21/10/2023	Ambiente Cabina UHT	<1	<1	

15. OBSERVACIONES

17. CONCLUSIONES

No se han presentado novedades de este lote

Elaboró	Aura Peñaranda	Revisó	Hector Sanchez

Anexo D. *Trazabilidad matriz UHT, crema de leche de 200g.*

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	1 DE 3

1. MOTIVO DE LA TRAZABILIDAD

Queja o reclamo		Fecha	28/12/2023	Cliente		Consecutivo	104-23
Programado	X	Externo		Motivo	VALIDACIÓN NORMA DE ESTERILIDAD COMERCIAL		

2. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO

REFERENCIA	LOTE/ BOQUILLA	FECHA FABRICACION	FECHA VENCIMIENTO
Crema de Leche Entera UHT x 200 gramos	283041	31/10/2023	18/02/2024

3. ANALISIS FISICOQUIMICO Y MICROBIOLOGICO PRODUCTO TERMINADO

							Concepto
Densidad 15/15ºC g/mL	0,97	Estabilidad Proteica	Negativo	Análisis Microbiologico			Cumple
Grasa %m/v	36	Ebullición	Cumple	Recuento Mesofilos 48 Horas 35ºC		≤ 1 UFC/ml	
pH	6,6	Acidez %m/v	0,10				
		Sensorial	Cumple	Esterilidad Comercial	Aerobia 35ºC	Ausente	
Proteína %m/m	N/A	Temperatura ºC	20		Anaerobia 35ºC	Ausente	
Extracto seco desengrasado % m/m	N/A	Peroxidasa	Negativo		Aerobia 55ºC	Ausente	
Extracto seco total % m/m	N/A	Fosfatasa	Negativo		Anaerobia 55ºC	Ausente	

4. MATERIAL DE EMPAQUE E INSUMOS

Insumo/ Material de empaque	Lote	Proveedor	Código de Analisis	Codigo de liberación	Fecha de Recepción	Fecha de liberación
Mix Crema de Leche	211355	Tecnas	145 FMPL 113 MMPL	143L	14/09/2023	22/09/2023
Tripolifosfato de sodio	22308161	Grupo Alternativas	455 FMPU 134 MMPU	469U	31/08/2023	04/09/2023
Polietileno Crema de Leche UHT 200 ml	2870	Lactopack	609 FMPU 200 MMPU	609U	05/12/2022	07/12/2022

5. CONTROL DE PESO, SELLADOS Y TRAZABILIDAD

Control de peso	Cumple	Control de sellados	Cumple	Control Trazabilidad-Rotulado	Cumple

6. ENVASADORA ASEPTICA

Codigo / Causa	Hora Inicio	Hora Final	Boquilla	Motivo
Durante el proceso de envasado se presentaron paradas normales propias del proceso por cambio de rollo, lo cual no afecta la inocuidad del producto terminado.				
Temp. de peroxido ºC	35°C	Concentración de peroxido %	35%	

7. ANALISIS FISICOQUIMICO PRODUCTO EN PROCESO

Silo	Temp ºC	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Estabilidad Rasmdell	Sensorial	Concepto
7	6ºC	0,98	36	N/A	0,10	6,78	N/A	Negativo	Caracteristico	**Cumple**

	GESTION DE CONTROL CALIDAD	CC-FR-009		
		VERSIÓN	FECHA	PÁGINA
CICLO PHVA: VERIFICAR	REPORTE TRAZABILIDAD	1	27/10/2021	2 DE 3

8. CONTROL DE PRODUCCIÓN

Equipo	Fecha	Hora	Actividad	% Soda	% Acido	Concepto
Esterilizador 2 y Envasadora 2	31/10/2023	2:30	Lavado general Inicial	2,39	1,43	
Esterilizador 2 y Envasadora 2	01/11/2023	4:10	Lavado general Final	2,9	2,63	
Área	**Fecha**	**Hora**	**Actividad**	**Desinfectante**	**Concentración**	
AMBIENTE ESTERILIZADOR	31/10/2023	2:30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	
AMBIENTE CABINA UHT	31/10/2023	2:30	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	**Cumple**
AMBIENTE ESTERILIZADOR	31/10/2023	5:30	Nebulización del área	BIGUDEX	200	
AMBIENTE CABINA UHT	31/10/2023	5:40	Nebulización del área	BIGUDEX	200	
AMBIENTE ESTERILIZADOR	31/10/2023	9:00	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	
AMBIENTE ESTERILIZADOR	31/10/2023	16:15	Nebulización del área	BIGUDEX	200	
AMBIENTE CABINA UHT	31/10/2023	20:00	Nebulización del área	ANFOCUAT	400	

Fecha	Hora inicio	Hora Final	Envasadora	Esterilizador	N/A
31/10/2023	6:12	7:06	2	2	2.192

9. ANALISIS FISICOQUIMICO MATERIA PRIMA

Fecha del recibo	Ruta	Densidad	Grasa	Crioscopia	Acidez	pH	Proteina	Antibiotico	Sensorial	Concepto
RECIBO LUNES AM (30/10/2023)	ASPAS	1,0303	3,47	-0,530	0,140	6,6	3,02	No dectectable	Caracteristico	**Cumple**
	FICAL	1,0302	3,36	-0,547	0,142	6,6	3,04	No dectectable	Caracteristico	
	PAICAUITA	1,0303	3,50	-0,531	0,145	6,6	3,04	No dectectable	Caracteristico	
	ESMERALDA	1,0302	3,48	-0,541	0,145	6,6	3,07	No dectectable	Caracteristico	
	CAPELLANIA	1,0306	3,34	-0,541	0,140	6,6	3,02	No dectectable	Caracteristico	
	CHIQUINQUIRA	1,0303	3,39	-0,537	0,145	6,6	3,07	No dectectable	Caracteristico	
	GUACHETA	1,0301	3,38	-0,542	0,140	6,6	3,01	No dectectable	Caracteristico	
	GREGORIO	1,3030	3,67	-0,535	0,145	6,6	3,07	No dectectable	Caracteristico	
	BALSA	1,0301	3,40	-0,537	0,147	6,6	3,04	No dectectable	Caracteristico	
	FRIAS	1,0307	3,45	-0,534	0,140	6,6	3,03	No dectectable	Caracteristico	
	TRIANA	1,0308	3,25	-0,540	0,145	6,6	3,12	No dectectable	Caracteristico	
RECIBO LUNES PM (30/10/2023)	FRIAS	1,0302	3,73	-0,534	0,143	6,6	2,99	No dectectable	Caracteristico	**Cumple**
	FICAL	1,0300	3,67	-0,545	1,000	6,6	3,05	No dectectable	Caracteristico	
	PAICAUITA	1,0303	4,04	-0,539	0,145	6,6	3,04	No dectectable	Caracteristico	
	BELLEZA	1,0315	3,54	-0,530	0,150	6,6	3,02	No dectectable	Caracteristico	
	GUACHETA	1,0300	3,42	-0,535	0,137	6,6	2,96	No dectectable	Caracteristico	
	ESMERALDA	1,0306	3,68	-0,540	0,155	6,6	3,12	No dectectable	Caracteristico	
	ASIMILK	1,0302	3,65	-0,536	0,150	6,6	3,02	No dectectable	Caracteristico	
	ARCABUCO	1,0310	3,48	-0,538	0,145	6,6	3,13	No dectectable	Caracteristico	
	CHIQUINQUIRA	1,0301	3,97	-0,535	0,147	6,6	3,02	No dectectable	Caracteristico	
	BALSA	1,0300	3,56	-0,531	0,140	6,6	3,01	No dectectable	Caracteristico	

10. CONTROL FISICOQUIMICO DE AGUA POTABLE

Fecha	Punto de muestreo	Cloro residual ppm	pH	Dureza mg/L CaCO3	Sensorial	Concepto
31/10/2023	Subterráneo principal	0,3	7,55	40	Conforme	Cumple
31/10/2023	Acueducto	0,4	7,18	55	Conforme	

12. CONTROL MICROBIOLOGICO ENJUAGUES

Fecha	Punto de muestreo	Hora	Rto Coliformes totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Rto. Mesófilos Aerobios	Concepto
31/10/2023	ENJUAGUE 283041 JS 5:28	5:28	<1	<1	<1	Cumple

13. CONTROL MICROBIOLOGICO MANIPULADORES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/ml	Rto. Coliformes Totales UFC/ml	Rto. Coliformes fecales UFC/ml	Concepto
27/10/2023	Operador Envasadora	18	<1	<1	Cumple
27/10/2023	Operador Esterilizador	15	<1	<1	

14. CONTROL MICROBIOLOGICO AMBIENTES

Fecha	Punto de muestreo	Rto. Mesófilos Aerobios UFC/cm2	Rto. Mohos y Levaduras UFC/cm2	Concepto
21/10/2023	Ambiente esterilizadores	2	<1	Cumple
21/10/2023	Ambiente Cabina UHT	<1	<1	

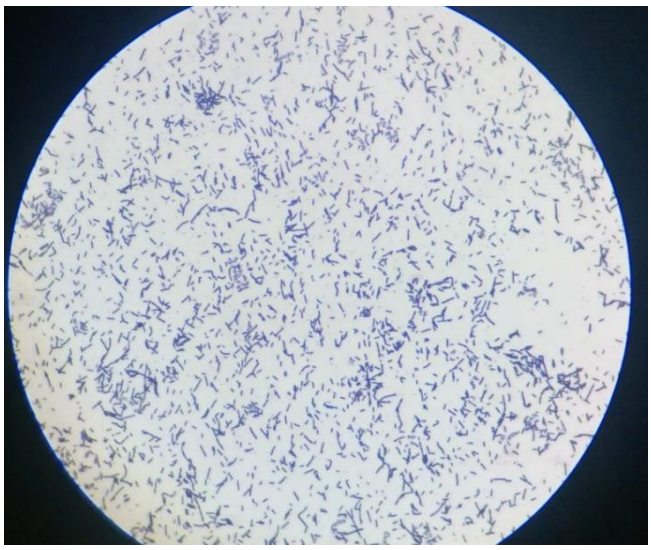
15. OBSERVACIONES

17. CONCLUSIONES

No se han presentado novedades de este lote

Elaboró	Aura Peñaranda	Revisó	Hector Sanchez

Anexo E. *Registro fotográfico morfología microscópica de la cepa G.stearothermophilus ATCC 7953 a partir de los medios utilizados en el test ecométrico.*



Fuente. (Garzón, 2023)

Anexo F. *Tabla del registro de la morfología macroscópica de la cepa G. stearothermophilus ATCC 7953.*

Tamaño	mediana
Forma	circular
Elevación	plana
Borde	liso
Color	Crema
Apariencia	Suave
densidad	Opaca
Consistencia	Cremosa

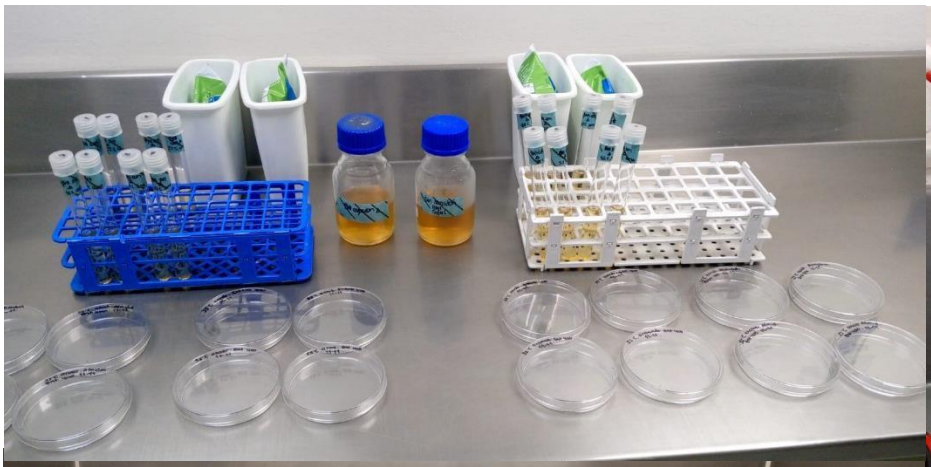
Fuente. (Garzón, 2023)

Anexo G. *Registro fotográfico procesamiento de muestras - 10 días de incubación en cámara de 35ºC y 55ºC.*



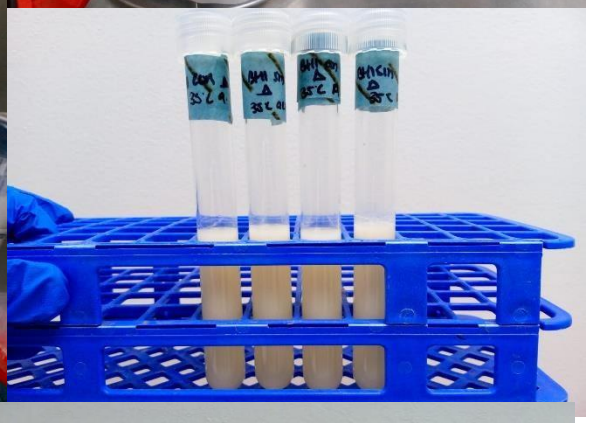
Fuente. (Garzon,2023)

Anexo H. *Registro fotográfico del protocolo de la NTC 4433 de 2015 y la técnica modificada.*









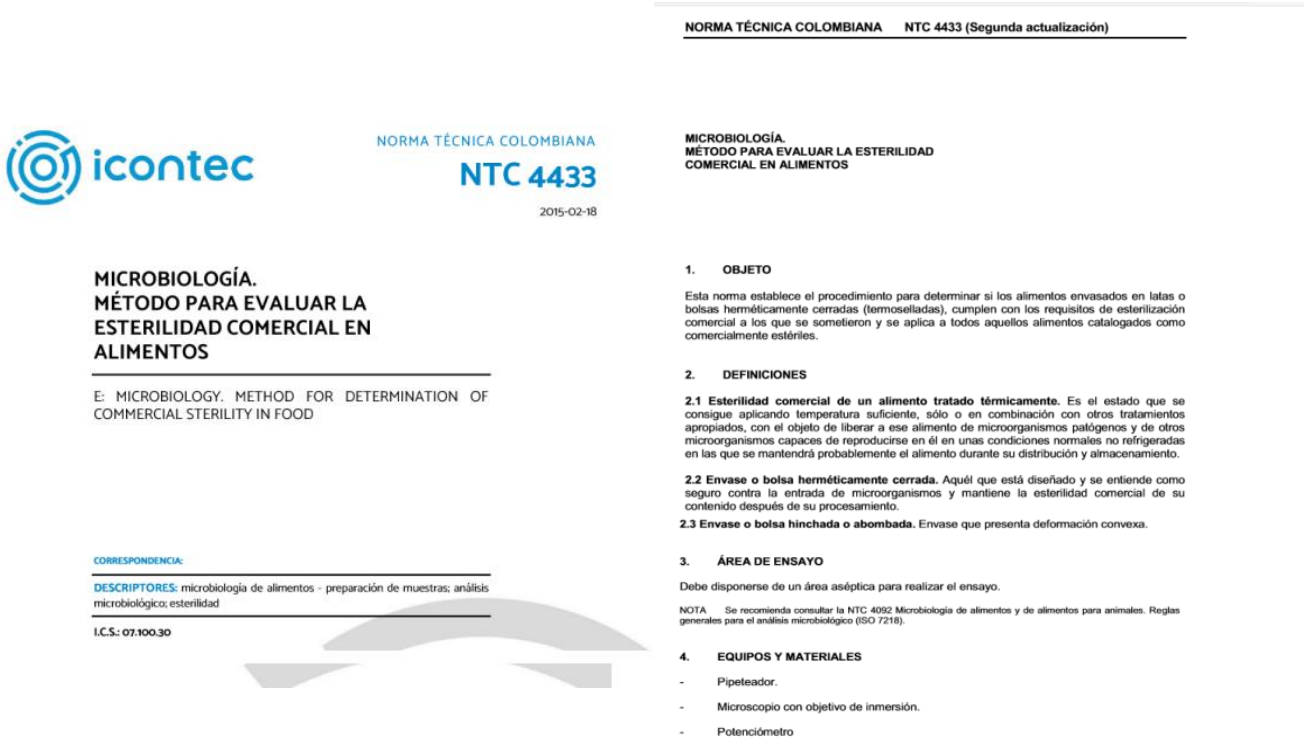




Anexo I. *Registro fotográfico de reactivación de G. stearothermophilus ATCC 7953DUO KWIK STIK MICROBIOLOGICS.*



Anexo J. *NTC 4433:2015*



icontec

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA

NTC 4433

2015-02-18

MICROBIOLOGÍA.
MÉTODO PARA EVALUAR LA ESTERILIDAD COMERCIAL EN ALIMENTOS

E: MICROBIOLOGY. METHOD FOR DETERMINATION OF COMMERCIAL STERILITY IN FOOD

CORRESPONDENCIA:

DESCRIPTORES: microbiología de alimentos - preparación de muestras; análisis microbiológico; esterilidad

I.C.S.: 07.100.30

MICROBIOLOGÍA.
MÉTODO PARA EVALUAR LA ESTERILIDAD COMERCIAL EN ALIMENTOS

1. OBJETO

Esta norma establece el procedimiento para determinar si los alimentos envasados en latas o bolsas herméticamente cerradas (termoselladas), cumplen con los requisitos de esterilización comercial a los que se sometieron y se aplica a todos aquellos alimentos catalogados como comercialmente estériles.

2. DEFINICIONES

2.1 Esterilidad comercial de un alimento tratado térmicamente. Es el estado que se consigue aplicando temperatura suficiente, sólo o en combinación con otros tratamientos apropiados, con el objeto de liberar a ese alimento de microorganismos patógenos y de otros microorganismos capaces de reproducirse en él en unas condiciones normales no refrigeradas en las que se mantendrá probablemente el alimento durante su distribución y almacenamiento.

2.2 Envase o bolsa herméticamente cerrada. Aquél que está diseñado y se entiende como seguro contra la entrada de microorganismos y mantiene la esterilidad comercial de su contenido después de su procesamiento.

2.3 Envase o bolsa hinchada o abombada. Envase que presenta deformación convexa.

3. ÁREA DE ENSAYO

Debe disponerse de un área aséptica para realizar el ensayo.

NOTA Se recomienda consultar la NTC 4092 Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Reglas generales para el análisis microbiológico (ISO 7218).

4. EQUIPOS Y MATERIALES

- Pipeteador.
- Microscopio con objetivo de inmersión.
- Potenciómetro

9.2.4 Prueba control ambiental

Se realizará bajo técnica validada, adoptada por el laboratorio, dentro de la cual se asegure que existe un control microbiológico ambiental en el área de procesamiento de las muestras.

9.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Si ninguno de los 8 tubos aerobios da positivo y ninguno de los 8 tubos anaerobios muestra crecimiento, se reportará en el informe: "Prueba de esterilidad comercial satisfactoria".

Si no se cumple la condición anterior se reportará: "Prueba de esterilidad comercial no satisfactoria"

- Si hay producción de gas en cualquiera de los tubos a 35 °C, se debe sospechar que la contaminación es ambiental, por lo cual el microorganismo que ha crecido debe ser inoculado en otra lata e incubada 14 d a 35 °C. La ausencia de abombamiento en la lata indica que el microorganismo no se encontraba en la muestra original y que la contaminación corresponde al laboratorio y se reportará "Prueba de esterilidad comercial satisfactoria".
- Si hay crecimiento aeróbico en el medio incubado a 35 °C para latas normales, indica esterilidad no satisfactoria o contaminación en el laboratorio.
- Para descartar problemas de contaminación ambiental, debe verificar los resultados obtenidos de los controles ambientales y observar los tubos incubados a 55 °C, si no hay crecimiento el problema es de esterilidad, se debe verificar las características de la muestra en cuanto a olor y apariencia anormal, pH o presencia de bacterias en el examen microscópico de la lata original lo cual corrobora el concepto de "Prueba de esterilidad no satisfactoria".
- Si hay crecimiento a 35 °C y ausencia de crecimiento a 55 °C confirman el concepto de esterilidad no satisfactoria. Para estos casos se debe sembrar en condiciones aeróbicas en agar nutritivo a 55 °C y confirmar la presencia de esporas después de 72 h causantes de una descomposición agria.

Un histórico de resultados de crecimiento anaeróbico a 55 °C con producción de gas pone en evidencia presencia de esporas incapaces de crecer en temperaturas normales de almacenamiento y distribución.

9.4 REPORTE DE RESULTADOS

Para el reporte de resultados, véase el Anexo C (Informativo).

- Envases para muestras
- Abrelatas o punzón de acero inoxidable estériles
- Pipetas
- Incubadora
- Tubos de cultivo
- Láminas portaobjetos

5. DESINFECTANTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 DESINFECTANTES

5.1.1 Agua clorada con 100 mg/kg - 300 g/kg de cloro libre, recientemente preparada, tamponada a un pH de 6,8.

5.1.2 Solución de yodo y alcohol (por ejemplo, 2,5 % m/v de yodo en etanol).

5.1.3 Solución de ácido peracético al 2 % en un humectante apropiado (por ejemplo, 0,1 % de polisorbato 80).

5.1.4 Cualquier otra solución recomendada para este uso.

5.2 MEDIOS DE CULTIVO

5.2.1 Caldo BHI con almidón 0,1 % u otro de composición similar, de acuerdo con las instrucciones dadas por el fabricante.

5.2.2 Cualquier otro medio recomendado para este uso.

5.3 REACTIVOS

5.3.1 Coloración Gram.

5.3.2 Azul de metileno (azul de metileno policromo al 0,05 % m/m).

5.3.3 Almidón al 0,1 % m/m.

6. MUESTREO

Los planes de muestreo se deben diseñar y ejecutar teniendo en cuenta lo establecido en el Codex Stan CAC/GL50 ó GTC 99-1 ó las normas de la serie NTC ISO 2859.

7. INSPECCIÓN, EVALUACIÓN DE LOS ENVASES E INCUBACIÓN

Inicialmente se debe realizar una inspección previa de los envases correspondientes de la muestra que se desea evaluar antes de proceder con la prueba de esterilidad comercial. En el

ANEXO C
(Informativo)

REPORTE DE RESULTADOS
MÉTODO PARA EVALUAR ESTERILIDAD COMERCIAL EN ALIMENTOS

El siguiente cuadro ilustra los límites permitidos para el reporte de los resultados:

Requisitos	Límite permitido
Crecimiento en anaerobiosis a 35±2 °C	negativo
Crecimiento en anaerobiosis a 55 ±2 °C	negativo
Control en anaerobiosis a 35 ±2 °C	negativo
Control en anaerobiosis a 55 ±2 °C	negativo
Crecimiento en aerobiosis a 35 ±2 °C	negativo
Crecimiento en aerobiosis a 55 ±2 °C	negativo
Control en aerobiosis a 35 ±2 °C	negativo
Control en aerobiosis a 55 ±2 °C	negativo
Olor	normal
Aspecto	Característico
pH	Característico
Control ambiental	negativo

Anexo A (Normativo) se indica el diagrama de flujo para el procedimiento general de las etapas para evaluar la esterilidad comercial.

7.1 INSPECCIÓN EXTERNA Y EVALUACIÓN DE LOS ENVASES

7.1.1 Se debe examinar visualmente cada envase de la muestra; si posee rótulos removibles, estos deben retirarse. Se anotan cuidadosa y exactamente todas las marcas de identificación y manchas o señales de corrosión que se observen en los envases. En el caso de rótulos removibles, después de despegarlo e inspeccionarlo, debe identificarse con la misma referencia del envase y conservarse.

7.1.2 El examen visual debe realizarse con buena iluminación, de ser posible con lentes de aumento. En el caso de los envases de metal se deben revisar las costuras para detectar defectos como aristas, abolladuras (en el cierre o cerca de éste), depresiones del borde, picos, pliegues, pestañas salientes y defectos de solapado.

7.1.3 Llenado excesivo. Se sospecha de un llenado excesivo de un envase, cuando el peso neto excede del nivel de tolerancia razonable del peso neto declarado o previsto, o del peso neto medio determinado mediante el examen de un número considerable de envases de aspecto normal.

7.1.4 Llenado insuficiente. Latas abolladas o envases con manchas o residuos de producto en la superficie o en el rótulo del envase, pueden indicar fugas de líquido o descalibración del equipo de llenado.

7.1.5 Medición de pH. Medición de pH inicial. Realizarlo de acuerdo a la NTC 440.

7.2 INCUBACIÓN

Los envases hinchados o perforados no deben someterse a incubación.

Se toman dos envases, se envuelven en papel absorbente y uno de ellos se incuba a una temperatura de 35 °C ± 2 °C y el otro se incuba a una temperatura de 55 °C ± 2 °C durante 10 d.

Se examinan los envases diariamente para observar si el papel absorbente está manchado de producto, lo cual indicaría fugas y para observar si se forma gas antes de terminar el periodo de incubación, lo cual se detecta por abombamiento del envase o de la tapa.

En cualquiera de los dos casos anteriores, se procede inmediatamente a abrir y a examinar el contenido de los envases.

8. LIMPIEZA, DESINFECCIÓN Y APERTURA DEL ENVASE

8.1 ENVASES

Cuando se trata de envases (latas, laminados, envases flexibles, planos, etc.) que contienen componentes líquidos o semilíquidos, se puede utilizar un punzón de acero inoxidable estéril para perforar el envase y se toman muestras del contenido utilizando una pipeta estéril o un aparato equivalente. Para abrir latas que contengan productos sólidos se debe utilizar un abrelatas estéril, cortando asépticamente en torno al cuerpo de la lata. Para materiales laminados, después de desinfectarlos y secarlos, se cortan asépticamente.

Se debe describir y registrar cualquier olor extraño proveniente del contenido, que se pueda percibir inmediatamente después de abrir el envase. Debe evitarse olfatear directamente el contenido.

Se descontamina el envase. Para asegurar un mezclado de los posibles organismos contaminantes se aconseja agitar el envase inmediatamente antes de abrirlo.

Se debe inspeccionar el envase después de la incubación, de acuerdo con lo indicado en el literal A.11 del Anexo A (Normativo).

Se debe trabajar en una cámara de siembras para trabajar las muestras a analizar.

9. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se efectuará de acuerdo con lo indicado en el Anexo B (Normativo).

Para realizar el análisis microbiológico, se debe realizar un control ambiental de la calidad del área de siembra, utilizando placas de agar glucosa almidón. Estas cajas deben dejarse expuestas durante un periodo de 30 min.

El contenido restante del envase que no se analiza microbiológicamente se debe esterilizar y vaciar en un envase de desechos apropiado.

9.1 CONTRAMUESTRA DE ANALISIS

Se debe tomar como contramuestra, mínimo dos envases del mismo lote, de las muestras que llegan para ser analizadas en el laboratorio

9.2 MUESTRA ANALÍTICA E INOCULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

9.2.1 Productos líquidos

Se toman muestras utilizando pipetas apropiadas, taponadas, estériles con extremos de diámetro ancho, o micropipetas con puntas estériles.

NOTA Siempre debe tomarse la muestra con el pipeteador o pipetas de precisión.

Se recomienda inocular cada tubo de medio líquido con al menos 1 ml ó 2 ml de la muestra tomada del contenido del envase.

9.2.2 Productos sólidos y semisólidos

Deben tomarse muestras de 1 g a 2 g tanto del núcleo como de la superficie.

Para una muestra del núcleo se debe utilizar un dispositivo estéril apropiado que tenga un diámetro y longitud suficientes.

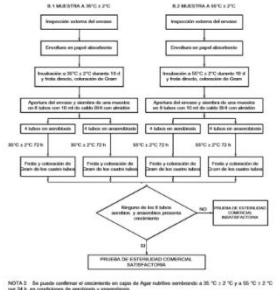
Para una muestra de la superficie se raspa con un aplicador estéril o pinzas estériles y se toman porciones para inocular los tubos.

9.2.3 Análisis microscópico directo

Se puede realizar con coloración *Gram*, o teñido con azul de metileno.

ANEXO B
(Normativo)

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL RECUENTO MICROBIOLÓGICO



NOTA 3 Se puede confirmar el crecimiento en caja de Agar nutritivo sembrando a 35 °C ± 2 °C y a 55 °C ± 2 °C por 24 h, en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

Anexo K. *Tablas del sistema de medición Repetibilidad & Reproducibilidad*

Hoja de trabajo de estudio R&R del sistema de medición

Método

Partes:	5	Operadores:	2
Réplicas:	3	Total de corridas:	30

Hoja de trabajo 1 ***

	C1	C2-T	C3-T	C4	C5	C6	C7	C
	OrdenCorrida	Partes	Operadores	medicion				
1	1	Leche entera	Analista 1	0				
2	2	Crema de leche	Analista 1	0				
3	3	Leche saborizada	Analista 1	0				
4	4	Avena	Analista 1	0				
5	5	Control positivo	Analista 1	1				
6	6	Crema de leche	Analista 2	0				
7	7	Leche saborizada	Analista 2	0				
8	8	Avena	Analista 2	0				
9	9	Control positivo	Analista 2	1				

R&R del sistema de medición (anidado) para medicion

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Operadores	1	0,0	0,0	0,00000E+00	1,000
Partes (Operadores)	8	4,8	0,6	6,75540E+15	0,000
Repetibilidad	20	0,0	0,0		
Total	29	4,8			

Componentes de la varianza

Fuente	CompVar	%Contribución (de CompVar)
Gage R&R total	0,0	0,00
Repetibilidad	0,0	0,00
Reproducibilidad	0,0	0,00
Parte a parte	0,2	100,00
Variación total	0,2	100,00

Evaluación del sistema de medición

Fuente	Desv.Est. (DE)	Var. estudio (6 × DE)	%Var. estudio (%VE)
Gage R&R total	0,000000	0,00000	0,00
Repetibilidad	0,000000	0,00000	0,00
Reproducibilidad	0,000000	0,00000	0,00
Parte a parte	0,447214	2,68328	100,00
Variación total	0,447214	2,68328	100,00

Apéndice A. materiales, equipos y reactivos

Reactivos: Colorantes para Tinción de Gram (Cristal Violeta, Lugol, Alcohol cetona y Safranina); PatrónMcFarland 0,5 comercial; Aceite de Inmersión; Frascos de tiras Oxidasa.

Medios de Cultivo: Agar BHI marca BD; Caldo BHI marca Condalab; Agar Plate Count (PCA) marca BD.

Material**:** Tubos de ensayo 15*160; Caja de Petri desechable 90*15mm Paq X 10 Und; Laminas porta objetos; Puntas Tip Box- 50 a 1000ul; Jarras de Anaerobiosis de 3 o 3.5 litros; Indicador de Anaerobiosis Anaerogen OXOID; Vaso Precipitado de 250ml; Frascos Schott de 250ml; Asas Redondas metálicas calibradas 0,1; Churruscos para tubo de ensayos; Mechero de vidrio.

Equipos: Microscopio Óptico; Incubadora de 35 ± 2 °C modelo 1110 (Memmert); Autoclave para material estéril (All American 50X); Autoclave para material de desecho (All American 25X); Contador de colonias referencia 007 (Indulab); Nevera.

Apéndice B. Control de ambientes y superficies en el área de siembra.

En el laboratorio de control de calidad en microbiología se realizó diariamente control de ambiente y superficie de la cabina de flujo laminar, garantizando la efectividad en el control de limpieza y desinfección de acuerdo a los parámetros establecidos por la empresa; empleando desinfectantes de amplio espectro; Bigudex a 200 rpm y anfocuat a 400 rpm.

Apéndice C. Cepa Control

Cepa de referencia (*Geobacillus stearothermophilus*) ATCC 7953 Duo kwik stik Microbiologics PASE 3. Proviene de la Colección Americana de cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC).

Cada unidad de KWIK-STIK incluye un granulo liofilizado de microorganismo, una ampolla

de líquido hidratante y un hisopo de inoculación. Cada dispositivo este sellado dentro de una 97 bolsa laminada que contiene material desecante para evitar la humedad. Se almaceno en el laboratorio a una temperatura en nevera entre 2 y 8ºC en su frasco y la bolsa laminada (Anexo J).

Apéndice C1. Recuperación de la cepa ATCC *G. stearothermophilus,* Duo kwik-stik Microbiologics

- La bolsa de KWIK-STIK se adaptó a la temperatura ambiente. Se rasgo a la altura de la muesca y se retiró la unidad de KWIK-STIK.
- Seguidamente, se retiró la porción de la etiqueta colocándosela a la placa de cultivo. Teniendo precaución de no desarmar el dispositivo durante la hidratación.
- Manteniéndolo vertical y golpeando suavemente, facilitando el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- Se apretó la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- De inmediato, se pasó un hisopo por el material hidratado, transfiriéndolo al medio solido BHI.
- Finalmente, se inóculo el medio de cultivo principal girando con suavidad el hisoposobre la placa., y por medio de un asa esterilizada se realizó aislamiento de las colonias.
- Se descarto el KWIK-STIK en bolsas de desechos de riesgo biológico.
- Se incubó o los medios invertidos a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo a 55°C. (Microbiologics, 2021).

Apéndice C2. Resultados de la reactivación de *G. stearothermophilus*

De acuerdo a las características morfológicas y los requerimientos bioquímicos de *G. stearothermophilus,* el organismo recuperado presento las siguientes características en medio BHI (Anexo G): colonias de 1 a 1.3 mm de diámetro, colonias circulares de color crema, con bordes definidos y superficie lisa. La caracterización bioquímica presento crecimiento positivo en almidón, ya que utiliza el almidón como fuente de nutrientes para su desarrollo; Es catalasa y oxidasa positivo (Apéndice F); Presenta actividad catalasa lo que le permite descomponer el peróxido de hidrogeno, la actividad oxidasa indica que puede oxidar sustratos específicos, incluyendo compuestos orgánicos e inorgánicos en ambientes termofílicos.

Apéndice D. Estandarización del inoculo de *G. stearothermophilus* ATCC 7953, para control positivo

Se estandarizó el inóculo de la cepa de *G. stearothermophilus,* a partir de la escala de turbidez del patrón McFarland. Se tomo una asada de la cepa a partir de un cultivo joven, transfiriendo en 9 ml de agua destilada estéril, comparando la turbidez con el tubo del patrón 0.5 McFarland comercial que indica una concentración del microorganismo de $1,5*10^8$ UFC/ml (Bruckner, 2012).

A partir del tubo con la concentración de $1,5*10^8$ UFC/ml, a partir de una muestra de 400 ml de leche entera, se transfirió 200 ml de muestra de leche a un frasco schott y se adicionó el contenido del tubo con $1,5*10^8$ UFC/ml de *G. stearothermophilus,* con el fin de visualizar una gran cantidad de unidades formadoras de colonias de la cepa control en las dos técnicas; estándar y modificada. Debido a que la empresa no cuenta con un espectrofotómetro para medir la absorbancia de la suspensión bacteriana, por ello se utilizó un método visual comparando la

turbidez de la solución del tubo con la cepa igualando la turbidez al tubo de referencia de 0.5
McFarland. Para determinar la concentración de células viables que había realmente a partir del tubo con 0.5 McFarland se hizo diluciones seriadas, 1 ml de la suspensión en 9ml de agua destilada estéril, hasta una dilución de 10^3, sembrando 1 ml de cada dilución por profundidad en cajas con medio plate Count. (Gilligan & Shapiro, 2014).

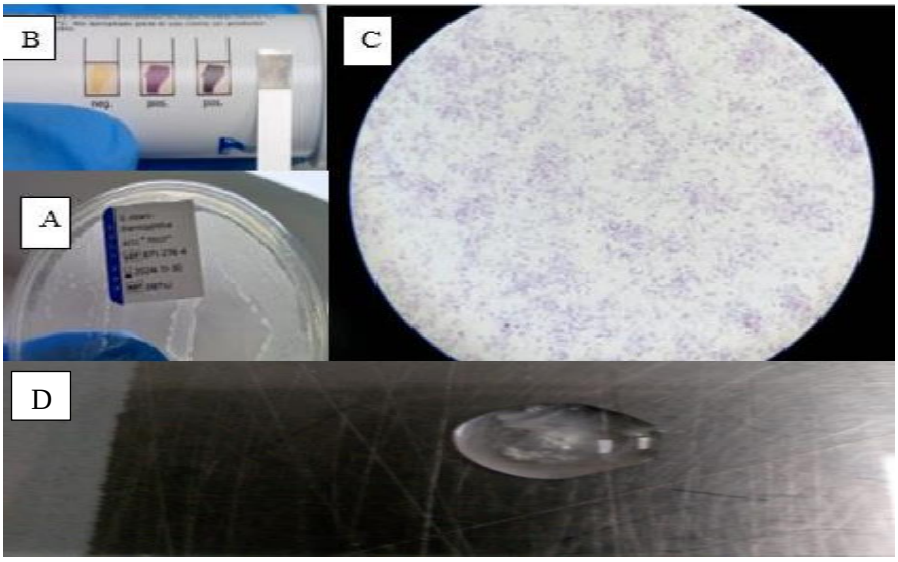
Apéndice 1D. Metodología para el control positivo

Debido a que la matriz UHT que mayor volumen representa en el proceso productivo de la empresa es la leche entera, se consideró usarla como matriz para el control positivo en la técnica estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y para la técnica modificada. con el cultivo fresco de *G. stearothermophilus* a una concentración de $1.5x10^8$ UFC/ml, el cual se preparó a partir del patrón McFarland 0.5. A partir de la matriz UHT entera de 400 ml se adicionó 200 ml en un frasco Schott adicionando la suspensión del tubo comparado con el patrón comercial 0.5 McFarland, los 200 ml de muestra se dividió en dos frascos Schott cada uno con 100 ml, un frasco sometido a choque térmico a 80°C durante 10 minutos seguido en agua fría hasta bajar la temperatura proceso que ocurrió en cinco minutos, el otro frasco se sembró directamente sin realizar choque térmico, sembrando directamente 1 ml en tubos con caldo BHI en el caso de la metodología estándar de la norma de esterilidad NTC 4433 de 2015 y la técnica modificada en cajas de petri con agar BHI.

Apéndice E. Figuras

E1.

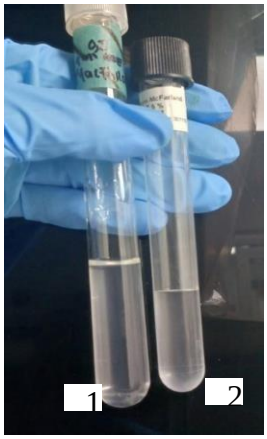
Resultado de la recuperación de G. stearothermophilus



A: Recuperación en medio plate count; B: oxidasa positiva; C: Bacilos gram positivos; D: Catalasa positiva

E2.

Registro fotográfico de la comparación de turbidez con patrón McFarland para la estandarización del inoculo. Patrón preparado a partir de la cepa activada G. stearothermophilus ATCC 7953 (1). Patrón McFarland 0.5 (2).



E3.

Frasco schott para el control positivo en choque térmico a 80°C durante 10 minutos

