



UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL
(UCI)

**PROPUESTA DE GESTIÓN DE LA PREVALENCIA DE MICROORGANISMOS
ESPORULADOS TERMORRESISTENTES EN LAS LECHE DEL
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA COLOMBIA Y SU POSIBLE IMPACTO
SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE UHT.**

MARÍA DANIELA ESPAÑA GUTIÉRREZ

Bogotá, Colombia
SEPTIEMBRE, 2022

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido quien me ha dado todos mis logros personales y profesionales, quien ha guiado mi camino. A mis padres quienes con su ejemplo me han motivado e inspirado a seguir avanzando y mejorando cada día.

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo de los ganaderos colombianos en el desarrollo de esta investigación.

A la Asociación Colombiana de Procesadores de la Leche (ASOLECHE) por el conocimiento y el apoyo brindado.

A las Compañía de Alimentos que destinaron recursos para la ejecución del proyecto.

A la Profesora Ana Cecilia Segreda de la Universidad para la Cooperación Internacional por su orientación y tutoría en el desarrollo del proyecto.



UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL
(UCI)

Este Proyecto Final de Graduación fue aprobado por la Universidad como
Requisito parcial para optar al grado de Master en Gerencia de Programas
Sanitarios en Inocuidad de Alimentos.

ANA CECILIA SEGREDA RODRÍGUEZ
TUTORA

ADRIAN RODA BRENES
LECTOR

MARÍA DANIELA ESPAÑA GUTIÉRREZ
SUSTENTANTE

ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
TRIBUNAL EVALUADOR.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN EJECUTIVO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. Introducción	vi
2. Objetivos	5
Objetivo General	5
2.1.1. Objetivos Específicos	5
3. Justificación	5
4. Marco Teórico	7
Tecnología del procesamiento y envasado de alimentos.....	7
4.1. El proceso térmico de temperatura ultra-alta (UHT por sus siglas en	
4.2. inglés)	11
<i>Bacillus sporothermodurans</i> microorganismo termorresistente presente en	
4.3. la leche UHT	12
4.4. Calidad microbiológica de la leche UHT en Colombia.....	18
4.5. Tratamientos térmicos para eliminación de bacterias en la leche y	
4.6. prolongar su vida útil.....	20
4.7. Uso de la BacT/Alert@ 3D como herramienta para la detección de	
contaminación y control de calidad	21
Métodos de cuantificación e identificación de <i>B. sporothermodurans</i>	23
5. Resultados y discusión	25
5.2. Resultados objetivo 1.....	29
Resultados objetivo 2.....	31
6. Conclusiones	36
7. Recomendaciones	38
7. Bibliografía	39

RESUMEN EJECUTIVO

La presencia de esporas altamente resistentes al calor de *Bacillus sporothermodurans* en leche sometida a tratamientos de ultra-alta temperatura (UHT por sus siglas en inglés) se ha convertido en un problema importante en la industria láctea. Las esporas altamente resistentes al calor (HHRs por sus siglas en inglés), aparecen en muestras de leche UHT, sobre todo si el método de tratamiento térmico es indirecto (intercambiador de calor). Varios autores han reportado que su presencia en los productos, no representan un riesgo para la salud del consumidor y se asume que no alteran la calidad de la leche, de tal manera que su presencia pasa desapercibida. Sin embargo, existen pocas evidencias acerca de su impacto sobre el deterioro de la calidad de la leche UHT y otros productos lácteos asépticos y de baja acidez a lo largo de su vida útil comercial. En los últimos años, las leches UHT definidas en el Decreto 616 de 2006, analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de Colombia, han venido presentando resultados no satisfactorios respecto con la prueba de esterilidad comercial (PEC), debido a que se han detectado microorganismos productores de esporas altamente resistentes a los tratamientos de UHT. A nivel mundial, se reporta como principal causante de esta clase de contaminación al *B. sporothermodurans*. La presencia de este microorganismo en las leches colombianas se considera indeseable, puesto que impide el cumplimiento de los requisitos de esterilidad comercial establecidos en la regulación nacional. Las leches clasificadas como no satisfactorias son decomisadas y descartadas por las autoridades sanitarias; lo anterior genera un impacto económico y reputacional negativo para todas las industrias procesadoras de lácteos en el país.

Con este proyecto de investigación se busca evaluar la prevalencia de microorganismos esporulados termorresistentes (HHRs) en las leches del departamento de Cundinamarca, Colombia, para la determinación de su posible impacto sobre la calidad de la leche UHT, a través de la integración de los protocolos de BPM y Programa de Aprobación de Proveedores (PAP) utilizados en las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, para el sondeo de la inocuidad y calidad de la leche cruda y a través del análisis de la presencia de HHRs en la leche cruda proveniente de las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, su correlación con las diferentes épocas estacionales del año, para la determinación de su prevalencia después de los tratamientos térmicos de ultra alta temperatura (UHT).

Para evaluar la presencia de *B. sporothermodurans* en la leche cruda proveniente de cuencas lecheras de la región de Cundinamarca, Colombia, se analizó su correlación con las diferentes épocas estacionales del año y su prevalencia después de los tratamientos térmicos de ultra-alta temperatura (UHT). Para determinar la correlación entre la presencia de *B. sporothermodurans* y las épocas estacionales, se tomará un set de muestras en invierno y otras en verano. Para determinar la presencia de HHRs en la leche UHT se realizó el método para evaluar la esterilidad comercial según la Norma técnica Colombiana 4433 en donde se llevaron muestras de leche UHT a incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y la otra a $55^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 10 días. Transcurrido este tiempo, se efectuará coloración de Gram. La prueba es

considerada satisfactoria si se observa ausencia de HHRS e insatisfactoria al observar presencia.

Se evidenció prevalencia de HHRS en muestras de UHT con concentraciones desde 4.95 Log UFC/ml a 5.72 Log UFC/ml. Investigaciones previas han demostrado presencia de HRS en concentraciones desde 1 a 5 Log UFC/mL en pastos y ensilaje de maíz utilizado para alimentar ganado bovino lo que sugiere que este tipo de microorganismos inician su ruta de contaminación desde la alimentación bovina hasta llegar a la leche cruda. Adicionalmente, se identificó la prevalencia de este microorganismo en un 80% durante el mes de mayo, que puede estar relacionado con la alta precipitación que se genera en Colombia en esta época. Según varios autores, este microorganismo no es patógeno, o sea que no representa un riesgo para la salud pública, ni se evidenció afectación sobre la calidad de la leche UHT a lo largo de su vida útil. Se recomienda gestionar la prevalencia de los microorganismos esporulados termorresistentes en las leches del departamento de Cundinamarca Colombia a través de la integración de las buenas prácticas de manufactura en las plantas procesadoras de lácteos, la implementación de controles preventivos de higiene y desinfección y las buenas prácticas ganaderas, en donde se articulen los esfuerzos de mitigación del riesgo de contaminación cruzada y prevalencia de este tipo de microorganismos termorresistentes. Se recomienda Analizar en futuros estudios el alimento animal “silaje”, para conocer los recuentos de *B. sporothermodurans* y confirmar su procedencia, como fuente potencial de contaminación, y continuar reforzando el nivel de capacitación de productores y operarios en el empleo de las buenas prácticas en relación con la tecnología empleada, durante la extracción y distribución del silaje a las vacas en producción de leche.

Con este proyecto de investigación se busca generar un nuevo conocimiento sobre el posible impacto en el deterioro de la calidad de la leche UHT y otros productos lácteos asépticos, así como el efecto que tienen las épocas estacionales del año y las diferentes regiones del país sobre la presencia de *B. sporothermodurans* y su prevalencia después de los procesos térmicos UHT. Se espera con este estudio aportar conocimientos que generen futuras soluciones a la problemática recurrente del incumplimiento sanitario que afecta a la industria láctea a nivel nacional, así como generar información útil para las investigaciones administrativas que realizan las entidades de salud pública y la autoridad sanitaria del país.

Palabras clave: Microorganismos esporulados termorresistentes (HHRS), *Bacillus sporothermodurans*, leche UHT, inocuidad, calidad.

ABSTRACT

The presence of highly heat resistant spores of *Bacillus sporothermodurans* in milk subjected to ultra-high temperature (UHT) treatments has become a major problem in the dairy industry. Highly heat resistant spores (HHRS) appear in UHT milk samples, especially if the heat treatment method is indirect (heat exchanger). Several authors have reported that their presence in the products does not represent a risk to the health of the consumer and it is assumed that they do not alter the quality of the milk, in such a way that their presence goes unnoticed. However, there is little evidence about its impact on quality deterioration of UHT milk and other aseptic and low-acid dairy products throughout their commercial shelf life. In recent years, the UHT milks defined in Decree 616 of 2006, analyzed in the Public Health Laboratory of Colombia, have been presenting unsatisfactory results with respect to the commercial sterility test (PEC), due to the fact that microorganisms have been detected. Producers of spores highly resistant to UHT treatments. Worldwide, *B. sporothermodurans* is reported as the main cause of this type of contamination. The presence of this microorganism in Colombian milk is considered undesirable, since it prevents compliance with the commercial sterility requirements established in the national regulation. The milks classified as unsatisfactory are seized and discarded by the health authorities; the foregoing generates a negative economic and reputational impact for all dairy processing industries in the country.

This research project seeks to evaluate the prevalence of heat-resistant sporulated microorganisms (HHRS) in milk from the department of Cundinamarca, Colombia, to determine their possible impact on the quality of UHT milk, through the integration of protocols of BPM and Supplier Approval Program (PAP) used in the dairy basins of the department of Cundinamarca, Colombia, for the survey of the safety and quality of raw milk and through the analysis of the presence of HHRS in raw milk from the dairy basins of the department of Cundinamarca, Colombia, its correlation with the different seasonal times of the year, for the determination of its prevalence after ultra-high temperature (UHT) thermal treatments.

To evaluate the presence of *B. sporothermodurans* in raw milk from dairy farms in the Cundinamarca region, Colombia, its correlation with the different seasonal times of the year and its prevalence after ultra-high temperature (UHT) heat treatments were analyzed). To determine the correlation between the presence of *B. sporothermodurans* and the seasons, a set of samples will be taken in winter and others in summer. To determine the presence of HHRS in UHT milk, the method to evaluate commercial sterility was carried out according to Colombian Technical Standard 4433, where samples of UHT milk were incubated at $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and the other at $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 10 days. After this time, Gram staining will be performed. The test is considered satisfactory if the absence of HHRS is observed and unsatisfactory when the presence is observed.

Prevalence of HHRS was evidenced in UHT samples with concentrations from 4.95 Log CFU/ml to 5.72 Log CFU/ml. Previous research has shown the presence of HRS in concentrations from 1 to 5 Log CFU/ml in pastures and corn silage used to feed

cattle, which suggests that this type of microorganisms begin their contamination route from cattle feed to milk. raw. Additionally, the prevalence of this microorganism was identified in 80% during the month of May, which may be related to the high precipitation that is generated in Colombia at this time. According to several authors, this microorganism is not pathogenic, that is, it does not represent a risk to public health, and there was no evidence of any effect on the quality of UHT milk throughout its useful life. It is recommended to manage the prevalence of heat-resistant sporulated microorganisms in milk from the department of Cundinamarca, Colombia, through the integration of good manufacturing practices in dairy processing plants, the implementation of preventive hygiene and disinfection controls, and good livestock practices, where efforts to mitigate the risk of cross-contamination and prevalence of this type of heat-resistant microorganisms are articulated. It is recommended to analyze in future studies the animal feed "silage", to know the counts of *B. sporothermodurans* and confirm its origin, as a potential source of contamination, and continue reinforcing the level of training of producers and operators in the use of good practices. in relation to the technology used, during the extraction and distribution of the silage to the cows in milk product.

This research project seeks to generate new knowledge about the possible impact on the deterioration of the quality of UHT milk and other aseptic dairy products, as well as the effect that the seasonal times of the year and the different regions of the country have on the presence of *B. sporothermodurans* and its prevalence after UHT thermal processes. This study is expected to provide knowledge that generates future solutions to the recurring problem of sanitary non-compliance that affects the dairy industry at the national level, as well as to generate useful information for administrative investigations carried out by public health entities and the country's health authority.

Keywords: Highly heat-resistant spore (HHRS) forming bacteria, *Bacillus sporothermodurans*, UHT milk, food safety, quality.

1. INTRODUCCIÓN

La leche entera contiene nutrientes, que sirven como un medio ideal para el crecimiento de bacterias (Fysun, Kern, Wilke, & Langowski, 2019). Debido a las enfermedades transmitidas por alimentos, la inocuidad de la leche se convirtió en un problema de salud pública relevante. Por lo tanto, la producción, comercialización, transporte y expendio de la leche en Colombia están regulados por el INVIMA y el Ministerio de la Protección Social, en el Decreto 616 de 2006. Los costos de no calidad (desviaciones microbiológicas en el producto final) asociados a la materia prima láctea, pueden generar grandes pérdidas económicas para los productores de lácteos. Es común que se presenten contaminaciones en la leche durante el proceso de llenado, por la pérdida de esterilidad comercial. El *Bacillus sporothermodurans* es una bacteria aerobia mesófila Gram positiva, que produce esporas altamente resistentes al calor que pueden sobrevivir en las leches UHT a temperaturas entre 135 a 142 °C por unos pocos segundos. Estudios han demostrado que durante la ingestión de leches con *B. sporothermodurans*, no se evidencian efectos patógenos; sin embargo, existe poca información acerca del posible impacto de este microorganismo sobre el deterioro de la calidad de la leche UHT y otros productos asépticos larga vida (Owusu-darko et al., 2019).

En los últimos años, las leches UHT en Colombia han venido presentando resultados no satisfactorios respecto a la prueba de esterilidad comercial (PEC) debido a que se han detectado microorganismos productores de esporas altamente resistentes a los tratamientos de UHT. La Secretaría Distrital de Salud (SDS) continuamente analiza muestras de leche UHT que son clasificadas como no aptas para el consumo humano por la presencia de *B. sporothermodurans*, identificado como principal contaminante; en consecuencia, de estos resultados analíticos, la SDS impone sanciones económicas a las industrias lácteas por el incumplimiento de normas higiénico sanitarias establecidas en el Decreto 616 de 2006 artículo 18 y en la Ley 9 de 1979 artículo 304-305 de Colombia. La presencia de este microorganismo en las leches colombianas se considera indeseable, puesto que

impide el cumplimiento de los requisitos de esterilidad comercial establecidos en la regulación nacional generando un impacto económico y reputacional negativo. Cabe resaltar que esta problemática se ha convertido en recurrente de toda la industria láctea en el país.

La presencia de esporas altamente resistentes al calor de *B. sporothermodurans* en leche sometida a tratamientos de ultra-alta temperatura (UHT por sus siglas en inglés), se ha convertido en un problema importante en la industria láctea. Las bacterias termorresistentes (HHRS por sus siglas en inglés)", aparecen en muestras de leche UHT, sobre todo si el método de tratamiento térmico es indirecto (intercambiador de calor). Varios autores, han reportado que su presencia en los productos lácteos no representa un riesgo para la salud del consumidor y se asume que no altera la calidad de la leche, de tal manera que su presencia pasa desapercibida.

Sin embargo, existen pocas evidencias acerca de su impacto sobre el deterioro de la calidad de la leche UHT y otros productos lácteos procesados y envasados asépticamente y de baja acidez a lo largo de su vida útil comercial. En los últimos años, las leches UHT definidas en el Decreto 616 de 2006, analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de Colombia, han venido presentando resultados no satisfactorios respecto a la prueba de esterilidad comercial (PEC), debido a que se han detectado microorganismos productores de esporas altamente resistentes a los tratamientos de UHT.

A nivel mundial, se reporta como principal causante de esta clase de contaminación a la presencia de la bacteria *B. sporothermodurans*. La presencia de este microorganismo en las leches colombianas se considera indeseable, puesto que impide el cumplimiento de los requisitos de esterilidad comercial establecidos en la regulación en Colombia (Bernier et al., 2012). Las leches clasificadas como no satisfactorias son decomisadas y descartadas por las autoridades sanitarias;

gestión que genera un impacto económico y reputacional negativo para todas las industrias procesadoras de lácteos en el país.

Con este proyecto de investigación se busca evaluar la prevalencia de microorganismos esporulados termorresistentes (HRRS) en las leches del departamento de Cundinamarca, Colombia, para la determinación de su posible impacto sobre la calidad de la leche UHT, a través de la integración de los protocolos de BPM y Programa de Aprobación de Proveedores (PAP) utilizados en las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, para el sondeo de la inocuidad y calidad de la leche cruda y a través del análisis de la presencia de HRRS en la leche cruda proveniente de las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, su correlación con las diferentes épocas estacionales del año, para la determinación de su prevalencia después de los tratamientos térmicos de ultra alta temperatura (UHT).

1.1 Antecedentes

Heyndrickx, M., y Scheldeman, P. (2002) manifestaron en su estudio que las bacterias aeróbicas formadoras de esporas son importantes en la industria alimentaria por cuatro razones principales. La primera es que la naturaleza ubicua de estos formadores de esporas hace que sea básicamente imposible evitar su presencia en alimentos e ingredientes crudos. En segundo lugar, los procesos de pasteurización comúnmente utilizados, aunque son adecuados para inactivar las células vegetativas, no logran matar las esporas. Las esporas sobrevivientes, que experimentan poca o ninguna competencia de las células vegetativas de crecimiento más rápido, pueden germinar y proliferar rápidamente en el producto. En tercer lugar, las características adhesivas de algunas esporas facilitan su unión a las superficies de tuberías y equipos de procesamiento, lo que lleva a la formación de biopelículas. Por último, existe una creciente preocupación por la tolerancia o la resistencia de las esporas o las células vegetativas a las condiciones o tratamientos que generalmente se supone que detienen su crecimiento (bajas temperaturas y

bajo pH), o que inactivan todo el material vivo, como esterilización y procesamiento a ultra alta temperatura (UHT).

Abouelnaga et al. (2016) reportaron que *B. sporothermodurans* se detectó por primera vez en leche UHT en Italia y Austria en 1986, sin embargo, estudios han demostrado su presencia en leche esterilizada y otros productos como la leche con chocolate, leche evaporada y leche reconstituida. Durante algunos años siguientes a su descubrimiento, *B. sporothermodurans* fue llamado “organismo HHRS” y aparecía como pequeñas colonias puntiformes en agar de recuento en placa incubado a 30°C.

Adicionalmente, este microorganismo no tiene una patogenicidad demostrada y parece no generar alteraciones detectables en producto (Fernandes, 2009). Sin embargo, hay informes de cepas de *B. sporothermodurans* aisladas en Brasil que causan una actividad proteolítica significativa que conduce al deterioro de la leche UHT, el deterioro de la calidad puede estar relacionado con ligeros cambios en el color, sabores desagradables y la desestabilización de las micelas de caseína (Pinto et al., 2008).

Scheldeman et al. (2006) condujeron un estudio que buscaba comprender la presencia, fuentes y la naturaleza de las esporas potencialmente resistentes al calor en la leche cruda en general y particularmente de las esporas de *B. sporothermodurans*, para esto, 17 granjas lecheras ubicadas en diversas regiones de Bélgica fueron muestreadas en los inviernos de 1998 a 1999, ya que generalmente se observa mayor incidencia de esporas en este período, cuando las vacas tratan de resguardarse en interior de las instalaciones. Esta investigación reveló que las muestras de leche analizadas presentaban esporas altamente resistentes al calor de *B. sporothermodurans* presentes en los equipos utilizados para la alimentación y ordeño de las vacas, convirtiéndose reservorios de esporas que posteriormente contaminan la leche.

1.2 Justificación

Con este proyecto de investigación científica, se busca conocer el posible impacto que puede generar la *B. sporothermodurans* en lo referente al deterioro de la calidad de la leche UHT y otros productos lácteos procesados y envasados asépticamente, así como el efecto que tienen las épocas estacionales del año y las diferentes regiones del país sobre la presencia de HHRS y su prevalencia después de los procesos térmicos UHT.

Es importante mencionar que la leche que se utiliza para elaborar productos UHT debe tener una calidad “premium”, por el tipo de procesamiento y envasado que se le aplica para su conservación.

Por lo tanto, con esta investigación científica, se pretende aportar información que permita visualizar una solución para la problemática recurrente del incumplimiento sanitario que afecta a la industria láctea a nivel nacional.

También, se proyecta recopilar información útil para las investigaciones administrativas que realizan las entidades de salud pública y la autoridad sanitaria del país.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la prevalencia de microorganismos esporulados termorresistentes (HHRS) en las leches del departamento de Cundinamarca, Colombia, para la determinación de su posible impacto sobre la calidad de la leche UHT.

1.3.2 Objetivos Específicos

Integrar los protocolos de BPM y Programa de Aprobación de Proveedores (PAP) utilizados en las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, para el sondeo de la inocuidad y calidad de la leche cruda.

Analizar la presencia de HRRS en la leche cruda proveniente de las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, su correlación con las diferentes épocas estacionales del año, para la determinación de su prevalencia después de los tratamientos térmicos de ultra alta temperatura (UHT).

2 MARCO TEÓRICO

2.1.1 Tecnología del procesamiento y envasado de alimentos

La esterilidad comercial se define como una condición en la que el equipo y los envases no deben contener microorganismos viables de importancia para la salud pública o microorganismos nocivos para la salud, que podrían reproducirse en condiciones normales de almacenamiento y distribución (Mancilla et al., 2019).

En la industria de alimentos enlatados, la esterilidad comercial se logra mediante el calor tratamiento de un producto alimenticio dentro de un recipiente sellado. El procesamiento aséptico utiliza sistemas separados para esterilizar el producto y el paquete. El producto estéril se envasa en envases estériles dentro de la zona estéril de un sistema de envasado aséptico.

El procesamiento y envasado aséptico de alimentos es aquel proceso productivo en el que alimento y el recipiente se esterilizan simultáneamente, al contrario del convencional en que dichas etapas se realizan por separado como se observa en la figura 1.

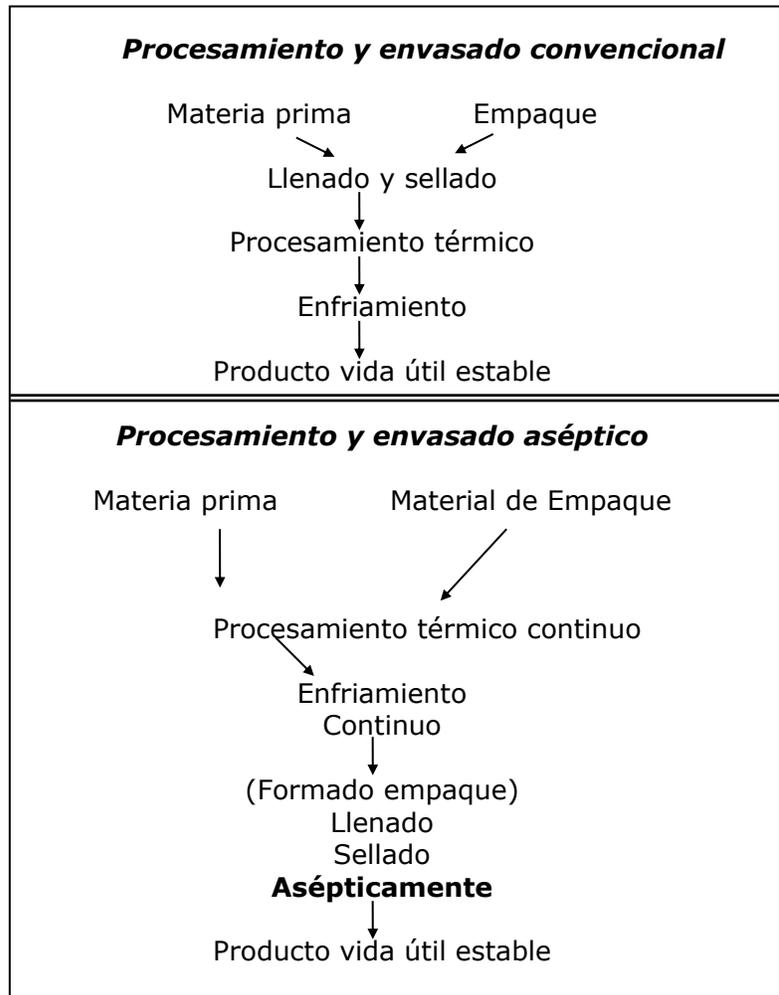


Figura 1: Comparación entre el procesamiento y envasado convencional y el aséptico

Fuente: Segreda, 2018.

La diferencia que existe entre estas dos técnicas es que el procesamiento y envasado aséptico de alimentos es un método por medio del cual un producto con esterilidad comercial (técnica de esterilización que se aplica a los alimentos con el fin de eliminar todos los microorganismos que son dañinos para el ser humano y por ende generadores de toxinas). Si éstos llegan a estar presentes dentro del alimento envasado, podrían crecer y provocar su descomposición, aún bajo condiciones normales de manejo y almacenamiento), es colocado en un recipiente estéril o sea libre de gérmenes, el cual es cerrado herméticamente bajo condiciones también estériles para producir un producto envasado con una vida útil estable, que puede

ser almacenado por un período de tiempo largo, sin necesidad de utilizar refrigeración (Segreda, 2018).

En el caso del procesamiento y envasado convencional de alimentos, la materia prima se procesa por un lado y al recipiente se le aplica una operación conocida como escaldado (tratamiento térmico que se aplica en los recipientes de vidrio y metal antes del envasado de los alimentos, con la finalidad de eliminar cualquier microorganismo indeseable que haya quedado latente en éste luego de haber sido lavado con agua y jabón. Esta operación se realiza a una temperatura de 96°C (aproximadamente), por un período de tiempo de 15-20 minutos de contacto del envase al vapor o al agua caliente). Luego, se coloca en el recipiente el alimento procesado caliente (85°C), se sella y se le aplica un tratamiento térmico severo de esterilización aplicando temperaturas desde 90°C hasta 121°C por períodos de tiempo que oscilan desde 20 hasta 35 minutos aproximadamente, dependiendo del tipo de producto y envase que se esté utilizando, obteniéndose también un producto con una vida útil estable (Segreda, 2018).

Por lo tanto, la extensión de la vida útil del alimento bajo este sistema aséptico es mucho mejor que el obtenido en un producto enlatado por el tipo de tratamiento térmico que se le realiza al primero. Esto hace que realmente se detecten diferencias sensoriales (sabor, olor, color, textura, entre otros), entre un producto enlatado y otro aséptico. Además, otro factor importante de mencionar es el hecho de que al ser enfriado el producto antes de ser envasado, se está eliminando el sobretratamiento térmico y la posibilidad de recontaminación posterior (Segreda, 2018).

Los objetivos básicos que tiene la aplicación de esta tecnología son los de retener al máximo las características nutricionales y de calidad (hay menos abuso térmico sobre el alimento, lo que ayuda a que se mantenga el sabor, color y aspectos nutricionales de éste) e incrementar la vida útil del producto. A los alimentos procesados y envasados asépticamente se les aplica dos tipos de tratamiento

térmico: HTST (temperatura alta, tiempo corto) y UHT (temperatura ultra alta). Su aplicación en los diferentes alimentos se desglosa de la siguiente forma:

- HTST (poco ácidos): pH > 4,6 (ligeramente ácido), se le aplica 138-150°C/ 1-3 s
- HTST (ácidos): pH < 4,6 se le aplica 93-96°C/ 15-30 s
- UHT (leche): pH 6,7 (casi neutro), se le aplica 142°C / 3 s

Este tipo de tecnología es muy sofisticada lo que implica que, para establecerla, se debe de hacer una inversión inicial elevada, especialmente en el sistema de envasado. Además, es un sistema complejo que requiere de controles sofisticados y de personal altamente capacitado. Otra desventaja que se está presentando con esta tecnología tan innovadora, es que la biodegradación del empaque laminado es lenta, lo que está provocando contaminación (Segreda, 2018).

En ciertas partes de Estados Unidos se ha querido prohibir el consumo de este tipo de productos por este problema. En ciertos países de Europa y Brasil se desintegra este material de empaque a pedazos muy pequeños y se adhiere a superficies de madera que luego barnizan con el fin de comercializarlo como un tipo de “artesanía”. Ej. tablas hechas de madera con prensa metálica usadas para sujetar hojas de trabajo. Esto no resuelve totalmente el problema, pero sin embargo es una forma de reutilizarlo moderadamente. Por lo tanto, se puede confirmar con lo mencionado anteriormente, que toda innovación ofrece ventajas y desventajas (Segreda, 2018).

La pasteurización tradicional de la leche requiere un tratamiento térmico mínimo de 72°C durante 15 segundos con refrigeración posterior. Sin embargo, el tratamiento UHT, está regido por el uso de la técnica de procesamiento y envasado aséptico de alimentos de forma simultánea (Segreda, 2018).

Esto significa, que con la técnica UHT y la respectiva tecnología aséptica, se logra que la vida útil de la leche se extienda de 21 días con la aplicación de la pasteurización tradicional a más de cuatro meses (Fontalvo et al., 2021).

Hoy en día, los diseñadores de soluciones de diseño para la logística como tal se ven enfrentados a buscar continuamente propuestas innovadoras de envases, empaques y embalajes que sirvan para alimentar a una población en crecimiento de forma segura (inocua) y sostenible (Fellows, 2018).

2.1.2 El proceso térmico de temperatura ultra-alta (UHT por sus siglas en inglés)

Cuando se hace referencia a la tecnología de procesamiento y envasado aséptico, se hace referencia al hecho de que las leches UHT se les da un tratamiento térmico de 130 y 145°C durante 2 a 4 segundos u otra combinación tiempo - temperatura de tratamiento equivalente y de forma simultánea se les aplica un choque térmico (evaporación “flash”), para darle en enfriamiento rápido (temperatura ambiente) (Segreda, 2018).

Por tal motivo, las condiciones de proceso deben mantenerse estrictamente controladas, con el fin de evitar que la leche se caramelize, lo que puede modificar su sabor y color, debido a la reacción de Maillard. Ésta a su vez, es una reacción química que se produce entre un aminoácido y un azúcar reductor, por un sobrecalentamiento principalmente.

La acción mencionada anteriormente, se aplica con el fin de conservar las características sensoriales propias de la leche “premium”, que es la que se utiliza como materia prima para desarrollar este tipo de productos de vida útil extensa, al ser almacenados a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco (Segreda, 2018).

El proceso UHT implica mantener la leche a una temperatura entre 140 y 150°C por 1-2 segundos. Este proceso destruye todas las células vegetativas presentes en la leche y la mayoría de las esporas, aunque algunas termorresistentes pueden sobrevivir a este tratamiento. Los nutrientes presentes en la leche no se ven afectados significativamente por el tratamiento térmico, adicionalmente un proceso UHT controlado genera una variación muy leve en el sabor de ésta (Ledina, 2021)

El proceso UHT es usualmente acompañado de un llenado y empaquetado aséptico del producto, con el fin de prevenir su re-contaminación posterior al tratamiento térmico (Ledina, 2021).

El equipo utilizado para aplicar la técnica de procesamiento y envasado aséptico de alimentos tiene un sistema de “atmósfera negativa”, que evita el contacto de la leche UHT con el ambiente externo (Segreda, 2018).

2.1.3 Composición del empaque “Tetra pak” y sus características

El área de los envases, empaques y embalajes está innovando constantemente y es que, desde el descubrimiento del fuego y su inminente uso para cocinar alimentos, la innovación siempre ha estado presente en la consecución, transporte, almacenaje, conservación y preservación de alimentos.

El material empaque “Tetra pak” está formado por 6 capas (organizadas de afuera hacia adentro) tal y como se indica a continuación en la figura 2: 1. **Polietileno** (protege la leche contra la humedad externa); 2. **Papel** (para estabilidad y fortalece el empaque); 3. **Polietileno** (capa adherente); 4. **Capa de aluminio** (barrera contra oxígeno, sabor y luz); 5. **Polietileno** (capa adherente) y 6. **Polietileno** (sella el contacto del empaque con el producto).



Figura 2. Estructura de los envases Tetra Pak (Fuente: adaptada de Tetrapak 2022).

2.1.4 Aplicaciones del envasado y procesamiento aséptico de la leche UHT

Para iniciar la aplicación de la técnica mencionada, los rollos el material de empaque Tetra Pak que está previamente troquelado, se colocan en el equipo y se introducen en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y luego conforme se va sellando mecánicamente el material de empaque, el exceso de esta sustancia se volatiliza, fortalecido con la luz ultravioleta que se utiliza para reforzar su esterilización.

De forma simultánea, se empieza a sellar la parte inferior de éste, luego se llena con la leche UHT, de acuerdo con el volumen establecido. De inmediato, se sella la parte superior y el equipo continúa dándole la forma de ladrillo o bloque que lo caracteriza.

Cuando ya el material de empaque tiene la forma de ladrillo o bloque, todas las partes salientes son pegadas con goma que es liberada por accesorios propios del equipo. Luego, por medio de una banda transportadora, cada caja pasa por una “estación” en la que se libera por medio de un sistema láser una la tinta que va a identificar el producto con la fecha de producción y vencimiento, al igual que otra

información propia de los códigos propios de la empresa procesadora. (Segreda. 2018)

Este tipo de producto, antes de abierto puede ser almacenado en un lugar seco y fresco por un período de tiempo equivalente a 6 meses. Luego de abierto, éste debe refrigerarse y su durabilidad va a depender del tipo de leche UHT y de la manipulación que se le dé. (Segreda. 2018)

2.1.5 Bacillus sporothermodurans microorganismo termorresistente presente en la leche UHT

Es en el transcurso de este tratamiento térmico, en el que pueden tener prevalencia las bacterias aerobias formadoras de endosporas que van a presentar problemas importantes para la industria láctea debido a su papel potencial en el deterioro de la calidad y la vida útil reducida de los productos lácteos (Sadiq et al., 2016).

Estas bacterias al ser termorresistentes son difíciles de eliminar durante el tratamiento térmico, ya que sus endosporas son resistentes al calor que se aplica con la tecnología de la UHT, ya que tienden a formar biopelículas que son las que dificultan que éstas se eliminen totalmente.

Además, los tratamientos térmicos insuficientes o la alta contaminación de las materias primas usadas en el procesamiento y envasado de leche UHT, facilita el deterioro de los alimentos por microorganismos formadores de esporas (Pujol, Albert, Johnson, & Membré, 2013).

Asimismo, la limpieza y esterilización inadecuadas de procesamiento y llenado de equipos o envases defectuosos, también puede generar una contaminación posterior al proceso, por microorganismos termofílicos y mesofílicos formadores de esporas (Santillán, 2021).

Entre los formadores de esporas, están las bacterias que pertenecen al género *Bacillus spp.* y los géneros aliados son de particular preocupación porque las de algunos bacilos no solo sobreviven al proceso de pasteurización, sino que hay evidencia directa e indirecta de que algunos de ellos como *B. sporothermodurans* son capaces de soportar el UHT (temperatura ultra alta, 138 ° C-140°C por 2-4 segundos) (Santillan, 2021).

Santillán, manifestó en su estudio que las bacterias aeróbicas formadoras de esporas son importantes en la industria alimentaria por cuatro razones principales. La primera es que la naturaleza ubicua de estos formadores de esporas hace que sea básicamente imposible evitar su presencia en alimentos e ingredientes crudos. En segundo lugar, los procesos de pasteurización comúnmente utilizados, aunque son adecuados para inactivar las células vegetativas, no logran eliminar las esporas.

Por lo tanto, las que sobreviven por ejemplo al tratamiento térmico UHT experimentan poca o ninguna competencia de las células vegetativas de crecimiento más rápido, por lo que pueden proliferarse rápidamente en el producto. En tercer lugar, las características adhesivas de algunas esporas facilitan su unión a las superficies de tuberías y equipos de procesamiento, lo que lleva a la formación de biopelículas (Shemesh, 2020).

Por último, existe una creciente preocupación por la tolerancia o la resistencia de las esporas o las células vegetativas a las condiciones o tratamientos que generalmente se supone que detienen su crecimiento (bajas temperaturas y bajo pH), o que inactivan todo el material vivo, como esterilización y procesamiento a ultra alta temperatura (UHT) (Shemesh, 2020).

Abouelnaga et al. (2016) reportaron que *B. sporothermodurans* se detectó por primera vez en leche UHT en Italia y Austria en 1986. Sin embargo, estudios han demostrado su presencia en leche esterilizada y otros productos como la leche con chocolate, leche evaporada y leche reconstituida. Años después de que se

descubriera la termorresistencia de este microorganismo, el *B. sporothermodurans* fue llamado “organismo HHRS” y aparecía como pequeñas colonias puntiformes en agar de recuento en una placa de Petri, que fue incubada a 30°C (Klijn, Hermanb, et al., 1997).

Este microorganismo generalmente alcanzaba un máximo de 10^5 células vegetativas y 10^3 esporas/mL después de una incubación por 15 días a 30°C de paquetes sin abrir de leche de consumo, según la metodología establecida por la regulación de la Comunidad Europea. Adicionalmente, este microorganismo no tiene una patogenicidad demostrada y parece no generar alteraciones detectables en producto (Ledina, 2021).

Sin embargo, hay informes de cepas de *B. sporothermodurans* aisladas en Brasil que causan una actividad proteolítica significativa que conduce al deterioro de la leche UHT (Pinto et al., 2008). El deterioro de la calidad de este producto procesado y envasado asépticamente puede estar relacionado con ligeros cambios en el color, sabores desagradables y la desestabilización de las micelas de caseína.

Scheldeman et al. (2006) condujeron un estudio que buscaba comprender la presencia, fuentes y la naturaleza de las esporas potencialmente resistentes al calor en la leche cruda en general y particularmente de las esporas de *B. sporothermodurans*. Para esto, diecisiete granjas lecheras ubicadas en diversas regiones de Bélgica fueron muestreadas en los inviernos de 1998 a 1999, ya que generalmente se observa mayor incidencia de esporas en este período, cuando las vacas tratan de resguardarse en el interior de las instalaciones. Esta investigación reveló, que las muestras de leche analizadas no sólo presentaban esporas de *B. sporothermodurans* altamente resistentes al calor, sino que también fueron encontradas esporas de *P. lactis*, *Brevibacillus borstelensis*, *B. licheniformis* y *Brevibacillus brevis*. Es factible que los equipos utilizados para la alimentación y ordeño de las vacas puedan convertirse en reservorios de esporas, que posteriormente puedan contaminan la leche.

Los recuentos promedio de esporas en leche cruda están en el rango de $10-10^2$ UFC/mL), a pesar de algunas diferencias regionales, estacionales y metodológicas, predomina el *B. licheniformis* en la leche cruda (Phillips & Griffiths, 1986). Por otro lado, *B. cereus* a menudo es la especie psicrotolerante más común, especialmente en el período de verano (Scheldeman et al., 2006). Tabit (2018) evaluó la prevalencia de *B. sporothermodurans* en marcas de leche UHT en Sudáfrica y analizó el nivel de proteólisis en la leche UHT debido al crecimiento de este microorganismo durante el corto y largo plazo almacenamiento. En esta investigación, también se encontró que la contaminación de las bolsas de leche UHT por *B. sporothermodurans* era prevalente. El crecimiento de este microorganismo en leche UHT alcanzó un máximo de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL.

Sin embargo, la actividad proteolítica significativa en la leche UHT, debida al microorganismo, solo ocurrió mucho después de que se había alcanzado la fase de crecimiento exponencial. Además, se concluyó que el crecimiento de *B. sporothermodurans* en la leche UHT, no condujo a cambios significativos en los perfiles volátiles del espacio de cabeza de las muestras de leche UHT. Pero, la actividad proteolítica en los paquetes de leche UHT contaminados con *B. sporothermodurans* fue significativamente mayor, cuando se alcanzaron las fechas de caducidad.

Complementariamente, otros dos estudios han demostrado que las esporas de *B. sporothermodurans* tienen la capacidad de germinar en productos UHT causando inestabilidad y reduciendo la vida útil del producto (Frederick T Tabit & Buys, 2011), de igual forma se ha reportado que estas esporas pueden desarrollarse durante el almacenamiento en productos UHT y crecer hasta los 10^5 UFC/mL, causando inestabilidad debido a su actividad proteolítica (Abouelnaga et al., 2016).

2.1.6 Calidad microbiológica de la leche UHT en Colombia

En Colombia, el Decreto 616 de 2006, por el cual “Se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendi, importe o exporte en el país”. Luego, en el Título II, Capítulo, I define: “Leche de temperatura ultra-alta-TUA (UHT) o leche de larga vida”, como: El producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche cruda o termizada, a una temperatura entre 135 °C a 150 °C y tiempos entre 2 y 4 segundos, de tal forma que se compruebe la destrucción eficaz de las esporas bacterianas resistentes al calor, seguido inmediatamente de enfriamiento rápido conocida como “evaporación flash”, para que por medio de un choque térmico severo, la leche llegue a temperatura ambiente, para posteriormente envasarla asépticamente en recipientes estériles con barreras a la luz y al oxígeno, los cuales son cerrados herméticamente para su posterior almacenamiento a temperatura ambiente, en un lugar seco y fresco Esta última acción se realiza, con el fin de que se asegure la esterilidad comercial sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y sensoriales, motivo por el cual, este tipo de leche UHT, puede ser comercializada a temperatura ambiente.

En Colombia se comercializan leches higienizadas de acuerdo con su contenido de grasa y su procesamiento. En el Capítulo V, artículo 15 del Decreto 616 de 2006, en el que se define la clasificación de las leches de acuerdo con su proceso de fabricación, estas pueden ser pasteurizadas, ultrapasteurizadas, aplicársele una temperatura ultra alta (TUA), lo que le extiende de vida útil a la leche líquida, esterilizada, en polvo y deslactosada respectivamente. En el artículo 19 del mismo documento se establecen los requisitos microbiológicos de la leche líquida. Se define que la leche líquida tratada térmicamente con una temperatura ultra alta (TUA), leche de larga vida, que debe cumplir con los siguientes requisitos microbiológicos: en la prueba de esterilidad comercial, “Después de incubar durante 10 días no presentar crecimiento microbiano a 55 °C y 35 °C”.

Debido a lo que se menciona anteriormente, el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, como parte de los procesos de Inspección, Vigilancia y Control, procesó un total de 330 muestras de leches TUA en el 2010; para el 2011 se analizaron 289 muestras de la misma clasificación, según procesamiento, para un total de 619 leches por este periodo de dos años.

De estas, 265 muestras, no cumplieron el requisito de prueba de esterilidad comercial “satisfactoria”; es decir, el 42,81 % tuvieron concepto de “no satisfactoria”, y la causa fue el “crecimiento aerobio y anaerobio positivo a 35 °C” (Sistema de Información del Laboratorio de Salud Pública) (Castañeda-Carrasquilla, 2015). Finalmente, se puede concluir que el “crecimiento aerobio y anaerobio positivo a 35 °C” en el resultado de la prueba de esterilidad comercial, aparece como la principal causa de no cumplimiento en las leches higienizadas. Esto, debido a la presencia de esporas resistentes a los procesos de ultrapasteurización (HHRS), como microorganismos del género *Bacillus*.

La literatura también menciona que los problemas de no esterilidad en las leches UHT son causados por recontaminación después del tratamiento de calentamiento (Klijn, Hermanb, et al., 1997). Cuando se verifica la esterilidad de los productos a través de mediciones de potenciales de óxido-reducción, con equipos de monitoreo de crecimiento bacteriano, estas no se detectan hasta niveles mayores a 10^5 UFC/mL; las esporas no producen alteraciones de estabilidad ni de calidad sensorial de la leche, no se ve afectado el pH y rara vez producen deterioro del producto (P Scheldeman et al., 2006). El grupo de bacterias mesófilas aerobias esporoformadoras extremadamente resistentes a los procesos de altas temperaturas, han sido detectados en muchos países de Europa y fuera de ella; algunos de estos esporoformadores pertenecen al género *Bacillus*, y se han clasificado como una nueva especie *B. sporothermodurans*; su principal característica es la de producir esporas resistentes a los ultracalentamientos (HHRS) (Guillaume-Gentil et al., 2002; Huemer, Klijn, Vogelsang, & Langeveld, 1999). Aunque las células vegetativas del *B. sporothermodurans* no son patógenas

y no causan deterioro visible, ni de sabor en los productos UHT, esta es considerada indeseable y por ello no permite el cumplimiento de los requisitos legales establecidos; así, “Después de incubar durante 10 días no debe presentar crecimiento microbiano a 35 °C y 55 °C” (Herman, Vaerewijck, Moermans, & Waes, 1997; Pettersson et al., 1996).

Estudios realizados por la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá en el 2015, reportaron que las muestras de leches UHT que ingresaron al Laboratorio de Salud Pública de Bogotá se utilizaron para análisis microbiológico, como parte de la vigilancia rutinaria realizada por el Hospital de Fontibón durante 2010 y 2011. Como resultado de la prueba de esterilidad comercial aplicada a las leches TUA, se recuperaron 36 cepas de muestras analizadas durante 2010-2011, a las que se les realizó la identificación bioquímica con la prueba BCL de Biomerieux, en el equipo Vitek® Systems. Los microorganismos recuperados morfológicamente correspondieron a bacilos grampositivos, pertenecientes al género *Bacillus*, así: *B. smitii*, 66.67 %; *B. sphaericus/fusiformis*, 8,33 %; *B. choshinensis* y *Geobacillus stearothermophilus*, 8,33 %. Esto permite concluir que no toda la contaminación de las leches UHT analizadas en Bogotá se debe a una sola especie de *Bacillus*; por tanto, no se debe enfocar únicamente en *B. sporothermodurans* (Castañeda-Carrasquilla, 2015).

2.1.7 Tratamientos térmicos para eliminación de bacterias en la leche y prolongar su vida útil

Desde tiempos inmemorables, la leche ha hecho parte vital de la alimentación humana y que por ello se han diseñado procesos para lograr su consumo masivo y seguro. Por su amplio contenido de nutrientes, la leche es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos, facilitando su contaminación. En los hatos lecheros, esta contaminación sucede porque a pesar de que la leche que es extraída de las glándulas mamarias de animales sanos es inicialmente estéril, los microorganismos pueden ingresar a la ubre a través de la abertura del conducto de

la tetina. Por esta razón, los cocos Gram positivos, estreptococos, micrococos, estafilococos, bacterias ácido-lácticas, *Pseudomonas* spp. y levaduras son los microorganismos que más frecuentemente se encuentran en la leche (Ledina, 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, la vulnerabilidad de los productos lácteos y su posible contaminación con microorganismos o toxinas patógenas es alta, entonces el monitoreo microbiológico en la industria láctea es una actividad vital para garantizar su consumo seguro (Ledina, 2021). Estudios han demostrado que las vacas enfermas pueden transferir en su leche patógenos como *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp (Ledina, 2021).

La leche es sometida a diversos tratamientos térmicos con el propósito de reducir las células vegetativas de microorganismos patógenos hasta alcanzar niveles seguros para el consumo humano, también estos tratamientos buscan extender su vida útil. El tratamiento más común y frecuentemente usado es la pasteurización. El tiempo y temperatura establecidos para la pasteurización varía en cada país, sin embargo, en general se maneja una temperatura de 60-65°C durante 30 minutos para un tratamiento de baja temperatura y tiempo prolongado; y una temperatura de 71.7-72°C por 15 segundos para un tratamiento de alta temperatura, tiempo corto (Ledina, 2021).

2.1.8 Uso de la BacT/Alert@ 3D como herramienta para la detección de contaminación y control de calidad

Por lo general, el control de calidad de productos UHT se realiza mediante el recuento de placas convencionales y medios de cultivo con una sensibilidad de 10-100 UFC/mL, estos son de bajo costo y proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre el número y la naturaleza de los microorganismos en la muestra analizada. No obstante, son laboriosos, requieren de mucho tiempo (entre 24 y 72

horas de detección, 10 días de pre-incubación, más una semana para la identificación de microorganismos patógenos) (Wang & Salazar, 2016; Zhao, Lin, Wang, & Oh, 2014).

Debido a este factor, se han propuesto varias soluciones de tecnologías comerciales para reducir el tiempo que toma la emisión de resultados posterior al análisis de los productos UHT (que puede durar hasta 10 días), así como para acortar el tiempo de incubación del producto. Estas nuevas tecnologías pueden ser validadas mediante una metodología cuantitativa (Bolzoni, Marcolini, Delle Donne, Appicciafuoco, & Ferrini, 2015) o semicuantitativa (Fernandes, Carey, Hynes, & Papkovsky, 2013), pero no hay un protocolo demostrado para la validación de métodos cualitativos para evaluar esterilidad comercial (Diep et al., 2019). Esto es debido a que las metodologías alternativas disponibles tienen procedimientos de prueba variable, lo que genera que pautas estandarizadas como ISO 16140-2 o AOAC, no sean aplicables (Diep et al., 2019). Atendiendo esta problemática, el estudio realizado por Diep et al. (2019) propone un protocolo de validación basado en la inclusión y el límite de detección LOD95 como criterio de evaluación del desempeño siete métodos (uno tradicional y 6 alternativos) utilizados para comprobar esterilidad comercial de diversos productos.

Dentro de los métodos alternativos previamente mencionados, se conocen tecnologías basadas en la detección del metabolismo celular durante el crecimiento microbiano (mediado por producción de CO₂), otras basadas en el recuento celular por citometría de flujo y otras en el monitoreo de actividad celular de ATP (Diep et al., 2019).

En concordancia con el párrafo anterior, el sistema BacT/ALERT® 3D es un método alternativo que permite el crecimiento microbiano en cámaras de incubación, usando sistemas informáticos de monitoreo de botellas que contienen un medio de cultivo (adecuado para el crecimiento de diversos microorganismos) y un sensor incorporado (Poghossian, Geissler, & Schöning, 2019). La muestra se debe

adicionar dentro de la botella y el sensor cumple la función de detectar ópticamente el cambio de pH en el medio de cultivo dentro la botella, debido a la generación de CO₂ o la formación de ácidos orgánicos (Li et al., 2017; Zhao et al., 2014). Adicionalmente, este equipo tiene un sistema de agitación que promueve el crecimiento bacteriano.

Existen estudios que respaldan el uso del equipo BacT/ALERT® 3D para el análisis de muestras clínicas asépticas, tales como la sangre. Estos a su vez, expresaron en su investigación que el equipo es útil para detección de contaminación en sangre. Los resultados obtenidos reflejan que dentro de sus ventajas está el escaneo del sensor ubicado en la base de la botella cada 10 minutos, lo que permite la detección rápida de contaminantes y para el caso clínico, logrando la ágil detección de bacteriemias o fungemias en pacientes clínicos. También explican, que al tratarse de una tecnología autónoma las muestras sufren menor manipulación, reduciendo su posible contaminación cruzada (Emeraud et al., 2021).

2.1.9 Métodos de cuantificación e identificación de *B. sporothermodurans*

La detección de *B. sporothermodurans* suele ser realizada utilizando la técnica de cultivo que incluye el uso de agar infusión de cerebro y corazón (BHI), después de calentar la muestra a 100°C durante 30 a 40 minutos. Además, diferentes métodos moleculares se han utilizado para identificar y caracterizar *B. sporothermodurans*; por ejemplo, por métodos convencionales de PCR utilizando cebadores específicos basados en el gen 16S rRNA que tiene regiones con alta variabilidad para identificar *B. sporothermodurans* (Abouelnaga et al., 2016). Del mismo modo, un ensayo de PCR convencional se modificó para incluir propidiomonoazida para detectar *B. sporothermodurans* (Cattani, Ferreira, & Oliveira, 2013).

Abouelnaga et al., (2016) plantearon en su investigación el desarrollo de un ensayo directo y preciso de Rti-PCR Taqman para la detección rápida cuantitativa y directa de *B. sporothermodurans* en leche UHT y leche cruda.

A partir de este estudio concluyeron que el ensayo es aplicable para el control de calidad de ambos tipos de leche y que este método permitió detectar presencia de *B. sporothermodurans* que la técnica convencional usando BHI no lograba evidenciar.

Arthur et al. (2021) recomiendan como el mejor método de selección de *B. sporothermodurans* la esterilización en autoclave de la muestra de leche cruda durante 5 minutos o su calentamiento 100°C durante 30-40 minutos y posteriormente sembrar en placas sobre BHI suplementado. La presencia de otros formadores de esporas potencialmente resistentes al calor aún no descritos en la leche cruda, también puede complicar la confirmación inequívoca de *B. sporothermodurans* (Alonso et al, 2021).

3 METODOLOGÍA

3.1.1 Recolección preliminar de muestras de leche cruda

Las muestras de leche cruda preliminares para este estudio fueron tomadas de los tanques de almacenamiento de leche cruda de Plantas de alimentos de Cundinamarca, Colombia.

Para tal fin, fueron recolectadas 3 muestras de 100mL (Figura 3), las cuales fueron transportadas refrigeradas hasta el laboratorio externo en cual se realizó la determinación cualitativa de *B. sporothermodurans*.



Figura 3. Muestras de leche cruda

Fuente: España, 2022

3.1.2 Aislamiento y recuento de esporas aerobias

El laboratorio externo seleccionado para este estudio fue Confía Control, el cual realizó el recuento de esporas aerobias tomando 10 mL de leche cruda en tubo de vidrio estéril, calentando la muestra a 80°C durante 10 minutos y luego enfriando en baño de hielo.

Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} en agua peptonada bufferada, y se sembraron las muestras en superficie, adicionando 0.1mL de muestra a cajas de Petri con agar BHI suplementado con vitamina B₁₂ a razón de 1mg/L (Bernier et al., 2012).

El medio de cultivo se llevó incubación a $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 días y luego se reportó la presencia o ausencia de colonias con morfología similar a *B. sporothermodurans* (Te Giffel et al., 2002).

Finalmente, se estableció el recuento de microorganismos HHRS en Confía Control buscando corroborar la posible presencia de *B. sporothermodurans* en las leches crudas de Cundinamarca.

3.1.3 Determinación la termorresistencia de HHRS en leche UHT

Para realizar la determinación preliminar de HHRS en productos comercialmente estériles en laboratorio externo, fueron recolectadas 16 muestras de leche UHT empacadas en las líneas asépticas de Plantas de Cundinamarca, Colombia.

Se realizó el método para evaluar la esterilidad comercial planteada en la NTC 4433 para determinar la presencia de HHRS en leche UHT. Para cada ensayo, se tomarán dos muestras de leche UHT una de ellas se llevará a incubación a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la otra a $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 10 días. Transcurrido este tiempo, se efectuará coloración de Gram y a cada muestra se le extraerán alícuotas de 2ml que serán agregadas a ocho tubos con 10ml de caldo BHI suplementado con almidón. Cuatro tubos serán incubados en condición de anaerobiosis y cuatro en aerobiosis, a una temperatura $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 días. Este mismo ejercicio se realizará para las muestras incubadas a $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Una vez culminada la segunda incubación se hará coloración de Gram de los 16 tubos y se realizará siembra en superficie en Agar BHI suplementado con vitamina B12 de los tubos que evidencien presencia de HHRS (Bernier, 2012). La prueba es considerada satisfactoria si se observa

ausencia de HHRS e insatisfactoria al observar presencia. La detección del microorganismo se realizó tomando dos muestras por lote durante los ciclos de producción de asépticos en planta, durante los meses de enero, marzo, mayo, julio, septiembre y octubre del 2021.

Transcurrido este tiempo se realizó la siembra de 1mL de muestra en Agar Plate Count y se llevó nuevamente a incubación bajo las temperaturas mencionadas, en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Luego de esta segunda incubación, fueron seleccionadas las colonias que presentaron crecimiento en Agar Plate Count incubado a una temperatura $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y cuya morfología microscópica al realizar tinción de Gram fuera bacilo largo Gram positivo, característica de *B. sporothermodurans* (Pinto et al., 2018) tal como lo muestra la figura 4.



Figura 4. Foto en laboratorio de la tinción de Gram de *B. sporothermodurans*.

Fuente: Pinto et al., 2018.

Una vez seleccionadas las cepas, se realizó aislamiento y verificación de la pureza nuevamente mediante tinción de Gram y microscopía y aleatoriamente fueron enviadas más de 30 cepas a identificación mediante la tecnología MALDI-TOF de equipo VITEK® MS (bioMérieux, Marcy-l' Etoile, France) (Eijlander et al., 2019), en laboratorio de Referencia de la Clínica del Rosario en Medellín, Colombia, el cual cuenta con acreditación ONAC para el desarrollo de este análisis. La totalidad de

las muestras sometidas a identificación arrojó la confirmación del *B. sporothermodurans* con un 99,9 % de confianza.

Para determinar el tiempo de germinación de esporas de *B. sporothermodurans* en leches UHT y otros productos lácteos asépticos utilizando la tecnología BacT/ALERT® 3D, fueron recolectadas muestras provenientes de hatos lecheros de Cundinamarca, Colombia.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados objetivo 1: Integrar los protocolos de BPM y Programa de Aprobación de Proveedores (PAP) utilizados en las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, para el sondeo de la inocuidad y calidad de la leche cruda.

Se realizaron visitas periódicas a los ganaderos de leche cruda de las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, para el sondeo de la inocuidad y calidad de la leche cruda, encontrando que se cumplen las buenas prácticas ganaderas (BPG) requeridas por la regulación sanitaria vigente, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es el organismo gubernamental que audita las BPG de forma periódica en los ganaderos. Todos los proveedores auditados cuentan con el certificado de BPG emitido por el ICA.

Dentro de los principios básicos para el control de riesgos de las BPG se evaluó que los proveedores cumplan con el plan de saneamiento y sanidad animal en los hatos lecheros y que las actividades productivas estén enmarcadas en condiciones de limpieza e higiene del sistema, encontrando conformidad en los resultados de los proveedores auditados.

Se evidenció que se realiza de forma periódica asistencia técnica por parte de las industrias lácteas a sus proveedores del campo en donde a través de capacitaciones y acompañamiento se fomenta la implementación de buenas prácticas en la producción, así como de ganadería sostenible libre de deforestación y de afectación a páramos. Por otro lado, existe evidencia suficiente para demostrar que las industrias lácteas auditadas por la autoridad sanitaria en Colombia INVIMA cuentan con buenas prácticas de manufactura (BPM).

Por su amplio contenido de nutrientes, la leche es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos, facilitando su contaminación. En los hatos

lecheros, esta contaminación sucede porque a pesar de que la leche que es extraída de las glándulas mamarias de animales sanos es inicialmente estéril, los microorganismos pueden ingresar a la ubre a través de la abertura del conducto de la tetina.

Por esta razón, los cocos Gram positivos, estreptococos, micrococos, estafilococos, bacterias ácido-lácticas, *Pseudomonas spp.* y levaduras son los microorganismos que más frecuentemente se encuentran en la leche (Ledina, 2021).

Según Nescier (2015), una de las principales causales de la leche contaminada con esporas, es el consumo de silaje o piensos contaminados por las vacas lecheras. Se han asociado alteraciones en la salud de los animales, cuando el alimento que consume el rodeo lechero contiene alta carga microbiana de esporas.

Las Tablas 1 y 2, expresan los recuentos de HHRS obtenidos a partir de la leche cruda, en los cuales se observan concentraciones desde 4,95 Log UFC/mL a 5,72 log UFC/mL. Investigaciones previas han demostrado presencia de HHRS en concentraciones desde 1 a 5 Log UFC/mL en pastos y ensilaje de maíz utilizado para alimentar ganado bovino (Te Giffel et al., 2002), lo que sugiere que este tipo de microorganismos inician su ruta de contaminación desde la alimentación bovina hasta llegar a la leche cruda (Te Giffel et al., 2002), concordando con las concentraciones de HHRS obtenidas en el presente estudio.

Tabla 1. Detección cualitativa de *B. sporothermodurans* en leche cruda proveniente de hatos lecheros de Cundinamarca, Colombia

Región	Muestra	Detección HHRS
Finca 1	1	Presente
Finca 2	1	Presente
Finca 3	1	Presente

Fuente: España, 2022

Tabla 2. Recuento de microorganismos HRS en leche cruda

Muestra	Recuento HRS (log UFC/mL)
Finca 1	4,95
Finca 2	5,17
Finca 3	5,72

Fuente: España, 2022

Estos datos confirman lo evidenciado en otras investigaciones, en las cuales las concentraciones de HRS en leche cruda se han evidenciado cerca de 1 log UFC/mL (Kmiha et al., 2017) o próximas a 3 log UFC/mL (Herman et al., 1997).

Lo anterior, permite sugerir que las concentraciones de microorganismos HRS pueden ser heterogéneas según el origen de la leche cruda y de las distintas regiones o países en donde se analice la leche cruda para su análisis.

Resultados objetivo 2: **Analizar la presencia de HRS en la leche cruda proveniente de las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, su correlación con las diferentes épocas estacionales del año, para la determinación de su prevalencia después de los tratamientos térmicos de ultra alta temperatura (UHT).**

El microorganismo esporulado termorresistente (HRS) más común presente en las leches del departamento de Cundinamarca, Colombia, fue identificado como *Bacillus spirothermodurans* a través del sistema de identificación microbiana que usa la tecnología de la matriz asistida con un tiempo de vuelo de ionización por desorción laser (MALDI-TOF por sus siglas en inglés) con el equipo VITEK® -MS de Biomerieux.

Durante este estudio se ha obtenido una prevalencia de HHRS en leche cruda oscilando entre 4,95-5,72 log UFC/mL, distinta la prevalencia calculada en leche UHT correspondiente a valores entre 2,11 log UFC/mL y 3,2 log UFC/mL, lo que permite sugerir que las reducciones logarítmicas de los HHRS derivadas por los tratamientos térmicos UHT aplicados son cercanas a 2 log UFC/mL. El porcentaje promedio de prevalencia de *B. sporothermodurans* presente en leche UHT proveniente de las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia fue de 54%

Las leches provenientes de las cuencas de Cundinamarca, Colombia, presentan mayor prevalencia 80% de *B. sporothermodurans* durante el mes de mayo, esto se debe a que, según lo reportado por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM), en esta época en Cundinamarca, predominan las bajas temperaturas y la precipitación lo cual favorece la disponibilidad de pasto como alimento principal del ganado y no el silaje que favorece la presencia de HHRS.

Teniendo en cuenta que los ciclos de producción en las plantas de alimentos son variables en función de la planeación y demanda del mercado, se lograron analizar 9946 provenientes de una planta de alimentos de Cundinamarca. Asimismo, según la variabilidad de las concentraciones observadas de *B. sporothermodurans* en las muestras analizadas, los datos fueron trabajados de forma cualitativa (presencia/ausencia del microorganismo) con el propósito de establecer la tendencia de este microorganismo en Cundinamarca.

La figura 5, muestra el porcentaje de prevalencia de *B. sporothermodurans* en cada región y en cada uno de los meses en los cuales se realizó la recolección de muestras.

El porcentaje de prevalencia más alto en las muestras analizadas en Cundinamarca fue de 79% en el mes de mayo. Todos estos datos permiten sugerir que la

prevalencia de *B. sporothermodurans* en leche UHT, puede variar en función de las épocas del año y se mantiene activa a lo largo de los meses. Coherentemente con estos resultados, en 2018 una investigación realizada en Sudáfrica reveló que 12 marcas de leche UHT nacionales presentaban sistemáticamente recuentos de *B. sporothermodurans* a lo largo de todo el periodo de muestreo (primavera, verano, otoño e invierno), y que a pesar de que el período de verano fue el que presentó los recuentos más altos; no se obtuvieron cambios significativos en los recuentos medios de todas las marcas en las diferentes temporadas (Tabit, 2018).

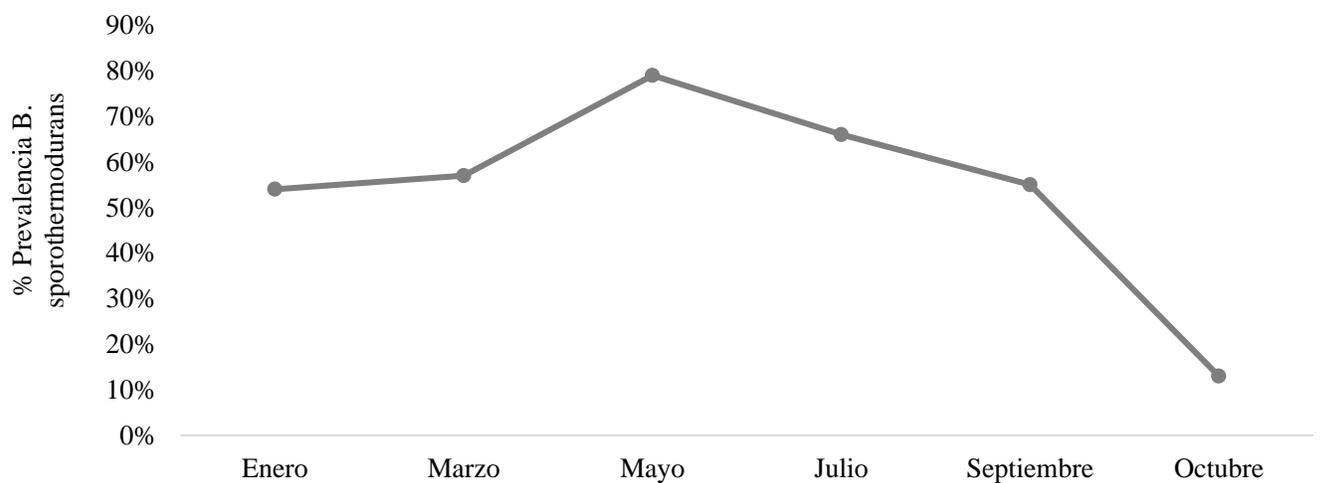


Figura 5. Porcentaje de prevalencia de *B. sporothermodurans* en leche UHT proveniente de cuencas lecheras de Cundinamarca, Colombia

Otra investigación demostró que los recuentos de esporas aeróbicas totales en la leche cruda están sujetos a variaciones estacionales, y generalmente se observa una mayor incidencia en el periodo invernal, cuando las vacas se alojan en interiores (Scheldeman et al., 2006). Este estudio nuevamente corrobora la hipótesis sobre la variabilidad de los HHRS en función de las épocas del año, tal como se evidenció en este estudio.

Los análisis de calidad de la leche UHT con presencia de HHRS, no presentaron ningún cambio sensorial a lo largo de su vida útil, se conservaron todas sus propiedades fisicoquímicas, sabor, olor y color.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Tabit. (2018), pues se evidenció que el crecimiento de *B. sporothermodurans* en la leche UHT no generó cambios significativos en el perfil sensorial y reportó que la leche UHT con *B. sporothermodurans* era prevalente, alcanzó un máximo crecimiento de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL. Estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores, que coinciden en que este microorganismo no tiene una patogenicidad demostrada y que no alteran la calidad de la leche, de tal manera que su presencia pasa desapercibida.

Un estudio de cepas de *B. sporothermodurans* aisladas en leches de Brasil, evidenciaron que existe el riesgo de una actividad proteolítica significativa que puede conducir al deterioro de la leche calidad de la leche UHT al final de su vida útil. El deterioro puede evidenciarse como ligeros cambios en el color y la desestabilización de las micelas de caseína (Pinto et al., 2008).

Si bien se conoce que el sector lácteo se enfrenta a un grave problema debido a la presencia de *B. sporothermodurans* en la leche UHT, ya que su presencia cataloga al producto como no satisfactorio (Norma NTC 4433) y conduce a su decomiso. Esto se traduce en pérdidas económicas para los productores de leche que son los más afectados. Las pérdidas en el sector lácteo por el decomiso y descarte de las leches consideradas no satisfactorias tienen un impacto económico en los productores de leche, que son conscientes que la presencia de este bacilo puede reducir la vida útil del producto, aunque el microorganismo es considerado como no patógeno para los seres humanos, se conoce por otros estudios que puede reducir la calidad de la leche debido a la supervivencia de las esporas al proceso de esterilización comercial. Frente a lo anterior se propone gestionar la prevalencia de los microorganismos esporulados termorresistentes en las leches del departamento de Cundinamarca Colombia a través de la integración de las buenas prácticas de

manufactura en las plantas procesadoras de lácteos y las buenas prácticas ganaderas, en donde se articulen los esfuerzos de mitigación del riesgo de contaminación cruzada y prevalencia de este tipo de microorganismos termorresistentes, algunas de las propuestas integrales son:

- Capacitar a los ganaderos de la región en buenas prácticas ganaderas para reducir la presencia de HHRS.
- Promover el cumplimiento de la regulación sanitarias vigentes exigida por el Ministerio de Salud en Colombia, para garantizar el cumplimiento de los controles preventivos en los hatos lecheros y en las plantas de productos alimenticios para garantizar que la leche destinada a los tratamientos térmicos UHT sea de alta calidad o grado A, como lo clasifica la ordenanza de leche pasteurizada (FDA, 2017).
- Realizar auditorías de inocuidad paródicas y recomendaciones a los proveedores de aprovisionamiento agropecuario (ganaderos), para asegurar el cumplimiento de los requisitos de inocuidad alimentaria, PAP y BPG a lo largo de toda la cadena de suministro.
- Buscar soluciones efectivas en conjunto con el sector de producción agropecuaria sobre las alternativas de alimentación animal adecuadas que no favorezcan la proliferación de bacterias HHRS, pues es conocido que estos microorganismos provienen de los silajes o forrajes durante algunas épocas en el año.
- Realizar una actualización tecnológica en la industria de lácteos en el país, que permitan la inactivación de las esporas provenientes de la leche cruda y que son un riesgo para la inocuidad alimentaria.
- Fomentar los controles preventivos de higiene y desinfección en las plantas procesadoras de alimentos para mitigar la formación de biopelículas en tuberías y equipos en contacto directo con los alimentos que puedan favorecer la prevalencia de HHRS y la contaminación cruzada con el producto terminado, la leche UHT.

5 CONCLUSIONES

Se concluye que:

- Al evaluar la prevalencia de microorganismos esporulados termorresistentes (HHRS) en las leches del departamento de Cundinamarca, Colombia, para la determinación de su posible impacto sobre la calidad de la leche UHT se logró concluir que si bien existe prevalencia del microorganismo *B. sporothermodurans* resistente al proceso térmico UHT presente en leches proveniente de las cuencas de Cundinamarca, Colombia, se confirmó lo reportado por la revisión bibliográfica que su presencia en productos terminados no altera la inocuidad y/o calidad de los lácteos.
- Se evidenció conformidad en el cumplimiento de los requisitos de buenas prácticas ganaderas en proveedores de leche cruda, así como el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura en la industria láctea, en los resultados conformes de las auditorías de BPM realizadas por INVIMA en Colombia y en las auditorías internas como parte del sistema de gestión de inocuidad alimentaria de las industrias, se debe continuar fortaleciendo los controles preventivos de higiene y desinfección para prevenir la contaminación cruzada y la formación de biopelículas de HHRS.
- Se deben seguir las propuestas de integración del sistema integrado de gestión de la inocuidad alimentaria con las BPM y Programas de Aprobación de Proveedores (PAP) en las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia mencionadas en este trabajo, con conjunto con la gestión del riesgo, basada en el ciclo planear, hacer, verificar y actuar (PHVA). Se concluye que la gestión del conocimiento brinda un aporte en el adecuado funcionamiento de la gestión de la calidad y las BPM y que también la gestión del riesgo es un facilitador para el cumplimiento de los objetivos organizacionales y de inocuidad, cuando es enfocada en los aspectos más críticos de la organización y de los procesos de fabricación. De esta manera se aumenta la seguridad y confianza de los alimentos.

- Se evidenció conformidad en el cumplimiento de los requisitos de buenas prácticas ganaderas en proveedores de leche cruda, así como el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura en la industria láctea. Según lo reportado, estos microorganismos provienen del silaje. Por lo cual es necesario controlar los factores de riesgo de contaminación del alimento con esporas termorresistentes y evaluar alternativas de alimentación animal que mitiguen la contaminación con HHRS en la leche cruda desde las cuencas lecheras.
- La presencia de esta bacteria termorresistente se ha convertido en un limitante para la industria láctea en Colombia, por el incumplimiento en de los requisitos de esterilidad comercial establecidos en la regulación nacional para los productos lácteos larga vida.

6 RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Generar un proyecto colaborativo y articulado en dónde se unan esfuerzos entre la academia, el gobierno y la industria para buscar tecnologías emergentes de esterilización como el vapor directo, que logren eliminar las esporas de estos microorganismos en la leche.
- Realizar estudios genéticos del *B. sporothermodurans* para identificar posibles genes que puedan generar patogenicidad a través de los alimentos para confirmar que no afecta la inocuidad alimentaria.
- Analizar en futuros estudios el alimento animal, para conocer los recuentos de *B. sporothermodurans* y confirmar su procedencia, como fuente potencial de contaminación.
- Continuar reforzando el nivel de capacitación de productores y operarios en el empleo de las buenas prácticas en relación con la tecnología empleada, durante la extracción y distribución del silaje a las vacas en producción de leche.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abouelnaga, M., Lamas, A., Miranda, J. M., Osman, M., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2016). Development of a real-time PCR assay for direct detection and quantification of *Bacillus sporothermodurans* in ultra-high temperature milk. *Journal of Dairy Science*, *99*(10), 7864-7871.
- Alonso, V. P. P., de Oliveira Morais, J., & Kabuki, D. Y. (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*, *354*, 109318.
- Arthur, V. (2021). Effect of irradiation in honey inoculated with *Bacillus sporothermodurans*. *Brazilian Journal of Radiation Sciences*, *9*(1A).
- Bernier, I., Cárdena, E., & Piñeros, O. (2012). *Bacillus sporothermodurans* anaeróbicos facultativos aislados de leches UHT elaboradas en Colombia. *Revista Alimentos Hoy*, *21*(27), 126–138.
- Bolzoni, G., Marcolini, A., Delle Donne, G., Appicciafuoco, B., & Ferrini, A. M. (2015). New National conversion line for Bactoscan FC in Italy: a step forward. *Italian Journal of Food Science*, *27*(2), 191-197.
- Bugno, A., Lira, R. S., Oliveira, W. A., Almodovar, A. A. B., Saes, D. P. S., & de Jesus Andreoli Pinto, T. (2015). Application of the BacT/ALERT 3D system for sterility testing of injectable products. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(3).
- Calderón, A., García, F., & Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, *11*.
- Castañeda-Carrasquilla, S. L. (2015). Caracterización de la microbiota de leche ultra alta temperatura (UAT, UHT) analizada en Bogotá. *Investig. segur. soc. salud*, *37*-43.
- Diep, B., Moulin, J., Bastic-Schmid, V., Putallaz, T., Gimonet, J., Valles, A. D., & Klijn, A. (2019). Validation protocol for commercial sterility testing methods. *Food Control*, *103*, 1–8.
- Emeraud, C., Yilmaz, S., Fortineau, N., Cuzon, G., & Dortet, L. (2021). Quality indicators for blood culture: 1 year of monitoring with BacT/Alert Virtuo at a

- French hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 70(3).
- Fernandes, R., Carey, C., Hynes, J., & Papkovsky, D. (2013). GreenLight™ model 960. *Journal of AOAC International*, 96(2), 369-385.
- Fellows, P. J. (2018). Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas.
- Fysun, O., Kern, H., Wilke, B., & Langowski, H.-C. (2019). Evaluation of factors influencing dairy biofilm formation in filling hoses of food-processing equipment. *Food and Bioproducts Processing*, 113, 39–48.
- Fontalvo, J. C. B., Martínez, T. S. F., Corrales, A., & Herazo, J. C. M. (2021). Revisión de las tecnologías emergentes en el envase y procesamiento de alimentos agroindustriales. *Boletín de Innovación, Logística y Operaciones*, 3(2).
- Hiroshi, H., Guemra, S., Bosso, A., de Pádua, É., & Rodrigo Ito, L. (2020). Reducción de proteínas y glucosa por reacción de Maillard en leche con lactosa hidrolisada. *Revista chilena de nutrición*, 47(1), 14-21.
- Ledina, T., Djordjevic, J., & Bulajic, S. (2021, October). Spore-forming bacteria in the dairy chain. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 854, No. 1, p. 012051). IOP Publishing.
- Mancilla Cohaila, A. M. (2019). Esterilización comercial y su efecto en la calidad fisicoquímica, sensorial y microbiológica de conservas de picante a la tacneña.
- Nescier, I., Ramos, E., De María, M., Bonzi, E., Bonvin, C., & Thomas, J. (2015). Vías de contaminación de la leche con esporas generadoras de gas butírico (*Clostridium*) a partir del silaje consumido por las vacas lecheras.
- Owusu-darko, R., Allam, M., Oliveira, S. D. De, Ferreira, C. A. S., Grover, S., & Mtshali, S. (2019). crossm Genome Sequences of *Bacillus sporothermodurans* Strains. (May), 6–8.
- Pinto, C. L. O., Souza, L. V., Meloni, V. A. S., Batista, C. S., Silva, R., Martins, E. M. F., Cruz, A. G., & Martins, M. L. (2018). Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 20–26. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12339>
- Poghossian, A., Geissler, H., & Schöning, M. J. (2019). Rapid methods and sensors

for milk quality monitoring and spoilage detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 140, 111272.

Santillán, V. P. (2021). Determinación de la vida de anaquel de leche ultra pasteurizada basada en parámetros de calidad de la leche cruda.

Shemesh, M., & Ostrov, I. (2020). Role of Bacillus species in biofilm persistence and emerging antibiofilm strategies in the dairy industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2327-2336.

Tabit, F. T. (2018). Prevalence and growth characteristics of Bacillus sporothermodurans in UHT milk. *British Food Journal*, 120(10), 2250–2260. <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2018-0126>

8 ANEXOS

Anexo 1: ACTA (CHARTER) DEL PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN (PFG)

Nombre y apellidos: María Daniela España Gutiérrez

Lugar de residencia: Bogotá, Colombia

Institución: Universidad para la Cooperación Internacional (UCI)

Cargo / puesto: **Maestrante**

Información principal y autorización del PFG	
Fecha: 12/02/2022	Nombre del proyecto: PROPUESTA DE GESTIÓN DE LA PREVALENCIA DE MICROORGANISMOS ESPORULADOS TERMORRESISTENTES EN LAS LECHE DEL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA COLOMBIA Y SU POSIBLE IMPACTO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE UHT.
Fecha de inicio del proyecto: febrero 2022	Fecha tentativa de finalización: junio 2022
Tipo de PFG: (tesina / artículo): Tesina	
Objetivos del proyecto (general y específicos)	
General: Evaluar la prevalencia de microorganismos esporulados termorresistentes (HRS) en las leches del departamento de Cundinamarca, Colombia, para la determinación de su posible impacto sobre la calidad de la leche UHT.	
Específicos: 1. Integrar los protocolos de BPM y Programa de Aprobación de Proveedores (PAP) utilizados en las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, para el sondeo de la inocuidad y calidad de la leche cruda. 2. Analizar la presencia de HRS en la leche cruda proveniente de las cuencas lecheras del departamento de Cundinamarca, Colombia, su correlación con las diferentes épocas estacionales del año, para la determinación de su prevalencia después de los tratamientos térmicos de ultra alta temperatura (UHT).	
Necesidad del Proyecto: La presencia de esporas altamente resistentes al calor de <i>Bacillus sporethermodurans</i> en leche sometida a tratamientos de ultra-alta temperatura (UHT por sus siglas en inglés) se ha convertido en un problema importante en la industria láctea. Las bacterias termorresistentes (HRS por sus siglas en inglés)", aparecen en muestras de leche UHT, sobre todo si el método de tratamiento térmico es indirecto (intercambiador de calor). Varios autores han reportado que su presencia en los productos, no representan un riesgo para la salud del consumidor y se asume que no alteran la calidad de la leche, de tal manera que su presencia pasa desapercibida. Sin embargo, existen pocas evidencias acerca de su impacto sobre el deterioro de la calidad de la leche UHT y otros productos lácteos asépticos y de baja acidez a lo largo de su vida útil comercial. En los últimos años, las leches UHT definidas en el Decreto 616 de 2006, analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de Colombia, han venido presentando resultados no satisfactorios respecto a la prueba de esterilidad comercial (PEC), debido a que se han detectado microorganismos productores de esporas altamente resistentes a los tratamientos de UHT. A nivel mundial, se reporta como principal causante de esta clase de contaminación al <i>B. sporethermodurans</i> . La presencia de este microorganismo en las leches colombianas se considera	

indeseable, puesto que impide el cumplimiento de los requisitos de esterilidad comercial establecidos en la regulación nacional. Las leches clasificadas como no satisfactorias son decomisadas y descartadas por las autoridades sanitarias; lo anterior genera un impacto económico y reputacional negativo para todas las industrias procesadoras de lácteos en el país. Con este proyecto de investigación científica se busca evaluar la prevalencia HHRS en las leches de Colombia y su posible impacto sobre la calidad de la leche UHT.

Justificación de impacto del proyecto: Con este proyecto de investigación científica se busca generar un nuevo conocimiento sobre el posible impacto en el deterioro de la calidad de la leche UHT y otros productos lácteos asépticos, así como el efecto que tienen las épocas estacionales del año y las diferentes regiones del país sobre la presencia de HHRS y su prevalencia después de los procesos térmicos UHT. Se espera con este estudio aportar conocimientos que generen futuras soluciones a la problemática recurrente del incumplimiento sanitario que afecta a la industria láctea a nivel nacional, así como generar información útil para las investigaciones administrativas que realizan las entidades de salud pública y la autoridad sanitaria del país

Restricciones: Teniendo en cuenta que los HHRS pueden encontrarse en la leche cruda y sobrevivir al tratamiento UHT, es posible encontrar microorganismos distintos a *B. sporothermodurans* y otros HHRS en las muestras analizadas, cuya presencia dificulte el aislamiento e identificación del microorganismo de interés. Para mitigar este riesgo se empleará personal altamente competente en el manejo de muestras microbiológicas de origen lácteo, se realizarán los controles de laboratorio pertinentes y medidas que aseguren la pureza y viabilidad de la cepa de *B. sporothermodurans* a trabajar.

Entregables:

- Avances periódicos del desarrollo del PFG al tutor (a).
- Entrega del documento aprobado al lector (a) para su revisión y para su posterior aprobación y calificación.
- Tribunal evaluador (tutor (a) y lector(a), entregan calificación promediada.

Identificación de grupos de interés:

Directo (s): Empresa de lácteos, Asociación del sector lácteo, gobierno, ministerio de salud pública, INVIMA.

Indirecto (s): Industrias de lácteos en Colombia, Gobierno de Colombia.

Aprobado por director MIA: Félix Modesto Cañet Prades. PhD	Firma:
Aprobado por profesora Seminario Graduación: MIA. Ana Cecilia Segreda Rodríguez	Firma:
Maestrante: María Daniela España Gutiérrez	Firma