



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Proyecto de Investigación
previo a la obtención del título
de ingeniero en Alimentos

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO
PARA LA OBTENCIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA
“PAPA JUAN” SITUADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA
DE MANABÍ.

AUTOR:

MIGUEL ÁNGEL CARRIÓN GONZÁLEZ

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

ING. ZOOT. ORLY CEVALLOS FALQUEZ MSC

QUEVEDO – ECUADOR

2016

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Miguel Ángel Carrión González** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Miguel Ángel Carrión González
C.C. 094080279-6
AUTOR

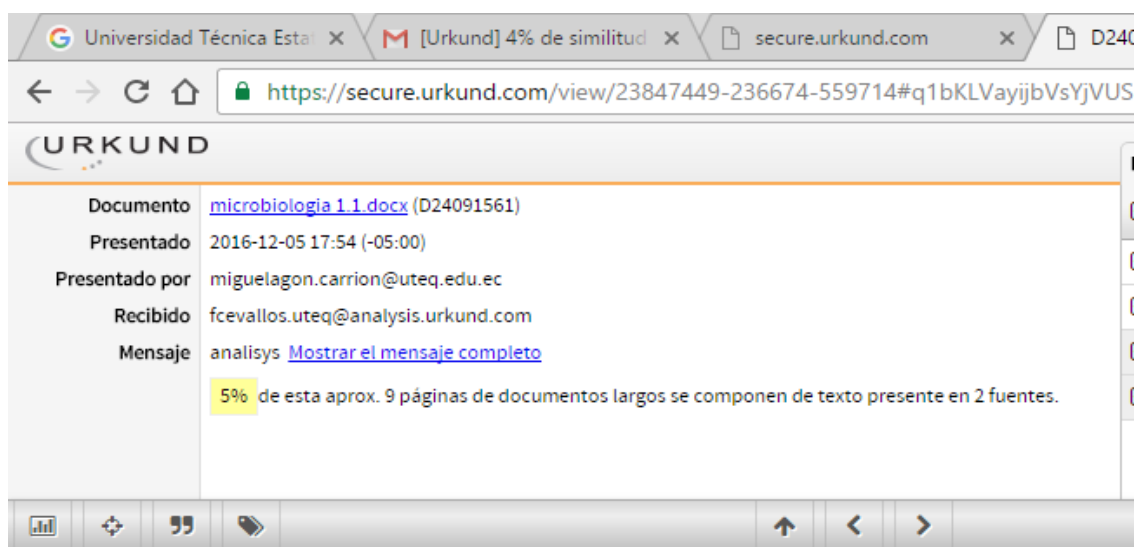
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

El suscrito, Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc. Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **Miguel Ángel Carrión González**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, **“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA “PAPA JUAN” SITUADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA DE MANABÍ.”** previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, El suscrito, **Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc.**, en calidad de Director del Proyecto de Investigación de Grado “**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA “PAPA JUAN” SITUADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA DE MANABÍ.**”, de autoría del estudiante **Miguel Ángel Carrión González**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 5% el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA “PAPA JUAN” SITUADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA DE MANABÍ.”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Raúl Díaz Ocampo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Ángel Fernández.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Verónica Puente

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2016 – 2017

AGRADECIMIENTO

A mi Dios por bendecirme y darme la Sabiduría e inteligencia para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A la Decana de la Facultad de Ciencias Pecuarias Dra. Yenny Torres por su colaboración y comprensión en todo momento.

A mi Director de tesis, Ing. Orly Cevallos por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis.

Al ing. Raúl Díaz le agradezco por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su tiempo, amistad y por los conocimientos transmitidos.

A los Ing. Ángel Fernández y Verónica Puente por sus importantes aportes brindados a este proyecto de investigación.

A los Ing. Jaime Vera Chang, Wistong Morales, Cristhian Vallejo, German Jácome, Franklin Peláez, Martin Gonzalez, Edgar Pinargote, Ítalo Espinoza, etc. Influyendo con sus lecciones y experiencias en mi proceso como estudiante.

A mis queridos compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante 5 años de convivir dentro y fuera del salón de clase. Omar, Adrián, Israel, Rossy, Karla, Luigin, Laura.

Gracias también a la señorita Yuni Carreño, por su compañía y colaboración, en el proceso legal de mi proyecto de investigación,

DEDICATORIA

A mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres Ángel Carrión y Diana González por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar.

Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi prometida María Coronel, por su aporte durante el proceso de este proyecto de investigación, sabiendo motivarme, quien con su apoyo incondicional me dio lo necesario a la hora de tomar decisiones en mi vida, por su paciencia en los momentos fáciles y difíciles.

RESUMEN

Se planteó una investigación cuyo objetivo fue evaluar la calidad microbiológica de las diferentes etapas del proceso de Elaboración, para el control de la calidad microbiológica se aplicó las normas NTE INEN 1528:2012, se identificó en qué etapa del proceso existen riesgos de contaminación que afectan al producto elaborado realizando los análisis microbiológicos que indican las normas como son; *moho* y *levaduras*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella*. Las muestras evaluadas fueron: a) leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y queso b) agua usada para limpieza de materiales y equipos c) equipos utilizados al inicio del proceso y al final después de la limpieza d) manos de los operarios al inicio y al final de la elaboración. Se evidenció que aunque el proceso térmico de pasteurización es efectivo para destruir la carga microbiana patógena de la leche cruda, existen deficientes prácticas de fabricación en el proceso de elaboración del queso, así como en los procedimientos de higiene, saneamiento en planta y operarios, el análisis estadístico implementado fue la T de Student donde se realizó los análisis microbiológicos de cinco muestras de leche cruda receptada y cinco muestras de queso ya almacenadas, en los valores de *moho*, *Coliformes Totales*, *E. Coli* y *Salmonella* no existe diferencia estadística significativa alguna, mientras que los valores de *Levaduras* indicaron diferencia estadística significativa $p \leq 0.05$ con respecto a los valores de leche cruda, donde hubo una disminución significativa al momento de la pasteurización, y los valores de *Staphylococcus Aureus* indicaron diferencia altamente Significativa $p \leq 0.01$ con respecto a los valores obtenidos en la leche cruda, donde se comprobó estadísticamente, que los recuentos promedios disminuyeron significativamente después del proceso de pasteurización.

Palabras Clave: Análisis Microbiológico, T de Student, *moho* y *levaduras*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

ABSTRACT

An investigation was proposed whose objective was to evaluate the microbiological quality of the different stages of the Elaboration process, for the control of the microbiological quality was applied the standards NTE INEN 1528: 2012, it was identified at what stage of the process there are risks of contamination that affect the product Elaborated by carrying out the microbiological analyzes that indicate the norms as they are; *Mold and yeast*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella*. The samples evaluated were: a) raw milk, pasteurized milk, curd and cheese b) water used for cleaning materials and equipment c) equipment used at the beginning of the process and at the end after cleaning d) hands of the operators at the beginning and At the end of processing. It was evidenced that although the thermal process of pasteurization is effective to destroy the pathogenic microbial load of the raw milk, there are deficient manufacturing practices in the cheese processing process, as well as in the hygiene and sanitation procedures in plant and workers, the Was performed in the Student 's t test where the microbiological analyzes of five samples of raw milk and five cheese samples were carried out. In the values of mold, Coliform Total, *E. Coli* and *Salmonella* there was no significant statistical difference, While Yeast values indicated a significant statistical difference $p \leq 0.05$ with respect to raw milk values, where there was a significant decrease at the moment of pasteurization, and *Staphylococcus Aureus* values indicated a highly significant difference $p \leq 0.01$ with respect to the Values obtained in raw milk, where it was statistically verified, that the average counts decreased significantly after the pasteurisation process.

Key Words: Microbiological Analysis, Student's T, *Mold and Yeast*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

Contenido

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.	iii
CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
CÓDIGO DUBLIN.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I	3
1. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de la investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.	4
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.	5
1.2.1. Objetivo general.	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. Justificación.....	6
1.4. Hipótesis.....	6
CAPITULO II.....	7
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.1. Marco conceptual.	8
Queso fresco.....	8
Enfermedades transmitidas por alimentos.....	8
Enfermedades transmitidas por quesos.	8
Calidad Microbiológica.....	9
2.2. Marco Referencial.	9
2.2.1. Producción de leche en el ecuador.	9
2.2.2. Producción lechera en la provincia de Manabí.....	9
2.2.3. Producción lechera y quesera en el cantón Flavio Alfaro.	10
2.2.4. Instalaciones para la producción de queso fresco.....	10
2.2.5. Características de la leche destinada a la elaboración de queso.	11
2.2.6. Valor nutricional del queso fresco.....	12

2.2.7.	Principales patógenos encontrados en los quesos artesanales.	13
2.2.7.1.	<i>Escherichia coli</i>	13
2.2.7.2.	<i>Staphylococcus Aureus</i>	13
2.2.7.3.	<i>Salmonella spp.</i>	14
2.2.7.4.	<i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.3.	Marco Legal.	15
2.3.1.	Norma Codex para el Queso.	15
2.3.2.	Instituto ecuatoriano de normalización (INEN).	16
2.3.2.1.	NTE 1528 (2012) Norma general para quesos frescos no maduros.	16
2.3.2.2.	Requisitos microbiológicos.	17
CAPÍTULO III.....		19
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		19
3.1.	Localización.	20
3.2.	Tipo de investigación.	20
3.3.	Método de investigación.	20
3.4.	Instrumentos de la investigación.	21
3.5.	Recursos humanos y materiales.	21
3.5.1.	Recursos humanos.	21
3.5.2.	Recursos de laboratorio.	21
3.5.3.	Recursos Biológicos.	21
3.5.4.	Recursos Químicos.	21
3.6.	Muestreo.	22
3.7.	Evaluación microbiológica.	22
3.7.1.	Determinación de <i>Salmonella spp.</i> (NTE INEN 1529-15:2009).	23
3.7.2.	Determinación de coliformes <i>Totales</i> y <i>E. Coli</i> (NTE INEN 1529- 8).	24
3.7.3.	Detección de recuento <i>Staphylococcus Aureus</i> . (NTE INEN 1529-14:98).	25
3.7.4.	Detección de recuento de <i>mohos y levaduras</i> (NTE INEN 1529-10:98).	25
3.8.	Análisis estadístico.	26
CAPITULO IV.....		27
4. RESULTADOS Y DISCUSION		27
4.1.	Diagnóstico de la planta de Procesos “PAPA JUAN”	28
4.1.1.	Maquinarias e instalaciones.	28
4.1.2.	Higiene y saneamiento de utensilios, equipos, pisos y personal.	28
4.1.3.	Productos tóxicos	29
4.2.	Diagnóstico de sistema de producción actual de la Planta Procesadora “Papa Juan”.	29
1.1.	Diagrama de Flujo del Queso Fresco de la planta “Papa Juan”.	31
1.2.	Características Microbiológicas de las Muestras Analizadas de la Planta “Papa Juan” ...	32

1.2.1.	Resultados del Conteo del microorganismo <i>coliformes Totales</i> en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.....	32
1.2.2.	Resultados de la Determinación de <i>E. Coli</i> en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	33
1.2.3.	Resultados de la Determinación de moho en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	34
1.2.4.	Resultados de la Determinación de levadura en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	35
1.2.5.	Resultados de la Determinación de <i>Staphylococcus Aureus</i> en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.....	36
1.2.6.	Resultados de la Determinación de <i>Salmonella</i> spp. en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.....	37
1.2.7.	Prueba estadística T de Student.....	38
CAPITULO V		39
2. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		39
2.1.	Conclusiones.	40
2.2.	Recomendaciones.....	41
CAPÍTULO VI		42
3. BIBLIOGRAFÍA		42
CAPITULO VI		47
ANEXOS		47

Contenido de Tabla

Tabla 1. Composición nutricional del queso fresco.	12
Tabla 2. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	17
Tabla 3. Medios de cultivos a utilizar para los análisis microbiológicos.	18
Tabla 4. Microorganismo coliformes Totales en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	32
Tabla 5. Recuento de <i>E. Coli</i> en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016	33
Tabla 6. Recuento de moho en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	34
Tabla 7. Recuento de levadura en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	35
Tabla 8. Recuento de <i>Staphylococcus Aureus</i> en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	36
Tabla 9. Recuento de <i>Salmonella</i> spp. en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.	37
Tabla 10. T de Student y Promedios de los valores obtenidos de leche Cruda y Quesos. .	38

Contenido de Figuras

Figura 1. Flujo de Proceso del Queso Fresco empleado en la planta Procesadora “Papa Juan”. 31

Tabla de Anexos

Anexo 1. Diseño estadístico T de Student de los diferentes parámetros como son <i>Moho</i> y <i>levaduras</i> , <i>Coliformes</i> , <i>Staphylococcus Aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	48
Anexo 2. Recolección De Muestra de la Tina.....	51
Anexo 3. Recolección de Leche receptada.....	51
Anexo 4. Recolección de Leche receptada.....	51
Anexo 5. Recolección de muestra de la Lira.....	51
Anexo 6. Recolección de muestra de la Pala.....	51
Anexo 7. Recolección de muestra de la pala.....	51
Anexo 8. Recolección de muestra de la moldes.....	51
Anexo 9. Cuajada con Suero.	51
Anexo 10. Esterilización de agar y materiales de uso.	52
Anexo 11. Placas incubadas con crecimiento de levadura.....	52
Anexo 12. Placas conteo de Placas con Crecimiento de colonias.....	52
Anexo 13. Preparación de Caldo BGBL (Brilliant Green Bilis Lactosa).	52
Anexo 14. Preparación de EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar)	52
Anexo 15. Muestras en Caldo BGBL (Brilliant Green Bilis Lactosa) para la identificación de Coliformes Totales.....	52
Anexo 16. Reconocimiento de las Placas para de <i>E. coli</i>	53
Anexo 17. Normas Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1528.2012 norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos	54
Anexo 18. Normas Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:99 Toma, Envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.	58

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Evaluación Microbiológica de las diferentes etapas del Proceso para la obtención de queso Fresco en la Planta Procesadora “Papa Juan” situada en el Cantón “Flavio Alfaro” de la Provincia de Manabí.		
Autor:	Carrión González Miguel Ángel		
Palabras clave:	<i>moho y levaduras</i>	T de Student	<i>Staphylococcus Aureus</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	Análisis microbiológico
Fecha de Publicación:			
Editorial:			
Resumen	RESUMEN.- Se planteó una investigación cuyo objetivo fue evaluar la calidad microbiológica de las diferentes etapas del proceso de Elaboración, para el control de la calidad microbiológica se aplicó las normas NTE INEN 1528:2012, se identificó en qué etapa del proceso existen riesgos de contaminación que afectan al producto elaborado realizando los análisis microbiológicos que indican las normas como son; <i>moho y levaduras</i>, <i>Staphylococcus Aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i>. Las muestras evaluadas fueron: a) leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y queso b) agua usada para limpieza de materiales y equipos c) equipos utilizados al inicio del proceso y al final después de la limpieza d) manos de los operarios al inicio y al final de la elaboración. Se evidenció que aunque el proceso térmico de pasteurización es efectivo para destruir la carga microbiana patógena de la leche cruda, existen deficientes prácticas de fabricación en el proceso de elaboración del queso, así como en los procedimientos de higiene y saneamiento en planta y operarios, el análisis estadístico implementado fue la T de Student donde se realizó los análisis microbiológicos de cinco muestras de leche cruda receptada y cinco muestras de queso ya almacenadas, en los valores de <i>moho</i>, <i>Coliformes Totales</i>, <i>E. Coli</i> y <i>Salmonella</i> no existe diferencia estadística significativa alguna, mientras que los valores de <i>Levaduras</i> indicaron diferencia		

estadística significativa $p \leq 0.05$ con respecto a los valores de leche cruda, donde hubo una disminución significativa al momento de la pasteurización, y los valores de *Staphylococcus Aureus* indicaron diferencia altamente Significativa $p \leq 0.01$ con respecto a los valores obtenidos en la leche cruda, donde se comprobó estadísticamente, que los recuentos promedios disminuyeron significativamente después del proceso de pasteurización.

ABSTRACT An investigation was proposed whose objective was to evaluate the microbiological quality of the different stages of the Elaboration process, for the control of the microbiological quality was applied the standards NTE INEN 1528, it was identified at what stage of the process there are risks of contamination that affect the product Elaborated by carrying out the microbiological analyzes that indicate the norms as they are; Mold and yeast, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella*. The samples evaluated were: a) raw milk, pasteurized milk, curd and cheese b) water used for cleaning materials and equipment c) equipment used at the beginning of the process and at the end after cleaning d) hands of the operators at the beginning and At the end of processing. It was evidenced that although the thermal process of pasteurization is effective to destroy the pathogenic microbial load of the raw milk, there are deficient manufacturing practices in the cheese processing process, as well as in the hygiene and sanitation procedures in plant and workers, the Was performed in the Student 's t test where the microbiological analyzes of five samples of raw milk and five cheese samples were carried out. In the values of mold, Coliform Total, *E. Coli* and *Salmonella* there was no significant statistical difference, While Yeast values indicated a significant statistical difference $p \leq 0.05$ with respect to raw

	milk values, where there was a significant decrease at the moment of pasteurization, and <i>Staphylococcus Aureus</i> values indicated a highly significant difference $p \leq 0.01$ with respect to the Values obtained in raw milk, where it was statistically verified, that the average counts decreased significantly after the pasteurisation process.
Descripción	hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URI:	

INTRODUCCIÓN

El queso fresco es un producto elaborado con leche entera, es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura firme, tenuemente granular, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos, habitualmente sin cultivos lácticos. Distinguido también con el nombre de queso blanco (1).

La contaminación de quesos frescos se puede dar por factores como higiene del personal que labora en el proceso, la selección, recepción y almacenamiento de la materia prima, problemas en los procesos térmicos de eliminación de patógenos, contaminación cruzada, manejo del producto sin protección, uso de utensilios contaminados, temperaturas incorrectas de almacenamiento del producto terminado (2).

Las Enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcus Aureus*) tienen origen frecuente de una cifra elevada de brotes de toxiinfección alimentaria. Las sintomatologías características de la intoxicación estafilocócica son náuseas, vómitos, dolores gástricos y abdominales y ocurren de manera rápida, de una a 6 horas tras el consumo del alimento contaminado (3).

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de la toxina Shiga forman un grupo de importancia entre el conjunto de patógenos emergentes ocasionados por alimentos. En los seres humanos estas bacterias se coligan con un amplio espectro de expresiones clínicas, que varía desde diarrea leve y auto-limitada hasta procesos más graves, frecuentemente con secuelas graves, como colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (4).

La presencia de *Coliformes* totales en quesos se da probablemente a las malas prácticas de manipulación en el ordeño del ganado vacuno, en las fincas productoras de la leche con la que los artesanos obtienen el queso, y/o a un almacenamiento inadecuado de la misma, además a una mala higienización de los equipos e instrumentos utilizados en la elaboración, transporte y mercadeo del queso. Estos niveles de contaminación, directa o indirectamente son de origen fecal, forman un peligro potencial de contaminación con otros patógenos entéricos (5).

Los elaborados lácteos modelan en un puesto de importancia como agentes transmisores de *salmonella*, en los últimos años se han representado muchos casos de salmonelosis humana a causa de ingesta de queso contaminado. La aparición de *salmonella* en queso habitualmente se da por una contaminación post – pasteurización. Asimismo es viable que

el origen de contaminación sea concisamente el ganado debido a que las vacas al padecer salmonelosis, tuberculosis o brucelosis podrían transmitir la bacteria a la leche (6).

Las enfermedades transferidas por alimentos, son consecuencia de una extensa diversidad de elaborados comestibles contaminados por microorganismos patógenos, toxinas o sustancias químicas. La prevención de las enfermedades de transmisión alimentaria depende de la manipulación cuidadosa de los elaborados crudos y de los elaborados terminados en la cadena de producción. Una óptima calidad y supervisión de los alimentos, se convierte en un ahorro de importancia de costos sociales, individuales de los consumidores y de los dueños de las industrias que los producen (7).

Por todo lo expuesto esta investigación se considera importante, ya que favorecerá a la empresa productora “Papa Juan”, señalando los posibles puntos críticos de control de contaminación o multiplicación microbiana, así obteniendo seguridad higiénica del alimento.

CAPITULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

La planta procesadora de queso fresco “Papa Juan” es una micro empresa que tiene un producto de buena aceptación en el mercado, se procesan alrededor de 5000 litros/día, y sus quesos son destinados a diferentes zonas de la Provincia de Manabí, sin embargo existen problemas de preservación del producto, esta planta carece de sistemas de control de calidad físicos, químicos, microbiológicos y no se rige ningún sistema de aseguramiento de la calidad sanitaria alimenticia, se considera necesario indagar mediante análisis microbiológicos en las diferentes etapas del proceso, que permitan conocer en qué etapa existe una posible contaminación, y que carga microbiológica de patógenos más comunes presenta este producto alimenticio que afectan a su conservación.

- **Diagnóstico.**

La planta procesadora “Papa Juan” del cantón Flavio Alfaro posee una baja producción de queso fresco, por lo que cuentan con un sistema de producción que no favorece la preservación de sus características fisiológicas como microbiológicas.

- **Pronóstico.**

Con una deficiencia sanitaria de la planta se podría obtener intoxicaciones de individuos por consumir alimentos con microorganismos patógenos, llegando a un posible cierre de la planta productora.

1.1.2. Formulación del problema.

¿En qué etapa del proceso de elaboración del queso fresco, existirá riesgos de contaminación microbiológicas que afecte a la vida útil del producto y a la salud de los consumidores?

1.1.3. Sistematización del problema.

¿De qué forma un sistema de producción como el de la planta “Papa Juan” interviene en la vida útil del producto?

¿Los microorganismos patógenos en los quesos frescos pueden afectar la salud de los consumidores?

¿Cómo influye la técnica o el proceso utilizado en la elaboración de un producto alimenticio para obtener un producto inocuo y de calidad?

1.2.Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

Evaluar la carga microbiológica Patógena y no Patógena de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso fresco en una planta procesadora situada en el cantón “Flavio Alfaro” de la provincia de Manabí.

1.2.2. Objetivos específicos.

- Analizar las condiciones microbiológicas en diferentes etapas del proceso de elaboración.
- Realizar análisis microbiológicos en todas las etapas del proceso del Queso fresco.
- Identificar en qué etapa del proceso existen riesgos de contaminación que afecta al producto elaborado.
- Comparar los resultados obtenidos con las normas establecidas para este producto.

1.3. Justificación.

El queso fresco manaba es un producto altamente consumido por la población ecuatoriana, el cantón Flavio Alfaro se caracteriza por ser una zona de productora de leche, por lo tanto, existe producción de queso fresco, que es destinada a diferentes lugares del país.

Las condiciones sanitarias que poseen los productores en Flavio Alfaro impiden que se oferte un producto que asegure la calidad y la buena salud para los consumidores, por tal motivo es necesario indagar e investigar la calidad microbiológica del queso en diferentes etapas de producción.

Esta investigación ayudará a conocer a los productores las etapas Críticas de Control, fuentes de contaminación microbiológica, que disminuye su vida útil, cambios en sus condiciones físicas y afecte a la salud del consumidor, para así evitarla y tener como resultado un alimento inocuo y duradero.

1.4. Hipótesis.

H0.- los quesos frescos elaborados en la planta “Papa Juan”, no presentan malos patógenos que afecten a la salud del consumidor.

H1.- los quesos frescos elaborados en la planta “Papa Juan” presentan patógenos, por lo que es un posible riesgo a la salud de sus consumidores.

CAPITULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA
INVESTIGACIÓN

2.1.Marco conceptual.

Queso fresco.

Es un alimento sin madurar heterogéneo, compuesto principalmente de caseínas, materia grasa, agua y minerales. La red de caseína es formada a partir de las micelas presentes en la leche, ya sea por acidificación hasta alcanzar el punto isoeléctrico de las proteínas (pH 4,6) mediante la integración de cultivos bacterianos o de un ácido grado alimenticio (8).

Enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), se dan origen por la alimentación con productos contaminados por microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor de manera individual o colectiva. Los síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero además se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera (9).

Actualmente se han definido más de 250 ETA. En general son infecciones originadas por diferentes bacterias, virus y parásitos. Las ETA forman un importante problema de salud pública debido al aumento de casos, la aparición de nuevos tipos de transmisión, grupos poblacionales vulnerables, el acrecentamiento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan (9).

Enfermedades transmitidas por quesos.

Los microorganismos más comunes que se desarrollan en los quesos, son los asociados a enfermedades causantes de patologías como vómito, náuseas, calambre, diarrea, mareo y fiebre, microorganismos como: *coliformes fecales*, *S. Aureus*, y *mohos y levaduras* (10).

Calidad Microbiológica.

La inocuidad alimentaria se certifica primordialmente mediante el control en el punto de origen, el control de la planificación, formulación del producto y la aplicación de buenas prácticas de higiene en la producción, la elaboración (incluido el etiquetado), la manipulación, la distribución, el almacenamiento, la venta, la preparación y el uso, junto con la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) (11).

Este enfoque preventivo brinda un control mayor del que se consigue con los ensayos microbiológicos, teniendo en cuenta de que la eficacia del ensayo microbiológico para evaluar la inocuidad de los alimentos es limitada. En el HACCP y Directrices para su Aplicación (Anexo al CAC/RCP-1 1969, Rev. 3-1997, enmendado en 1999) figuran orientaciones detalladas para establecer sistemas basados en el sistema de HACCP (11).

2.2.Marco Referencial.

2.2.1. Producción de leche en el ecuador.

La producción de leche en el 2014 son 5'596.361 L/día, con un promedio por vaca de 5,60 L. En producción de leche la Región Sierra es pionera concentrando el 75,90 % de producción. El ganado fue alimentado principalmente por pastos cultivados, en el cual la mayor superficie está ocupada por el Pasto Saboya, el mismo que representa el 48,49 % con 1'151.754 ha (12).

2.2.2. Producción lechera en la provincia de Manabí.

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y censos (INEC) en el año 2011 la producción de leche fue de 612.261 L/día con un porcentaje de 9,41% en cuanto a la producción

nacional, siendo una de las zonas más productoras de leche después de la provincia de pichincha que cuenta con un 20,44% (13).

2.2.3. Producción lechera y quesera en el cantón Flavio Alfaro.

La producción de leche es de 85.037,40 L/día, con un promedio en el rendimiento de 3 litros por vaca/día, con una población de 33.785 vacas y 13.458 vaconas. Con esta producción un 70% es para la elaboración de queso que es destinado al consumo local, provincial y nacional y el 30% restante al consumo local y venta a industrias lácteas (14).

2.2.4. Instalaciones para la producción de queso fresco.

Los puntos de control mínimos que deben presentarse son: control de requisitos y almacenamiento de materias primas (cloruro de calcio, fermentos, nitratos y cuajo), lavado y esterilización de tinas de mezclado y utensilios, lavado e higiene de los operarios, actividad del fermento (pH), esterilización de moldes y prensas, control de soluciones de salado, lavado y sanitización de tinas de salado, humedad y temperatura; Dejar constancia en ficha correspondiente de todos los parámetros a verificar (15).

Tina de mezclado.- Se debe monitorear que las materias primas cumplan con las especificaciones de la planta de producción; temperatura de la leche durante la elaboración, que se cumplan los procedimientos de lavado y limpieza de equipos y utensilios (15).

Moldeo.- Se recomienda monitorear para que se cumplan los procedimientos de utilización; lavado, sanitización y mantenimiento de moldes y prensas (15).

Salado.- Toda industria láctea debe asegurar que las materias primas cumplan con las determinaciones de la empresa, temperatura de la solución de salado, concentración de sal (15).

2.2.5. Características de la leche destinada a la elaboración de queso.

En general, se puede decir que la leche es de calidad cuando posee los siguientes requisitos:

- Ausencia absoluta de sustancias nocivas para la salud del consumidor, tales como sustancias extrañas y residuos de productos nocivos (pesticidas, medicamentos, toxinas microbianas, etc.).
- Capacidad de acidificación normal, es decir, ausencia de sustancias capaces de inhibir a la flora ácido-láctica.
- Baja carga microbiana, como requisito previo para obtener alimentos con capacidad de conservación prolongada.
- Caracteres organolépticos (sensoriales) normales.
- Bajo contenido celular, indicativo de una leche normal obtenida por una mama sin infecciones ni trastornos secretorios.
- Bajo o nulo número de gérmenes tecnológicamente indeseables, especialmente coliformes y esporulados butíricos.
- Composición química normal, indicativa de una buena aptitud para la producción (16).

2.2.6. Valor nutricional del queso fresco.

El servicio de investigación agrícola de Estados Unidos muestra el valor nutricional del queso fresco (tabla 1) (17):

Tabla 1. Composición nutricional del queso fresco.

COMPONENTE	UNIDAD	VALOR EN 100 g
Proximales		
Agua	g	48,70
Energía	kcal	310
Proteína	g	20,38
Total de Lípidos	g	24,31
Carbohidratos, por diferencia	g	2,53
Azúcares, total de	g	1,76
Minerales		
Calcio (Ca)	mg	6,90
Hierro (Fe)	mg	0,18
Magnesio (Mg)	mg	29
Fósforo (P)	mg	467
Potasio (K)	mg	126
Sodio (Na)	mg	704
Zinc (Zn)	mg	3,06
Vitaminas		
Tiamina	mg	0,048
Rivoflavina	mg	0,230
Niacina	mg	0,035
B6	mg	0,086
B12	µg	1,75
Vitamina A, RAE	µg	157
Vitamina A, IU	IU	555
Vitamina E	mg	0,47
Vitamina D (D2+D3)	µg	0,7
Vitamina D	IU	27
Vitamina K	µg	1,6
Lípidos		
Ac. Grasos saturados	g	13,661
Ac. Grasos monoinsaturados	g	6,459
Ac. Grasos poliinsaturados	g	1,149
Ac. Grasos trans	g	0,890
Colesterol	mg	70

FUENTE: USDA (17).

2.2.7. Principales patógenos encontrados en los quesos artesanales.

2.2.7.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre a pocas horas posterior del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (18).

La *E. Coli* fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich, quien la designó bacteria Coli Comune para señalar su aparición universal en el intestino de sujetos sanos. En los últimos 100 años la *E. Coli* se ha estudiado de manera tal que es hoy por hoy la forma de vida libre más perfectamente entendida sobre la tierra (19).

La *E. Coli* es un bacilo gramnegativo, móvil, facultativo, oxidasa negativo, reductor de nitritos, no esporulados, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas y presenta 3 antígenos:

- Antígeno O: somático (grupo).
- Antígeno H: flagelar (tipo).
- Antígeno K: de superficie, asociado al grupo (19).

2.2.7.2. *Staphylococcus Aureus*.

Staphylococcus Aureus es agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario. En la década de los `50, con la introducción de la penicilina y sulfonamidas los estreptococos fueron desplazados por los estafilococos como agentes principales de infección intrahospitalaria. Posteriormente en los años `70, pasaron a predominar los bacilos Gran Negativos, situación que revirtió con la utilización de amino glucósidos y cefalosporinas (20).

2.2.7.3. *Salmonella spp.*

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. Las infecciones por *Salmonella spp.* pueden causar pequeños brotes en la población; entre el 60 al 80% de los casos son esporádicos (21).

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, está integrada por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. Para su crecimiento no requieren cloruro de sodio pero pueden crecer en concentraciones que van desde 0,4 al 4%. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5 a 47 °C, con una temperatura óptima de 35 °C-37 °C, algunas pueden llegar a crecer a 2 hasta 54 °C (22).

2.2.7.4. *Listeria monocytogenes.*

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram positivo, intracelular facultativo, que se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza, frecuentemente en alimentos. Las infecciones afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos, ancianos, mujeres embarazadas y neonatos (23).

Esta bacteria puede ser aislada de suelo, agua, vegetales y contenido fecal de una amplia gama de animales; es un contaminante común de alimentos frescos y procesados, de origen animal y vegetal (hortalizas), leche y lácteos no pasteurizados, carne de vaca, cerdo y aves, embutidos ahumados o fermentados y pescados ahumados (24).

2.3.Marco Legal.

2.3.1. Norma Codex para el Queso.

Ámbito de Aplicación.

La presente Norma se aplica a todos los productos destinados al consumo directo o a ulterior elaboración que se ajustan a la definición de queso (25).

Descripción.

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante: coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (25).

Contaminantes.

Los productos a los cuales se aplica la presente Norma deberán cumplir con los niveles máximos de contaminantes especificados para el producto en la Norma General para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Piensos (CODEX STAN 193-1995) (25).

La leche utilizada en la elaboración de los productos a los cuales se aplica la presente norma deberá cumplir con los niveles máximos de contaminantes y toxinas especificados para la leche en la Norma General para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los

Alimentos y Piensos (CODEX STAN 193-1995), y con los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas establecidos para la leche por la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) (25).

Higiene.

Se recomienda que los productos abarcados por las disposiciones de esta norma se preparen y manipulen de conformidad con las secciones pertinentes del Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969), el Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos (CAC/RCP 57-2004) y otros textos pertinentes del Codex, como los Códigos de Prácticas de Higiene y los Códigos de Prácticas. Los productos deberán cumplir cualesquiera criterios microbiológicos establecidos de conformidad con los Principios y Directrices para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos en Relación a los Alimentos (CAC/GL 21-1997) (25).

2.3.2. Instituto ecuatoriano de normalización (INEN).

2.3.2.1. NTE 1528 (2012) Norma general para quesos frescos no maduros.

Queso no madurado.- Se entiende por queso no madurado el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación (1).

Requisitos específicos.

Para la elaboración de los quesos frescos no madurados, se pueden emplear las siguientes materias primas e ingredientes autorizados, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius: Leche y/o productos obtenidos de la leche (1).

Ingredientes tales como:

- a) Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o aromas y cultivos de otros microorganismos inocuos;
- b) Cuajo u otras enzimas coagulantes inocuas e idóneas;

c) Cloruro de sodio;

d) Vinagre;

2.3.2.2. Requisitos microbiológicos.

Al análisis microbiológico correspondiente, los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, metabolitos y toxinas (1).

Los quesos frescos no madurados, producidos de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos (tabla 2).

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.

Requisito	N	m	M	c	Método de ensayo
<i>Enterobacteriaceas</i> , UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991. 14
<i>Staphylococcus Aureus</i> UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529- 14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	Ausencia	-		ISO 11290- 1
<i>Salmonella</i> en 25 g	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529- 15

FUENTE: INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN NTE INEN 1528 (1)

Dónde:

- n = Número de muestras a examinar.
- m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.
- M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.
- c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

Tabla 3. Medios de cultivos a utilizar para los análisis microbiológicos.

MICROORGANISMOS	MEDIOS DE CULTIVOS
<i>Mohos y Levaduras</i>	Agar sal levadura de Davis (SLD)
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Agua Peptonada Agar Baird Parker
<i>Salmonella</i>	Agua PeptonadaBuferada Caldo Tetratoniato Caldo RappaportVassiliadis Agar Nutritivo XLD Agar Triple SugarIron Agar Medio Sim
<i>Coliformes Totales</i>	Agua peptonadaBuferada Agar Levine Brilliant Green BileLactoseBroth (bgbl) Agar nutritivo
<i>Escherichia coli</i>	Agar Violet Red Bile Agar nutritivo Reactivo Kovacs

FUENTE: AUTOR

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.Localización.

Esta investigación se realizó en dos localidades, la toma de muestras se la hizo en la planta quesera situada en el cantón Flavio Alfaro perteneciente a la provincia de Manabí con una extensión de 1343 $km.^2$ y una población de 25.004 habitantes según el último censo de población y vivienda del 2011 y los análisis microbiológicos se efectuó en la Universidad Técnica estatal de Quevedo ubicada en la Av. Quito km. 1 $\frac{1}{2}$ vía a Santo Domingo de los Tsachilas del Cantón Quevedo, Provincia de Los Ríos. Situado geográficamente a 1°20'30" de latitud Sur y los 79°28'30" de longitud occidental, dentro de una zona subtropical.

3.2.Tipo de investigación.

En la presente investigación se empleó un análisis descriptivo, estadístico ya que se investigó la calidad microbiológica de una exploración de datos obtenidos mediante muestreo, los dichos muestreos se obtuvieron durante todo el proceso, como son: muestras de materiales y equipos, ingredientes, materia prima, recursos humanos, agua utilizada y producto final.

3.3.Método de investigación.

El método de investigación fue hipotético deductivo, ya que se utilizó hipótesis y luego de los resultados obtenidos se aceptaron las mismas según las normas INEN establecidas para estos casos, y posteriormente se dedujeron conclusiones.

3.4. Instrumentos de la investigación.

- Equipos de oficina (Computadora, papel bond, impresora, pen drive.)
- Carro.

3.5. Recursos humanos y materiales.

3.5.1. Recursos humanos.

- Estudiante investigador
- Asesores de estudio

3.5.2. Recursos de laboratorio.

- Refrigeradora
- Incubadora
- Balanzas
- Matraz Erlenmeyer
- Cajas Petri
- Bolsas plásticas
- Mechero de bunsen

3.5.3. Recursos Biológicos.

- Muestras de queso
- Muestras de diferentes lugares de la planta

3.5.4. Recursos Químicos.

- Medios de cultivo
- Reactivos

3.6.Muestreo.

En un mismo día, al azar se tomó una muestra representativa en cada una de las etapas del proceso. Las diversas muestras consideradas y analizadas fueron:

- a) leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y queso al final del proceso en la planta (fase de despacho).
- b) agua de servicio tomada en diversos puntos dentro del área de procesos.
- c) equipos utilizados al inicio del proceso y al final después de la limpieza (tinas, mesa de trabajo, moldes, lira, lienzo, palas).
- d) manos de operarios. Esta toma de muestras se realizó 2 veces como fue, al inicio y final de proceso.

La identificación, preparación y transporte de la muestra se realizó según la Norma NTE INEN 1 529-2:99 (28) Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ). Todos los análisis microbiológicos de las muestras y/o sus diluciones sucesivas sembradas en placas con los diferentes medios se realizaron por duplicado y en el caso de número más probable (NMP) se realizaron por triplicado.

3.7.Evaluación microbiológica.

La leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y el queso se determinó el NMP de *coliformes fecales* y *E. Coli* y por duplicado se hicieron *Mohos* y *Levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus Aureus*, siguiendo las respectivas normas INEN para cada uno de estos análisis (26) (27) (28) (29).

Para la determinación de la calidad sanitaria del agua, se efectuó usando la técnica del NMP de *coliformes Totales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus Aureus*, según la norma NTE INEN 2 169, (30)

Para la determinación de la calidad de los materiales y equipos, se determinó los recuentos de microorganismos *coliformes Totales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus Aureus*, mediante la técnica del hisopado según la norma NTE INEN 1529-2:99 (31)

Para la evaluación de la calidad sanitaria de las manos de los operarios durante el proceso de elaboración del queso se utilizó la técnica del hisopado (31). Posteriormente se procedió hacer los respectivos análisis microbiológicos, *coliformes Totales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus Aureus*.

3.7.1. Determinación de *Salmonella* spp. (NTE INEN 1529-15:2009).

Pre enriquecimiento.

Se tomó 25 g. de queso, o en caso de muestras líquidas como: leche cruda, leche pasteurizada, agua, cuajada y las disoluciones obtenidas de la técnica del hisopado se tomó 25 mL. en un matraz de 1000 mL. de capacidad, conteniendo 425 mL. de agua peptonada, Se incubó a 37 °C durante 24 h. Luego de ese tiempo se extrajo 1 mL de esa mezcla y se colocó en un tubo de ensayo con 9 mL. de agua peptonada tamponada bufferada, se incubó a 37 °C durante 24 a 48 horas con la finalidad de recuperar las células de *Salmonella*, que pudieran estar dañadas, a una condición fisiológica estable (26).

Enriquecimiento.

Luego del tiempo de pre enriquecimiento inmediatamente se extrajo con pipeta 1 mL. de cada muestra y se sembró en un Erlenmeyer de 250 mL. de capacidad, conteniendo 100 mL. de caldo tetratoniato incubándose a 42 °C por 24 horas y otro con 100 mL. de caldo Rappaport Vassiliadis y se incubó a 42 °C por 24 horas. Se extrajo una asada de ambos medios y se inoculó por separado, por estrías, en tubos de ensayo con agar nutritivo en picos de flauta a 42 °C por 24 h. (26).

Inoculación en Agares selectivos.

Se sacó una asada del medio anterior y se inoculo por estrías en placas Petri contenidas con agar XLD a 37 °C por 24 h. En caso de haber colonias sospechosas se procedió a sembrar en agar TSI y LIA (26).

3.7.2. Determinación de coliformes *Totales* y *E. Coli* (NTE INEN 1529- 8).

Se usó 1g. de queso o en el caso de muestras liquidas o disoluciones 1 mL., se mezcló con 9 mL. de agua peptonada tamponada bufferada y se llevó al vortex luego de procesada se extrajo 1 mL. de la muestra homogenizada para la respectivas diluciones (27).

Una vez realizada las diluciones con una pipeta estéril, se transfirió 1 mL. de las diluciones a cada uno de los tubos que contenían 10 mL. de 39 caldo BGBL (Brilliant Green Bilis Lactosa) cada uno con su respectiva campana Durham para la observación de reacciones positivas a la producción de gas, se incubo a una temperatura 37 °C por 48 horas (27).

Transcurrida las 48 horas se observó la producción de gas en cada dilución para como presunta positiva todos los tubos que presenten crecimiento con producción suficiente de gas. Se agito cada uno de los tubos presuntivos y con una asa de inoculación a partir de cada de uno de ellos se sembró por estrías en placas individuales secas de Agar EMB. Se invirtió las cajas y posteriormente se las incubo a 37 °C por 24 horas. Las colonias fueron sembradas mediante estrías y picaduras en agar TSI y medio SIM, se incubaron a 37 °C por 48 horas (27).

Las que dieron positivo para coliformes *Totales*, se sembró en agar nutritivo a 37 °C por 48 horas al término del cual se le añadió a cada tubo 4 gotas del reactivo de Kovacs y se observó si hay o no reacción (anillo de indol) y así confirmando la presencia o ausencia de *Escherichia coli* como referente de los coliformes *Totales* (27).

3.7.3. Detección de recuento *Staphylococcus Aureus*. (NTE INEN 1529-14:98).

De una muestra se extrajo 25g. de queso o en el caso de muestras líquidas o disoluciones 25 mL., se mezcló con 225 mL. de agua peptonada, se llevó al vortex, luego de procesada la muestra se extrajo 1 mL. de la mezcla homogenizada y se preparó diluciones.

Se pipeteo por duplicado en cada caja Petri contenida con 20 mL. de agar Bair Parker, 0.25 cm³ de cada dilución (28).

Se disemino con la varilla en L, uniformemente, sobre la superficie del agar, hasta que valla absorbido por el medio. Se utilizó una varilla por dilución. Se invirtió las placas y se incubaron a 42 °C durante 48 h. Luego de visualizar las placas, se identificaron colonias diferentes o iguales a las de *S. Aureus* presuntivos, dando como resultado positivo o negativo a dicho estudio. (28).

3.7.4. Detección de recuento de mohos y levaduras (NTE INEN 1529-10:98).

Utilizando una pipeta estéril, se pipeteo, por duplicado, alícuota de 1 cm³ de cada una de las diluciones, iniciando por la dilución de menor concentración (29).

Inmediatamente, se vertió en cada una de las placas contenidas de 20 cm³ de agar sal-levadura de Davis (SLD) fundido y templado a 45± 2 °C. Luego, delicadamente se mezcló el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo en las placas movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección y luego hacerla girar cinco veces en el sentido de las manijas del reloj. Se invertirá las placas y se incubo entre 22 °C y 25 °C, por cinco días (29).

Se seleccionó a los cinco días, las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y se contó sin el auxilio de lupas. La mayoría de las colonias de *Levaduras* son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas, las

colonias de *Mohos* tienen un aspecto algodonoso característico. Se contó las colonias de *Mohos* y *levaduras* por separado y luego se procedió a hacer el respectivo calculo (29).

3.8.Análisis estadístico.

Los resultados microbiológicos se expresaron como logaritmos o ufc/g de los recuentos microbianos en las cuatro etapas consideradas del proceso. Se aplicó un análisis de diferencia de hipótesis entre los datos arrojados por las muestras y los datos referenciales (poblacionales) según establecido por la Norma NTE INEN 1528. Para cada una de las variables en leche cruda y queso al final del proceso, se aplicó el análisis estadístico de prueba t de Student debido al desconocimiento de la varianza poblacional ya que el tamaño muestral < 30 .

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.Diagnóstico de la planta de Procesos “PAPA JUAN”

4.1.1. Maquinarias e instalaciones.

En el área de recepción de la materia prima a simple vista no se observaron posibles fuentes de contaminación, el tanque de recepción se halló en buen estado al igual que la pasteurizadora encontrándola en un estado óptimo, los diversos materiales y equipos como moldes, mesa de trabajo, lira, pala, malla también se encontraron en buen estado para su uso, el Cuarto Frio no ha obtenido mantenimiento por lo que se podría obtener una falta de temperatura adecuada para el producto final, el baño sanitario limpio y adecuado para las necesidades de los operarios, así como la completa disponibilidad de detergentes usados para la limpieza personal. En el caso de la estructura las ventanas están ubicadas en la parte más alta, se cuenta con un extractor de aire que no recibe manteniendo de una forma periódica como es lo adecuado.

4.1.2. Higiene y saneamiento de utensilios, equipos, pisos y personal.

El pasteurizador y las tuberías por donde circula la leche se lavan con agua jabonosa (detergente en polvo y cloro) y abundante agua, al igual que los equipos y utensilios del área de producción (pala, malla, lira, moldes, mesa, y tina) que son lavados posteriormente a la elaboración. El piso es enjuagado con agua, posteriormente lavado con agua jabonosa y nuevamente enjuagado con abundante agua.

La higiene de las manos de los operarios se dio al inicio del día antes del primer proceso de producción y al retorno del almuerzo, en cuanto a los equipos de protección de los operarios se presentó deficiente por motivos de que no portaban mascarillas y guantes, se encontraron algunas fallas en los hábitos de los operarios, tales como no lavarse las manos después de manipular cualquier material u objeto que pudiese representar peligro de contaminación para el alimento, entre otros. También se observó la libre movilidad de los operarios entrando y saliendo de la planta sin quitarse el uniforme.

4.1.3. Productos tóxicos

Los productos destinados a la limpieza y desinfección de la planta se encuentran ubicados en la planta en un puesto destinado para tal fin.

4.2.Diagnóstico de sistema de producción actual de la Planta Procesadora “Papa Juan”.

Recepción.- La recepción de la materia prima de la planta es receptada en un tanque de 2000 litros de capacidad, previamente higienizado, la leche receptada de los proveedores llega en tanques propios de ellos, de la cual se desconoce el cuidado y la pulcritud con la que manejan esta materia prima, tampoco se toma la temperatura de la misma al llegar a la planta siendo un factor muy importante para controlar incrementos de la acidez de la leche.

Pasteurización.- El pasteurizador es de acero inoxidable con encamisado de doble pared, El tipo de pasteurización empleada es VAT o lenta, se la hace a 65 °C durante 30 min, el pasteurizador se encuentra en óptimas condiciones, la leche (700 litros) es transportada del tanque receptor al pasteurizador por medio de bombeo y tuberías que son previamente enjuagadas con agua.

Enfriamiento.- el enfriamiento lo realizan haciendo circular agua entre las paredes del pasteurizador, hasta que llegue a 38 °C posteriormente pasa a las tinas de cuajado.

Adición Del Cuajo.- Utilizan cuajo líquido, lo adicionan con una probeta y lo remueven con la pala por un minuto. La pala Usada no se le dio una higienización antes de introducirla.

Coagulación.- Dejan actuar el cuajo por un tiempo de 25 min $\pm$ 5 min.

Corte Y Batido.- utilizaron la lira para el corte que no se higienizo antes de su uso y la pala durante el batido, los operarios introducían innecesariamente la mano.

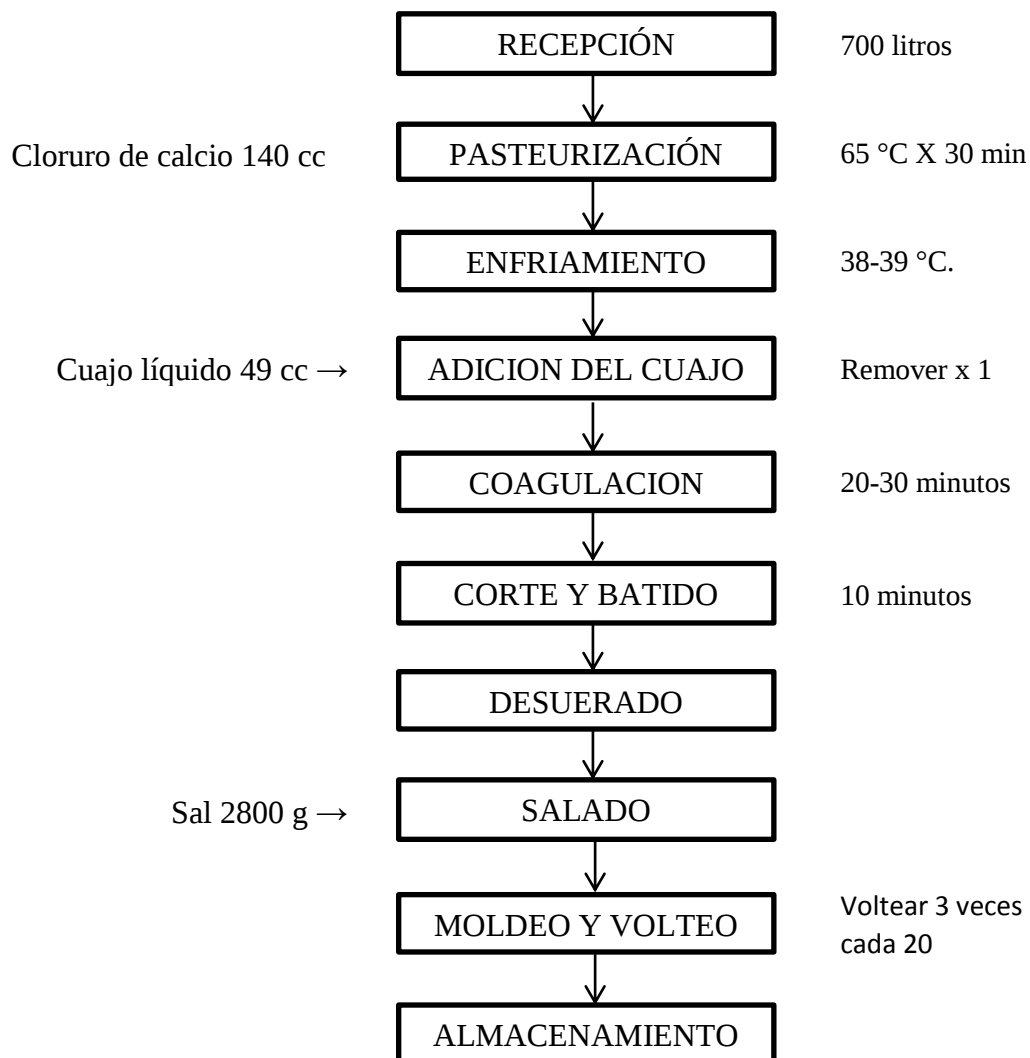
Desuerado.- mediante una malla enjuagada con agua, separan el suero de la cuajada.

Salado.- con un poco de suero previamente separado de la cuajada, se le añade sal refinada 2800 g.

Moldeo y Volteo.- Los moldes son colocados sobre la mesa de trabajo, dentro de cada molde colocan mallas, posteriormente introducen la cuajada por medio de jarras, volteándolos 3 veces cada 20 min.

Almacenamiento.- Los quesos son guardados en gavetas hasta que sea retirado para su comercialización máximo 1 día. El cuarto frio no tiene mantenimiento.

1.1. Diagrama de Flujo del Queso Fresco de la planta “Papa Juan”.



FUENTE: AUTOR

Figura 1. Flujo de Proceso del Queso Fresco empleado en la planta Procesadora “Papa Juan”.

1.2. Características Microbiológicas de las Muestras Analizadas de la Planta “Papa Juan”.

1.2.1. Resultados del Conteo del microorganismo *coliformes Totales* en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

En la **Tabla 4.** los resultados se expresan mediante el número más probable (NMP), donde indica la presencia del microorganismo *coliformes totales* en varias muestras analizadas, en la leche cruda el promedio es elevado, causado probablemente por las malas prácticas de manipulación durante ordeño que poseen las fincas proveedoras de materia prima a la planta y/o a una refrigeración inoportuna inmediata después que se ha obtenido la misma, los valores de la leche pasteurizada y la cuajada indican que el proceso de pasteurización en este lote del día fue óptimo, la lira y manos del operario “2” al inicio y final del proceso se encuentran dentro de norma (100 colonias/g o cm³) según lo establecido por la norma NTE INEN 1528.2012 (32). Estos resultados coinciden con el autor (33) que indica que un alto porcentaje de sus muestras presentaron valores superiores a 104 UFC/g. Este comportamiento demuestra insuficiente calidad de la materia prima utilizada, del agua y de la higiene de los utensilios y del personal, así como fallas en el proceso de elaboración o almacenamiento.

Tabla 4. Microorganismo coliformes Totales en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

MUESTRA	□ NMP/mL
Leche Cruda	150
Leche pasteurizada	28
Cuajada	28
Quesos	75
Agua	210
Tina	210
Lira	21
Mesa	210
Moldes	450
Pala	210
Malla	460
Manos de operario 1 inicial	120
Manos de operario 1 final	210
Manos de operario 2 inicial	28
Manos de operario 2 final	11

FUENTE: AUTOR

1.2.2. Resultados de la Determinación de *E. Coli* en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

Tabla 5. La norma NTE INEN (1) menciona que el número máximo permisible de *Escherichia coli* en quesos frescos es <10 UFC/g, debido a que una cantidad mayor podría inducir a algunas enfermedades gastrointestinales al consumidor. Todas las muestras analizadas cumplen con la especificación de la norma, teniendo un mínimo <10 UFC/g, respectivamente (34) obtuvieron valores similares a los nuestros, con un bajo porcentaje de presencia de *E. Coli* en sus muestras. A excepción de las muestras de la malla en donde si hubo presencia de *E. Coli* demostrando la falta de higiene de este material de trabajo. En los Quesos el resultado obtenido probablemente se dio por un adiconamiento elevado de Cloruro de Sodio, ya que inhibe la proliferación de este tipo de bacterias (35).

Tabla 5. Recuento de *E. Coli* en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016

MUESTRA	□ Log. UFC/mL
Leche Cruda	< 10
Leche pasteurizada	< 10
Cuajada	< 10
Quesos	< 10
Agua	< 10
Tina	< 10
Lira	< 10
Mesa	< 10
Moldes	< 10
Pala	< 10
Malla	1,11x10
Manos de operario 1 inicial	< 10
Manos de operario 1 final	< 10
Manos de operario 2 inicial	< 10
Manos de operario 2 final	< 10

FUENTE: AUTOR

1.2.3. Resultados de la Determinación de moho en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

En la **Tabla 6**. Se presentan igualmente los resultados obtenidos de los recuentos de Moho en donde se expresa que las muestras analizadas están dentro del rango $m= 5.0 \cdot 10^3$ según lo establecido por la norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 1528.2012), como paso con la investigación de (36) que no hubo crecimiento de moho en las muestras de su estudio y si hubo crecimiento de *Levaduras*.

Tabla 6. Recuento de moho en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

MUESTRA	□ Log. UFC/mL
Leche Cruda	$3.9 \cdot 10^3$
Leche pasteurizada	$2.7 \cdot 10^3$
Cuajada	$3.6 \cdot 10^3$
Quesos	$3.0 \cdot 10^3$
Agua	$4.1 \cdot 10^3$
Tina	$4.5 \cdot 10^3$
Lira	$5.0 \cdot 10^3$
Mesa	$1.4 \cdot 10^3$
Moldes	$3.0 \cdot 10^3$
Pala	$2.3 \cdot 10^3$
Malla	$2.3 \cdot 10^3$
Manos de operario 1 inicial	$3.6 \cdot 10^3$
Manos de operario 1 final	$3.6 \cdot 10^3$
Manos de operario 2 inicial	$5.0 \cdot 10^3$
Manos de operario 2 final	$5.0 \cdot 10^3$

FUENTE: AUTOR

1.2.4. Resultados de la Determinación de levadura en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

Tabla 7. Indica que existe presencia de *levadura* en todas las muestras analizadas con excepción de la leche pasteurizada, excedieron el valor $M= 5.0 \cdot 10^4$ estos recuentos que está dentro del límite establecido por la norma técnica ecuatoriana (NTE INEN 1528.2012). La alta frecuencia y contenido de *Levaduras*, es un indicativo de las fallas higiénicas juntamente la incidencia junto con la alta carga bacteriana, en el deterioro acelerado del producto, (37) obtuvo valores similares a los de la presente esta investigación ya que los resultados realizados fueron similares a los obtenidos.

Tabla 7. Recuento de levadura en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

MUESTRA	□ Log. UFC/mL
Leche Cruda	$2.0 \cdot 10^5$
Leche pasteurizada	$4.1 \cdot 10^3$
Cuajada	$6.2 \cdot 10^4$
Quesos	$5.0 \cdot 10^4$
Agua	$2.2 \cdot 10^5$
Tina	$1.8 \cdot 10^5$
Lira	$2.1 \cdot 10^5$
Mesa	$2.0 \cdot 10^5$
Moldes	$1.7 \cdot 10^5$
Pala	$9.3 \cdot 10^4$
Malla	$2.7 \cdot 10^5$
Manos de operario 1 inicial	$1.4 \cdot 10^5$
Manos de operario 1 final	$2.8 \cdot 10^5$
Manos de operario 2 inicial	$3.3 \cdot 10^5$
Manos de operario 2 final	$1.4 \cdot 10^5$

FUENTE: AUTOR

1.2.5. Resultados de la Determinación de *Staphylococcus Aureus* en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

Tabla 8. Se presentan los resultados de los recuentos de *S. Aureus* y los correspondientes valores estadísticos obtenidos de las muestras en estudio. Los recuentos de *S. Aureus* obtenidos de las muestras, Leche cruda, malla, agua, y en las manos de los operarios “1” y “2” en estudio al principio y a la finalización del proceso, se encuentran superando el valor $m=1,0 \times 10^2$ ufc/g establecido por la Norma (NTE INEN 1528. 2012), En este sentido debe tenerse extremo cuidado con el control de *S. Aureus*, ya que altos recuentos de este microorganismo producen enterotoxinas que causan intoxicaciones alimentarias, sin embargo, se observa que el valor promedio de los quesos analizados, como los resultados de los diversos materiales que intervienen en el proceso, presentó un recuento de <10 , lo cual indica baja presencia estando dentro del rango establecido de dicha norma, es importante destacar los resultados que presentaron las manos de los operarios, dichos valores representan una falta de higiene del personal, donde podría afectar directamente al producto elaborado como indica el autor (38) que La presencia de *S. Aureus* podría indicar una contaminación a partir de la piel, la boca o las fosas nasales de portadores de la infección que manipularon el alimento.

Tabla 8. Recuento de *Staphylococcus Aureus* en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

MUESTRA	□ Log. UFC/mL
Leche Cruda	$4,3 \times 10^4$
Leche pasteurizada	< 10
Cuajada	< 10
Quesos	< 10
Agua	$4,5 \times 10^3$
Tina	< 10
Lira	< 10
Mesa	< 10
Moldes	< 10
Pala	< 10
Malla	$4,5 \times 10^3$
Manos de operario 1 inicial	$4,5 \times 10^3$
Manos de operario 1 final	$4,5 \times 10^3$
Manos de operario 2 inicial	$4,5 \times 10^3$
Manos de operario 2 final	$4,5 \times 10^3$

FUENTE: AUTOR

1.2.6. Resultados de la Determinación de *Salmonella* spp. en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

Los resultados se exhiben en el **Tabla 9.** en donde se indica la ausencia de la entero bacteria *Salmonella* spp. En todas las muestras analizadas (ausencia de *Salmonella* spp en 25 g de queso y en caso de los líquidos 25mL). Es probable que la no detección de *Salmonella* spp en las muestras analizadas no signifique la ausencia de esta, sino por factores posibles como el pH ácido, una baja disponibilidad de azúcares para su desarrollo y una competición con otros microorganismos que tengan una tasa de duplicación mayor, así como tensiones de oxígeno bajas en el queso puede enmascarar la presencia de este microorganismo. Como sucedió con el autor Albarracin et. al. (39) que mencionó en su estudio, que la ausencia de *Salmonella* spp se debe a que es posible que uno de los factores que haya impedido su presencia sea el pH de los quesos en estudio o debido al posible efecto inhibitorio de ácidos grasos propios de la leche como son ácidos acético, butírico y propiónico a pH 5.8 son fuertemente bactericidas.

Tabla 9. Recuento de *Salmonella* spp. en los materiales, personal y equipo que intervienen en el proceso de queso Fresco elaborado en la planta Papa Juan en el cantón Flavio Alfaro, 2016.

MUESTRA	□ UFC/mL
Leche Cruda	AUSENCIA
Leche pasteurizada	AUSENCIA
Cuajada	AUSENCIA
Quesos	AUSENCIA
Agua	AUSENCIA
Tina	AUSENCIA
Lira	AUSENCIA
Mesa	AUSENCIA
Moldes	AUSENCIA
Pala	AUSENCIA
Malla	AUSENCIA
Manos de operario 1 inicial	AUSENCIA
Manos de operario 1 final	AUSENCIA
Manos de operario 2 inicial	AUSENCIA
Manos de operario 2 final	AUSENCIA

FUENTE: AUTOR

1.2.7. Prueba estadística T de Student

Tabla 10. Dentro de la prueba de T de Student, en los valores de moho, Coliformes Totales, *E. Coli* y *Salmonella* no existe diferencia estadística significativa alguna, mientras que los valores de *Levaduras* indicaron diferencia estadística significativa $p \leq 0.05$ con respecto a los valores de leche cruda, donde hubo una disminución significativa al momento de la pasteurización, y los valores de *Staphylococcus Aureus* indicaron diferencia altamente Significativa $p \leq 0.01$ con respecto a los valores obtenidos en la leche cruda, donde se comprobó estadísticamente, que los recuentos promedios disminuyeron significativamente después del proceso de pasteurización.

Tabla 10. T de Student y Promedios de los valores obtenidos de leche Cruda y Quesos.

Tratamientos	Mohos	levaduras	Coliformes Totales	<i>E. coli</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>Salmonella</i>
Leche Cruda	3.9×10^3	2.0×10^5	122	<10	4.3×10^4	AUSENCIA
Quesos Fresco	3.0×10^3	5.0×10^4	62	<10	<10	AUSENCIA
Nivel de significación 5%	N.S.	*	N.S.	N.S.	*	N.S.
1%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	*	N.S.

FUENTE: AUTOR

Los valores con un asterisco significan que existe una diferencia estadística $p \leq 0.05$, Los valores con dos asteriscos significa alta diferencia estadística $p \leq 0.01$, los valores que no poseen diferencia Significativa están identificadas por N.S.

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

2.1.Conclusiones.

- Los resultados obtenidos en los quesos no se detectó la presencia de bacterias patógenas, para el ser humano como *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus* y *Salmonella spp.*, asociadas a enfermedades entéricas en humanos lo que relativamente la hacen apta para el consumo. Por lo tanto, se acepta la Ho que dice: Los quesos frescos elaborados en la planta “Papa Juan”, no presentan patógenos que afecten a la salud del consumidor.
- Los análisis realizados en la diferentes etapas del proceso de elaboración del queso fresco como la recepción, la pasteurización, la cuajada, el desuerado, el moldeado y por último el almacenamiento, nos dio como resultado bajas cargas microbiológicas después del proceso de pasteurización, sin dejar a un lado las propiedades de los aditivos que se le añade al momento de la cuajada como es la sal, que posee características inhibitoras que ayudan a la disminución de ciertos tipos de microorganismos patógenos.
- En las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso en la planta “papa juan”, las principales causas de contaminación fueron la materia prima, ya que una vez dado el tratamiento de pasteurización, la leche tubo menores porcentajes de cargas microbiológicas, catalogándola apta para su procesamiento posterior en queso o en otro derivado lácteo, y aunque en los quesos resulto influenciado por los materiales y el personal que intervienen en el proceso de elaboración, indicaron que son una fuente de contaminación según los resultados obtenidos.
- Los resultados obtenidos nos da a conocer que los productos lácteos si le otorgamos un procesamiento adecuado adquiere inocuidad dejándola dentro de las especificaciones establecidas por las normas NTE INEN.

- El estudio realizado evidenció que aunque el proceso térmico de pasteurización es efectivo para destruir la carga microbiana de la leche cruda, el agua potable utilizada es de baja calidad sanitaria y que en el proceso de fabricación del queso fresco existen deficientes prácticas de fabricación, así como en los procedimientos de higiene y saneamiento en planta y operarios.

2.2. Recomendaciones.

- Mediante informes a los proveedores de la materia prima, exigir y fomentar una buena manipulación durante el ordeño, que no afecte a la calidad de la misma.
- Realizar análisis físicos químicos de control de calidad durante la recepción de la materia prima, dándole una inocuidad alimentaria al producto elaborado.
- Desarrollar y mantener prácticas higiénicas de lavado de manos, lira, mallas, mesa, y tinas con el fin de evitar contaminación cruzada, y una fase logarítmica del crecimiento bacteriano.
- Se recomienda al personal de trabajo una completa protección de equipo como: ropa o uniforme limpios, cofia, tapa bocas, guantes desechables, botas de caucho y delantales.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. *Norma general para quesos frescos no madurados " Requisitos". NTE INEN.* Quito : s.n., Marzo de 2012, Instituto ecuatoriano de normalización.
2. *Determinación de Listeria spp en quesos frescos elaborados en las fábricas artesanales del cantón San Fernando [Tesis].* Cuenca: Universidad del Azuay. Departamento de Posgrados; 2015. **Cordero, Ana.** Cuenca : s.n., 2015, Universidad del Azuay.
3. *Staphylococcus Aureus.* **ELIKA.** 28 de febrero de 2013, Fundacion vasca para la seguridad Agroalimentaria, pág. 1.
4. *Two cases of urinary tract infection caused by Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 strains.* **Gadea, M, y otros, y otros.** 2, 2012, Revista argentina de microbiología, Vol. 44.
5. *Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela.* **García, CE y Márquez, JG.** 2, 2007, Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Vol. 27.
6. *Comportamiento de listeria monocytogenes Salmonella Sp., y Escherichia coli O157:H7 inoculadas en queso de Cabra durante su vida de almacenaje.* **Porras, Silvia.** Ciudad Universitaria Rodrigo Facio : s.n., Julio de 2008, Universidad de Costa Rica.
7. *EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS ADQUIRIDOS EN LA VÍA PÚBLICA EN UN SECTOR DEL NORTE DE BOGOTÁ.* **Bayona, Martín.** 2, 2009, Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, Vol. 12.
8. *Reologia y textura de quesos bajos en grasa.* **Castro, Andrea, y otros, y otros.** 22, Diciembre de 2014, Revista de Ciencia y Tecnología, págs. 58-66.
9. *Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico.* **FLORES, Tania González y HERRERA, Rafael Antonio Rojas.** 5, Octubre de 2005, Salud Pública de México, Vol. 47, págs. 388-390.
10. *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico.* **FAO.** Roma : s.n., 2009.
11. *Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias "Higiene de los Alimentos".* **FAO.** 2003, CODEX ALIMENTARIUS , Vol. 2.

12. *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC*. **INEC**. 2014, Instituto nacional de estadística y censo.
13. *ENCUESTA DE SUPERFICIE Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA CONTINUA ESPAC*. **INEC**. 2010, Instituto Nacional de Estadística y Censos.
14. *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL CANTÓN FLAVIO ALFARO*. **GAD, FLAVIO ALFARO**. febrero de 2015, Flavio Alfaro.
15. *ELABORACIÓN DE UN MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA PARA LA UNIDAD EDUPRODUCTIVA DE LÁCTEOS DE LA FICAYA - UTN*. **Herrera, Ana y Paez, Andrea**. Ibarra : s.n., 2013, Universidad Tecnica del Norte.
16. *La calidad de leche destinada a la fabricación de queso: calidad química*. **Tornadijo, M, y otros, y otros**. 2, Reynosa : s.n., 1998, Ciencia y Tecnología Alimentaria, Vol. 2, págs. 79-91.
17. *Basic Report: 01229, Cheese, white, queso blanco*. **USDA**. Octubre de 2016, Departamento de Agricultura de los Estados del Servicio de Investigación Agrícola, Vol. 3.5.3.
18. *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli*. **Rodríguez, Guadalupe**. 5, 2002, Salud Pública de México, Vol. 44, págs. 464-475.
19. *Escherichia coli como causa de diarrea infantil*. **Fernández, Raquel, y otros, y otros**. 3, 2003, Revista Cubana Pedriatica, Vol. 75.
20. *Staphylococcus Aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina*. **GIL D de M, MONICA**. 2, Valdivia : s.n., 2000, Revista chilena de infectología, Vol. 17.
21. *Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería*. **Yáñez, Edna, Máttar, Salim y Durango, Alba**. 4, Córdoba : s.n., 2008, Infectio, Vol. 12, págs. 246-253.
22. *Aislamiento microbiológico de Salmonellaspp. y herramientas moleculares para su detección*. **Gonzalez, Jose, y otros, y otros**. 1, Barranquilla : s.n., 2014, Salud Uninorte, Vol. 30, págs. 73-94.

23. *Infecciones por Listeria monocytogenes en mujeres embarazadas: experiencia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile.* **Larraín, Demetrio, y otros, y otros.** 5, Santiago : s.n., 2008, Revista chilena de infectología, Vol. 25, págs. 336-341.
24. *Listeria monocytogenes.* **Benadof, Dona.** 5, Santiago : s.n., Octubre de 2008, Revista chilena de infectología, Vol. 25, pág. 350.
25. *Manual de procedimiento Leche y Productos Lácteos.* **FAO y OMS 2011.** Roma : s.n., 2011, CODEX ALIMENTARIOUS, Vol. 2.
26. *Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección.* **NTE INEN, 1529-15.** 15, Quito : s.n., 1996, Norma Técnica Ecuatoriana.
27. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y E. Coli.* **NTE INEN, 1529-8.** febrero de 1990, Norma Técnica Ecuatoriana .
28. *Control microbiológico de los alimentos. Staphylococcus Aureus. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie.* **NTE INEN, 1529-14.** Quito : s.n., 1998, Norma Técnica Ecuatoriana INEN.
29. *Control Microbiológicos de los Alimentos. Mohos y Levaduras Viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad.* **NTE INEN, 1529-10.** 2013, Norma Técnica Ecuatoriana.
30. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.* **NTE INEN, 2169.** Quito : s.n., 1998, Norma Técnica Ecuatoriana.
31. *Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis de muestras para el análisis microbiológico.* **INEN NTE, 1529.** Quito : s.n., 1999, Norma Técnica Ecuatoriana, Vol. 2.
32. *Norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos.* **NTE INEN, 1528 2012.** 2012, Norma Técnica Ecuatoriana.
33. *Determinación de indicadores sanitarios en quesos artesanales.* **Martínez, Ailin, Montes, Nivian y Villoch, Alejandra.** 1, ene.-abr. de 2016, Revista de Salud Animal, Vol. 38.

34. *Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de Lactobacillus spp.* **Cristóbal Delgado, Ruth y Maurtua Torres, Dora.** 3, lima : s.n., Septiembre de 2003, Revista Panamericana de Salud Pública, Vol. 14.
35. *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SANITARIA DE QUESOS CREMA TROPICAL MEXICANO DE LA REGIÓN DE TONALÁ, CHIAPAS.* **Romero-Castillo, P. A., y otros, y otros.** 1, 2009, Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 8, págs. 111-119.
36. *Mohos y levaduras en queso artesanal semiduro expandido en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.* **Medina, Zoraida, y otros, y otros.** 4, 2014, CIENCIA, Vol. 22, págs. 107-204.
37. *Staphylococcus Aureus en Queso Blanco fresco y su relación con diferentes Microorganismos indicadores de Calidad Sanitaria.* **Díaz, Cándida y González, Bedirva.** 3, septiembre de 2001, Revista Salud Publica y Nutrición, Vol. 2.
38. *Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de Lactobacillus spp.* **Cristóbal, Ruth y Maurtua, Dora.** 3, Septiembre de 2003, Revista Panamericana de Salud Pública, Vol. 14.
39. *Estimación de la proporción de Listeria Monocytogenes y Salmonella spp en quesos Frescos (queso de Hoja, Cuajada) y queso doble crema producidos y comercializados en el municipio de Pamplona, Norte de Santander.* **Albarracin, F, y otros, y otros.** 2, Agosto de 2006, BISTUA, Vol. 4, págs. 30-41.
40. *ELABORACIÓN DE QUESO MOZARELLA A PARTIR DE LECHE DE Bubalus bubalis (GANADO BUBALINO).* **Hernández Palomino, Petter A y Díaz Sangama, Emilio.** 2, Iquitos : s.n., 2002, Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, Vol. 2, págs. 19-30.

CAPITULO VI

ANEXOS

Anexo 1. Diseño estadístico T de Student de los diferentes parámetros como son *Mo'* levaduras, *Coliformes*, *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia coli*.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<i>MOHO</i>	<i>Cruda</i>	<i>Pasteurizada</i>	
Media	39000	30200	
Varianza	7500000	352700000	
Observaciones	5	5	
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,962435951		
Diferencia hipotética de las medias	0		
Grados de libertad	4	5%	1%
Estadístico t	0,918262258	11.070	15.08
P(T<=t) una cola	0,205220709		
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786		
P(T<=t) dos colas	0,410441417		
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105		

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<i>LEVADURA</i>	<i>Cruda</i>	<i>Queso</i>	
Media	1960000	496000	
Varianza	18000000000	6,308E+10	
Observaciones	5	5	
Coeficiente de correlación de Pearson	0,045999128		
Diferencia hipotética de las medias	0		
Grados de libertad	4	5%	1%
Estadístico t	11,72288389	11.070	15.08
P(T<=t) una cola	0,000151427	*	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786		
P(T<=t) dos colas	0,000302854		
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105		

<i>COLIFORMES</i>	<i>Cruda</i>	<i>Pasteurizada</i>	
Media	122,6	61,8	
Varianza	5088,8	2845,2	
Observaciones	5	5	
Coeficiente de correlación de Pearson	0,072639684		
Diferencia hipotética de las medias	0		
Grados de libertad	4	5%	1%
Estadístico t	1,582432139	11.070	15.08
P(T<=t) una cola	0,094357864		
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786		
P(T<=t) dos colas	0,188715727		
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105		

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<i>S. AUREUS</i>	<i>Cruda</i>	<i>Pasteurizada</i>	
Media	428000	10	
Varianza	1320000000	0	
Observaciones	5	5	
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!		
Diferencia hipotética de las medias	0		
Grados de libertad	4	5%	1%
Estadístico t	26,34096361	11.070	15.08
P(T<=t) una cola	6,1721E-06		
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786		
P(T<=t) dos colas	1,23442E-05		
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105		

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<i>E. COLI</i>		<i>Cruda</i>	<i>Pasteurizada</i>
Media		7	0,8
Varianza		1	0,7
Observaciones		5	5
Coeficiente de correlación de Pearson		0	
Diferencia hipotética de las medias		0	
Grados de libertad	4	5%	1%
Estadístico t	10,63291228	11.070	15.08
P(T<=t) una cola	0,000221477		
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786		
P(T<=t) dos colas	0,000442953		
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105		

Anexo 2. Recolección De Muestra de la Tina.



LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 3. Recolección de Leche receptada.



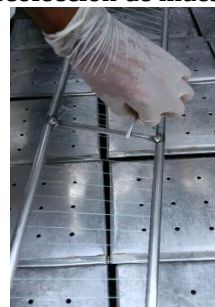
LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 4. Recolección de Leche receptada.



LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 5. Recolección de muestra de la Lira.



LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 6. Recolección de muestra de la Pala.



LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 7. Recolección de muestra de la pala.



LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 8. Recolección de muestra de la moldes.



LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 9. Cuajada con Suero.



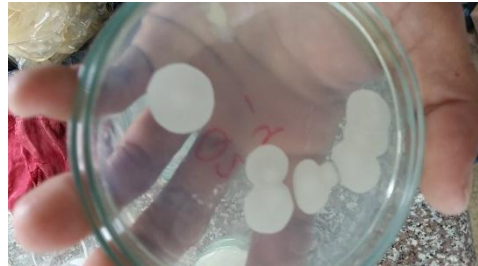
LUGAR: Planta Quesera “Papa Juan”
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 10. Esterilización de agar y materiales de uso.



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 11. Placas incubadas con crecimiento de levadura



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 12. Placas conteo de Placas con Crecimiento de colonias.



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 13. Preparación de Caldo BGBL (Brilliant Green Bilis Lactosa).



LUGAR: Planta Quesera "Papa Juan"
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 14. Preparación de EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar)



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 15. Muestras en Caldo BGBL (Brilliant Green Bilis Lactosa) para la identificación de Coliformes Totales.



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo
FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 16. Reconocimiento de las Placas para de *E. coli*.

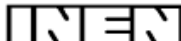


LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

FUENTE: Miguel Carrión, 2016

Anexo 17. Normas Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1528.2012 norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos

CDU: 637.352
ICS: 67.100.30



CIIU: 3112
AL 03.01-420

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	NORMA GENERAL PARA QUESOS FRESCOS NO MADURADOS. REQUISITOS	NTE INEN 1528:2012 Primera revisión 2012-03
1. OBJETO 1.1 La presente Norma establece los requisitos para el queso fresco no madurado, incluido el queso fresco, destinado al consumo directo o a posterior elaboración. 1.2 En caso que exista norma específica para una variedad de queso fresco, en particular se considerará esta. 2. DEFINICIONES 2.1 Para efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones: 2.1.1 <i>Queso</i>. Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante: a) Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o leche, de mantequilla o de cualquier combinación de estos ingredientes, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los ingredientes lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado a). 2.1.1.1 <i>Queso madurado</i>. Se entiende por queso sometido a maduración el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión. 2.1.1.2 <i>Queso madurado por mohos</i>. Se entiende por queso madurado por mohos un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso. 2.1.1.3 <i>Queso no madurado</i>. Se entiende por queso no madurado el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación. 2.1.2 <i>Queso fresco</i>. Es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácteos. También se designa como queso blanco. 2.1.3 <i>Queso condimentado</i>. Es el queso al cual se han agregado condimentos y/o saborizantes naturales o artificiales autorizados. 2.1.4 <i>Queso cottage</i>. Es el queso no madurado, escaldado o no, de alta humedad, de textura blanda o suave, granular o cremosa, preparado con leche descremada, coagulada con enzimas y/o cultivos lácteos, cuyo contenido de grasa láctea es inferior a 2% (m/m). 2.1.5 <i>Queso cottage crema</i>. Es el queso cottage al que se le ha agregado crema, de manera que su contenido de grasa láctea es igual o mayor de 4% (m/m). <i>(Continúa)</i>		

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, queso fresco no madurado, requisitos.

-1-

2012-065

2.1.6 Queso quark (quarg). Es el queso no madurado ni escaldado, alto en humedad, de textura blanda o suave, preparado con leche descremada y concentrada, cuajada con enzimas y/o cultivos lácticos y separados mecánicamente del suero, cuyo contenido de grasa láctea es variable, dependiendo si se agrega crema o no durante su elaboración.

2.1.7 Queso ricotta. Es el queso de proteínas de suero no madurado, escaldado, alto en humedad, de textura granular blanda o suave, preparado con suero de leche o suero de queso con leche, cuajada por la acción del calor y la adición de cultivos lácticos y ácidos orgánicos.

2.1.8 Queso crema. Es el queso no madurado ni escaldado, con un contenido relativamente alto de grasa, de textura homogénea, cremosa, no granulada, preparado solamente con crema o mezclada con leche, cuajada con cultivos lácticos y opcionales se permite el uso de enzimas adicionales en los cultivos lácticos.

2.1.9 Queso de capas. Es el queso moldeado de textura relativamente firme, no granular, levemente elástica preparado con leche entera, cuajada con enzimas y/o ácidos orgánicos generalmente sin cultivos lácticos.

2.1.10 Queso duro. Es el queso no madurado, escaldado o no, prensado, de textura dura desmenuzable, preparado con leche entera, semidescremada o descremada, cuajada con cultivos lácticos y enzimas, cuyo contenido de grasa es variable dependiendo de la leche empleada en su elaboración y tiene un contenido relativamente bajo de humedad.

2.1.11 Queso mozzarella. Es el queso no madurado, escaldado, moldeado, de textura suave elástica (pasta filamentosa), cuya cuajada puede o no ser blanqueada y estirada, preparado de leche entera, cuajada con cultivos lácticos, enzimas y/o ácidos orgánicos o inorgánicos.

2.1.12 Quesillo criollo. Es el queso no madurado, escaldado, alto en humedad con textura blanda suave y elástica fabricado con leche, acidificada con ácido láctico, cuajado generalmente con cuajo líquido.

2.1.13 Queso criollo o queso de comida. Es el queso no madurado, preparado con leche, adicionado de cuajo y de textura homogénea, con desuerado natural.

2.1.14 Queso requesón. Es el producto obtenido por la concentración de suero y el moldeo del suero concentrado, con o sin la adición de leche y grasa de leche, cuyo contenido de grasa es variable.

2.1.15 Queso Descremado. Es el queso no madurado, con un contenido relativamente bajo en grasa de textura homogénea preparado con leche descremada.

2.1.16 Queso Cuartirolo. Es un queso fresco tradicional, de corteza lisa y suave con aroma y sabor característico

2.1.17 Queso de Hoja. Es el queso no madurado obtenido a partir de queso criollo acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de Ecuador no patógenas; sometido a calentamiento previo al hilado, la característica es su envoltura en hoja de achira.

2.1.18 Queso Manaba. Es el queso no madurado obtenido a partir de leche, acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de la zona manabita, salado con sal en grano y colocado en moldes sin fondo para su prensado.

2.1.19 Queso amasado Lojano. Es el queso no madurado elaborado a partir de queso criollo salado y acidificado naturalmente, secado, molido y nuevamente prensado; la característica es su envoltura en hoja de achira.

2.1.20 Queso amasado Carchense. Es el queso no madurado obtenido de cuajada no cortada, de acidificación natural, molido, amasado, moldeado en moldes perforados y espolvoreado sal de consumo humano; desmenuzado manualmente, moldeado y prensado.

2.1.21 Queso Andino fresco. Es un queso no madurado, el cuerpo presenta un color que varía de blanco a crema y tiene una textura blanda (al presionarse con el dedo pulgar) que se puede cortar.

(Continúa)

3. CLASIFICACIÓN

3.1 De acuerdo a su composición y características físicas el producto, se clasifica en:

3.1.1 *Según el contenido de humedad,*

- a) Duro
- b) Semiduro
- c) Semiblando
- d) Blando

3.1.2 *Según el contenido de grasa láctea,*

- a) Rico en grasa
- b) Entero ó Graso
- c) Semidescremado ó bajo en grasa
- d) Descremado ó Magro

4. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

4.1 La leche utilizada para la fabricación del queso fresco, debe cumplir con los requisitos de la Norma NTE INEN 10, y su procesamiento se realizará de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

4.2 Los límites máximos de plaguicidas no deben superar los establecidos en el Codex Alimentarius CAC/ MLR 1 en su última edición.

4.3 Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los establecidos en el Codex Alimentario CAC/MLR 2 en su última edición.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Para la elaboración de los quesos frescos no madurados, se pueden emplear las siguientes materias primas e ingredientes autorizados, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius:

5.1.1.1 Leche y/o productos obtenidos de la leche.

5.1.1.2 Ingredientes tales como:

- a) Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o aromas y cultivos de otros microorganismos inocuos;
- b) Cuajo u otras enzimas coagulantes inocuas e idóneas;
- c) Cloruro de sodio;
- d) Vinagre;

(Continúa)

5.1.2 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con lo establecido en la tabla 1.

Tipo o clase	Humedad % max NTE INEN 63	Contenido de grasa en extracto seco, % m/m Mínimo NTE INEN 64
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero ó graso	-	45
Semidescremado o bajo en grasa	-	20
Descremado ó magro	-	0,1

5.1.3 Requisitos microbiológicos. Al análisis microbiológico correspondiente, los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

5.1.3.1 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 2.

TABLA 2. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
Listeria monocytogenes /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Donde:

- n = Número de muestras a examinar.
- m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.
- M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.
- c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

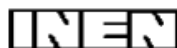
5.1.4 Aditivos. Se pueden utilizar los aditivos permitidos y en las cantidades especificadas en la NTE INEN 2074 y además:

- a) Gelatina y almidones modificados (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los estabilizadores, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)
- b) Harinas y almidones de arroz, maíz y papa (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los antiaglutinantes para el tratamiento de la superficie de productos cortados, rebanados y desmenuzados únicamente, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)

5.1.5 Contaminantes. El límite máximo permitido debe ser el que establece el Codex alimentarius de contaminantes CODEX STAN 193-1995, en su última edición

(Continúa)

Anexo 18. Normas Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:99 Toma, Envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1 529-2:99

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

Primera Edición

(MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. SAMPLING, SENDING AND PREPARATION OF TEST SAMPLES FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION).

First Edition

DESCRIPTORES: Alimentos, análisis microbiológico, muestras, toma de muestras, envío de muestras, preparación de muestras.

AL 01.05-318

CDU: 614.31:579.67:543.05

CIIU: 9320

ICS: 07.100.30

3.1.19 Suspensión inicial (dilución primaria). Es la suspensión, solución o emulsión obtenida después que la cantidad del producto en análisis (o de la porción de muestra preparada para el ensayo) ha sido pesada o medida y luego mezclada, utilizando un homogeneizador cuando es necesario y observando las precauciones apropiadas, con un volumen de diluyente igual a nueve veces la unidad de muestra, para que los microorganismos presentes en la unidad de muestra se distribuyan lo más uniformemente posible y se permita que las partículas grandes, si las hay, se sedimenten (ver nota 3).

3.1.20 Otras diluciones decimales. Las suspensiones, soluciones o emulsiones obtenidas mezclando un volumen específico de la dilución primaria con nueve veces el volumen del diluyente y repitiendo esta operación con cada dilución así preparada, hasta obtener una serie de diluciones decimales adecuada para la inoculación del medio de cultivo.

4. EQUIPO, MATERIAL Y DILUYENTES

4.1 Generalidades

4.1.1 El equipo y material utilizados en la toma de muestras deben ser de acero inoxidable u otro material de resistencia adecuada, que no produzca cambios en la muestra que puedan afectar los resultados de los exámenes subsiguientes. El equipo debe ser lo suficientemente robusto para evitar deformaciones en el uso y lo suficientemente leve que permita al operador moverlo en el producto, fácil y rápidamente. Si los utensilios o aparatos son soldados, la suelda debe resistir temperaturas de 180°C. Todas las superficies deben ser lisas y libres de hendiduras, todas las esquinas deben ser redondeadas. El equipo para tomar muestras debe cumplir con los requisitos específicos adecuados a cada producto.

4.1.2 Los frascos para muestras y sus cierres, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, impermeable al agua y a las grasas (acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos). También se puede utilizar envases desechables de plástico, hojas de aluminio o fundas plásticas con cierres apropiados. De preferencia deben ser opacos y de capacidad y forma adecuadas para tomar la unidad de muestra deseada. Los frascos para productos sólidos, semisólidos o viscosos deben ser de boca ancha.

4.1.3 Todo el material y utensilios utilizados en la toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico deben estar perfectamente limpios, secos, envueltos individualmente y esterilizados por uno de los siguientes métodos físicos:

4.1.3.1 Vapor a presión de 15 libras/ pulgada² (autoclave): 121°C durante 20 min, mínimo.

4.1.3.2 Aire caliente: 170-175°C, en el punto más frío, durante 1 h, mínimo. Utilizar un horno con una eficiente circulación de aire para que haya la seguridad de que en todas las partes del horno se mantiene la temperatura fijada. Si por alguna razón, es imposible la esterilización por estos dos métodos, utilizar los siguientes métodos alternos, que son secundarios, y se los recomienda siempre que el material sea utilizado inmediatamente después de esterilizado y enfriado.

4.1.3.3 Vapor fluyente: 100°C por una hora.

4.1.3.4 Agua hirviendo: ebullición en agua por 20 min, mínimo.

NOTA 3 En algunos casos puede necesitarse, especialmente para productos que dan una suspensión inicial 1+9 demasiado viscosa o demasiado espesa, añadir más diluyente. En algunos otros casos, cuando se necesita relacionar los resultados de los análisis con determinados criterios de especificación, puede ser necesario una dilución primaria más concentrada que 1+9. Estos factores deben ser tenidos en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o en la expresión de resultados.

OBSERVACIÓN. Las definiciones contenidas en los numerales 3.1 al 3.18, inclusive, son según la FAO y la "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF).

(Continúa)

4.1.3.5 Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.

4.1.3.6 Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para objetos que resistan la incandescencia.

4.2 Equipo y material

4.2.1 *Para abrir envases:* tijeras, cuchillos, abridores de latas y de botellas, martillos, alicates, destornilladores, herramienta especial para abrir cajas de cartón, bisturíes, etc.

4.2.2 *Para tomar muestras:* sierras; sondas especiales que penetren en el producto y corten un trozo cilíndrico; taladros; cucharas; cucharones de draga; pinzas; tenedores; torundas; plantillas de metal, con un cuadrado de superficie conocida recortado en el centro; fundas plásticas con cierre apropiado; papel aluminio; compuesto obturante, para cerrar los orificios dejados en los quesos al tomar las muestras.

4.2.3 *Para tomar muestras congeladas:* taladro eléctrico de alta velocidad, hacha, cincel.

4.2.4 *Para controlar la temperatura:* termómetro manual de cuadrante, para controlar la temperatura ambiente y del producto.

4.2.5 *Para transportar muestras:* refrigeradora portátil capaz de enfriar hasta 0°C a 5°C en poco tiempo. Nevera isotérmica con cierre hermético y material aislante entre la pared interna y la externa, para transportar muestras congeladas o refrigeradas.

4.2.6 *Para etiquetar:* etiquetas y marcadores.

4.2.7 *Equipo para esterilización:* autoclave u horno portátiles o mechero de alcohol, y un agente desinfectante (alcohol al 70%).

4.2.8 *Equipo para mantener muestras:* refrigeradora, para almacenar muestras a 2°C y congelador para almacenar a temperaturas menores de -20°C.

4.2.9 *Equipo para descongelar muestras:* baño de agua controlado termostáticamente con agitador, que opere $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y otro, a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.10 *Frascos para muestras:* frascos de boca ancha con tapa de rosca, envases desechables de plástico. Para el transporte de muestras deben ser de un material que absorba los golpes.

4.2.11 *Equipo para homogeneizar muestras:* homogeneizadores, vortex, trituradores, "stomacher", molinos.

4.2.12 *Equipo para medir el pH:* pH metro, con compensación de temperatura y sensibilidad de 0,1 de unidad de pH.

4.2.13 *Equipo para pesar muestras:* Balanza con exactitud clase II y graduación mínima de 0,1 g.

4.2.14 *Materiales varios:* erlenmeyers, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas.

4.3 Diluyentes

4.3.1 Agua peptona al 0,1% : para uso general.

4.3.2 Agua peptona tamponada: para *Salmonella*.

4.3.3 Agua peptona sal al 15%: para extremadamente halófilos.

(Continúa)

4.3.4 Agua peptona sal al 5%: para halófilos moderados y halotolerantes.

4.3.5 Caldo TSB: para revitalización.

4.3.6 Caldo reforzado para clostridios: para anaerobios.

4.3.7 Solución de calgón [hexametáfosfato sódico, $(\text{NaPO}_3)_6$] al 1% en solución Ringer diluida al ¼: diluyente para hisopos de alginato.

4.3.8 Solución de citrato sódico al 2%, pH $7,5 \pm 0,1$: para quesos, leches fermentadas, leche en polvo "roller".

4.3.9 Solución de fosfato dipotásico al 2%: para caseína ácida, caseína láctica y suero ácido en polvo el diluyente debe tener un pH de $8,4 \pm 0,1$ y $7,5 \pm 0,1$ para crema ácida, quesos, caseínatos.

4.3.10 Solución de fosfato tripotásico ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 8% para ajustar el pH de las muestras.

4.3.11 Solución Ringer al 1/4: para mantequillas

4.3.12 Solución de sacarosa al 20%: para osmófilos.

4.3.13 Solución salina peptonada: para uso general.

5. TOMA DE MUESTRAS

5.1 Disposiciones administrativas (ver nota 4)

5.1.1 La toma de muestras debe realizar un agente autorizado o un agente independiente autorizado que ha recibido formación técnica apropiada. El o la agente debe actuar independientemente y no aceptar la interferencia de terceros. Bajo su responsabilidad puede recibir ayuda de otros. Cuando sea posible, se debe permitir a los delegados de las partes interesadas presenciar la toma de muestras. El agente y su(s) ayudante debe tomar las medidas adecuadas para prevenir cualquier contaminación tanto del envío [o lote(s)] como de las unidades de muestreo (por ejemplo, lavarse y desinfectarse las manos antes de manipular el material a muestrearse, vestir un delantal u overol blanco y limpio, usar mascarilla y gorro, trabajar observando rigurosamente todas las medidas previstas en el programa de la planta para la higiene y desinfección de los empleados).

5.1.2 Se sellará y etiquetará cada muestra. Fijar el sello de manera que sea imposible remover el contenido o la etiqueta sin destruir el sello. Las etiquetas deben ser de tamaño y calidad adecuadas para el propósito (por ejemplo una cartulina de color claro, un cartón a prueba de grasa y de agua y con un ojete reforzado). Escribir la información con tinta indeleble indicando, por lo menos, la naturaleza del producto, el número y código del lote, la fecha de la toma de muestras, el nombre y la firma del agente que tomó las muestras. Cuando sea necesario, se puede incluir información adicional tal como el propósito de la toma de muestras, la masa o volumen de la muestra, la marca de identificación de la unidad (caja, bidón, etc.) de donde se tomó la muestra.

5.1.3 Se tomarán todas las muestras, cuando menos, por duplicado y se conservarán en condiciones idénticas a las que tenían en el momento de la toma. De ser necesario, y cuanto antes, se debe poner una serie a disposición de la otra parte. Previo convenio de las partes, se recomienda la toma de series adicionales de muestras, las cuales, en caso necesario, deben guardarse para un arbitraje independiente. Una vez tomadas las muestras, enviar las muestras al laboratorio para su análisis.

NOTA 4 Las siguientes instrucciones no son necesariamente aplicables para tomar muestras de ruñina.

(Continúa)

5.1.4 Las muestras se deben acompañar de un informe de la toma de muestras firmado por el agente responsable de la toma y refrendado por posibles testigos. En el informe debe constar la siguiente información:

5.1.4.1 Lugar, fecha y hora en que se realizó la toma de muestras.

5.1.4.2 Nombre y dirección del agente que realizó la toma de muestras y de los posibles testigos.

5.1.4.3 Método exacto de la toma de muestras (aleatorio en todo el lote, aleatorio en las partes accesibles o por otro método).

5.1.4.4 Procedimiento exacto utilizado para tomar las muestras, si éste difiere de las instrucciones dadas en esta norma.

5.1.4.5 Motivo de la toma de muestras.

5.1.4.6 Naturaleza del alimento.

5.1.4.7 Número y código del lote, códigos de los baches y el número y tamaño de las unidades que constituyen el lote.

5.1.4.8 Tamaño y número de las muestras de población debidamente identificadas en relación al lote, bache y/o unidad (caja, bidón, etc.) del cual proceden.

5.1.4.9 Lugar a donde se enviarán las muestras.

5.1.4.10 Ensayos solicitados.

5.1.4.11 Nombre y dirección del laboratorio que analizará las muestras.

5.1.4.12 Temperatura del producto al momento de la toma de muestras.

5.1.4.13 Origen del envío y lugar de destino.

5.1.4.14 Si es posible, el nombre y la dirección del fabricante, importador, vendedor o comprador, según proceda.

5.1.4.15 Cuando convenga, se debe mencionar en el informe, además, cualquier condición o circunstancia relevante de la toma de muestras (por ejemplo, el estado de los envases y sus alrededores, la temperatura y humedad atmosféricas, la edad del producto, método de esterilización del material para tomar muestras), si la muestra es una mezcla de submuestras y cualquier información especial referente al producto muestreado, por ejemplo, la dificultad para homogeneizar el producto.

5.2 Número de muestras de población que se deben tomar

5.2.1 Se debe tomar un número de muestras de población equivalente al número "n" de unidades de muestra indicado en el programa de muestreo especificado, ya sea, en las respectivas NTE de requisitos o en un contrato, o según lo acordado entre las partes interesadas o según un programa diseñado para enfrentar una situación emergente (brote de intoxicación, por ejemplo).

5.3 Técnicas para la toma de muestras

5.3.1 Generalidades

(Continúa)

5.3.1.1 Tomar las muestras en condiciones asépticas, con rapidez pero cuidadosamente, y de tal manera, para que la muestra sea representativa del producto que se quiere analizar.

5.3.1.2 Antes de abrir un envase limpiar la zona apropiada con agua tibia y jabón y pasar alcohol al 70% sin flamear, o si es un envase de papel, retirar la parte externa. Abrir el envase asépticamente con instrumentos estériles. Para cada envase utilizar un instrumento estéril.

5.3.1.3 Cuando sea posible, mezclar bien el producto hasta que esté homogeneizado y, cuando no lo es, asépticamente, tomar alícuotas de diferentes sitios del recipiente hasta completar una cantidad no inferior a 100 g ó cm^3 .

5.3.1.4 Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), asépticamente tomar primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. Para conservar estas muestras no se debe utilizar preservantes

5.3.1.5 Registrar la temperatura del aire de la sala de almacenamiento o del vehículo, tomar la muestra, luego, insertar el termómetro en el alimento del que se tomó la muestra y registrar su temperatura. Cuando el alimento está envasado en pequeños envases cerrados, registrar la temperatura del alimento en un envase adyacente en la misma caja de cartón o embalaje.

5.3.1.6 El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm^3 o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote como latas herméticamente cerradas conteniendo muchas veces la cantidad de alimento equivalente a la unidad de muestra, o envases muy pequeños de los que se necesitará tomar varios de ellos hasta completar los 100 g.

5.3.2 *Procedimientos para tomar muestras*

5.3.2.1 *Productos en envases pequeños.* Los alimentos, sean éstos líquidos, pastosos, sólidos o pulverulentos envasados en pequeños recipientes deben tomarse en su propio envase original, sin abrir.

- a) Las mantecas, margarinas, mantequillas que se encuentren en unidades de 250 o más g, dividir las en cuatro partes y tomar como muestras las dos cuartas partes opuestas. Si la unidad pesa menos de 250 g, tomar toda la unidad.
- b) De los quesos pequeños y de las porciones de queso envueltas y empacadas en envases pequeños tomar como muestra un queso completo y de las porciones, un número suficiente de ellas para que la muestra no sea inferior de 100 g.

5.3.2.2 *Productos a granel (bidones, tambores, etc.).*

a) *Productos líquidos.*

- a.1) Evitando contaminar el contenido, mezclar los productos líquidos cuidadosamente con un cucharón estéril o mecánicamente, hasta que el producto esté totalmente mezclado; inmediatamente después de la mezcla, con un cucharón estéril y asépticamente transferir a un envase estéril una cantidad no inferior a 100 cm^3 . Si es difícil obtener una buena homogeneización, de sitios apropiados del recipiente tomar varias submuestras de manera a obtener una muestra no inferior a 100 cm^3 y que sea representativa del envase. Inmediatamente cerrar y etiquetar el frasco. Para tomar una muestra de un ducto de salida, primero dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar la salida con el flujo y luego tomar la muestra, no menos de 100 cm^3 .
- a.2) En el caso de cremas, dar un número suficiente de golpes con el cucharón para asegurar una buena mezcla, sumergir el cucharón moviendo de un lado para otro con mucho cuidado para evitar la formación de espuma y de mantequilla. Tomar no menos de 100 cm^3 de muestra.

(Continúa)

- a.3) En el caso de leche condensada y evaporada mezclar muy cuidadosamente utilizando un agitador adecuado para raspar el material adherido a las paredes y al fondo del recipiente. Del contenido mezclado, trasladar de 2 a 3 litros a un recipiente más pequeño y agitarlo. Tomar no menos de 100 cm³ de muestra.

b) *Productos sólidos.*

- b.1) En el caso de productos sólidos, cuando la capa superficial no hace parte de la muestra, retirarla del área de muestreo con una espátula, cuchillo o cuchara estériles, hasta no menos 5 mm de profundidad y tomar la muestra con otro instrumento estéril. Si el producto es un polvo, la capa superficial se retira antes de mezclar. Si el alimento está formado por capas o extractos, separadamente y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.
- b.2) En el caso de mantecas, margarinas, mantequillas a granel y el producto está en bloque, y para que la muestra no sea inferior a 100 g, realizar dos sondajes o más introduciendo una sonda verticalmente en el centro del bloque. Si el producto se encuentra en barriles, insertar la sonda diagonalmente a través de la masa del producto desde el borde del barril sin que penetre en la superficie del fondo. En los dos casos, hacer girar la sonda una vuelta completa y retirar el material por completo. Sostener la punta de la sonda encima de la abertura del frasco estéril, y con un cuchillo o espátula transferir inmediatamente la muestra de la sonda en pedazos de aproximadamente 75 mm. Dejar una porción de aproximadamente 25 mm o más de largo para obturar el agujero dejado por la sonda. No permitir que estos productos entren en contacto con papel o superficies absorbentes (porcelana) del agua o grasa. Los productos congelados hasta el punto de resistir la presión de la sonda deben ser ablandados manteniéndolos por 24 h a 10°C.

5.3.2.3 *Productos a granel congelados.* Para muestrear estos productos utilizar brocas, saca bocados y otros instrumentos cortantes estériles. Los productos congelados deben mantenerse en su estado congelado hasta su llegada al laboratorio (ver 6.7). Se debe evitar descongelar y congelar nuevamente la muestra.

- a) La toma de muestras de piezas o bloques de alimentos de gran tamaño se puede realizar de la siguiente manera: sobre el alimento asegurar, con la copa hacia arriba, un embudo plástico estéril con el vástago recortado por donde se introduce la broca estéril de un taladro. Las virutas del alimento son conducidas a la superficie y se acumulan en la copa del embudo. Transferir estas virutas a un frasco estéril para muestras. Inmediatamente identificar la muestra y acondicionarla para su envío al laboratorio.

5.3.2.4 *Toma de muestras de superficies vivas.* Utilizando un hisopo humedecido, frotar la superficie de la palma de una mano, la superficie interna de los dedos y de las uñas (ver 5.3.2.7 literal b.1). También se puede realizar mediante la técnica del lavado: colocar la mano dentro de una funda plástica, verter 50 cm³ de diluyente y frotar con el líquido las palmas, entre los dedos y uñas.

5.3.2.5 *Toma de muestras de superficies inertes.*

- a) Botellas, envases, recipientes, utensilios pueden muestrearse mediante lavado, y si es posible, con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1). Prestar especial atención a la porción de los utensilios que se introduce en la boca, por ejemplo, borde superior interno y externo de copas y vasos, porción cóncava de cucharas, etc. De los platos, la parte que entra en contacto con los alimentos.

(Continúa)

- b) La toma de muestras de superficies lisas puede realizarse con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1) o con cilindros de agar. El cilindro de agar es un medio de agar estéril solidificado dentro de un tubo plástico estéril. Asépticamente, cortar uno de los extremos del cilindro, presionar la superficie de agar descubierta contra la superficie en estudio, con un escalpelo estéril cortar una rodaja y colocarla en una placa Petri, con la superficie sembrada hacia arriba. Identificar la muestra.
- c) Las superficies lisas también se pueden muestrear utilizando un portaobjeto (ver 5.3.2.7 literal b.3).

5.3.2.6 Toma de muestras destinadas al análisis de bacterias anaerobias. Evitar que las muestras que contienen bacterias anaerobias entren en contacto con el aire, por ejemplo, de los tejidos profundos no tomar muestras pequeñas. Si esto no es posible y si se utilizan hisopos, humedecer el hisopo en el medio de transporte de Stuart (medio reducido), ver NTE INEN 1529-1 y una vez tomada la muestra, colocar el hisopo en un tubo que contenga este medio.

5.3.2.7 Otros

- a) *Quesos grandes.* En el caso de quesos grandes tomar de las diferentes partes suficientes submuestras, hasta completar una muestra de por lo menos 100 g. De los maduros, retirar la envoltura externa y dejar intacta la interna (costra, cera, películas plásticas o de tela en los quesos sin corteza). Dependiendo de la forma, la masa, el tipo y el grado de madurez del queso, utilizar una de las siguientes técnicas:

- a.1) *Toma de muestras por medio de cortes.* Si el queso tiene una base circular, con un cuchillo con hoja puntiaguda, hacer dos cortes radiales a partir del centro del queso, y si tiene una base rectangular, hacer dos cortes paralelos con los lados. El tamaño de la pieza obtenida debe ser de tal manera, que una vez eliminada la capa superior incomedible, la porción comestible restante no sea inferior a 100 g.

- a.2) *Toma de muestras por medio de una sonda.*

- a.2.1) En una de las superficies planas, por lo menos a 10 cm del borde, insertar oblicuamente hacia el centro una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro, una o varias veces.

- a.2.2) Insertar la sonda perpendicularmente por una de las superficies del queso hasta llegar, pasando por el centro, al lado opuesto.

- a.2.3) Por la superficie vertical del queso, a igual distancia entre las dos superficies planas, insertar la sonda horizontalmente hasta el centro del queso.

- a.2.4) De los quesos contenidos en barriles, cajas u otros recipientes de dimensiones grandes, o de los quesos que forman cubos grandes compactos, la muestra puede tomarse insertando la sonda oblicuamente, desde arriba hacia abajo, por el contenido del recipiente.

- a.2.5) En el caso de quesos duros de grandes dimensiones, si el queso tiene envoltura interna, frotar con etanol al 70% (V/V) el sitio de muestreo e insertar una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro. Girar la sonda una vuelta completa y retirar el pedazo. Si no se necesita una muestra de la superficie, guardar la parte exterior (mínimo 2 cm) que contiene la envoltura interna para obturar el agujero(s) hecho en el queso y el resto del pedazo(s) con un escalpelo o un cuchillo estériles transferir asépticamente al frasco de muestra. Repetir este procedimiento hasta obtener una muestra no menor de 100 g. Con los tapones, obturar los agujeros con cuidado, y si es posible, cubrir con un compuesto sellante adecuado, ver NTE INEN 1529-1.

(Continúa)

b) *Toma de muestras de canales vacunas y ovinas.* Muestrear las canales con una de las siguientes técnicas:

- b.1) *Hisopos o torundas.* Con guantes estériles colocar la plantilla (ver 4.2.2) sobre la superficie que se va a muestrear. Tomar asépticamente un hisopo, abrir un tubo que contenga el diluyente adecuado, humedecer el hisopo y con movimientos rotatorios presionarlo contra las paredes del tubo para retirar el exceso de diluyente. Friccionar fuertemente el área de la superficie que se va a examinar, haciendo frotos paralelos con una ligera rotación del hisopo. Friccionar nuevamente la superficie haciendo trazos paralelos perpendiculares a los anteriores, repetir tres veces este proceso humedeciendo cada vez el hisopo. Cuidar que se frote toda el área elegida. Regresar el hisopo al tubo y con una tijera estéril o cualquier otro implemento cortar o quebrar el palillo y dejar caer la cabeza dentro del tubo, tapar el tubo con la tapa de rosca y colocarlo en un envase a prueba de agua, acondicionar el envase con hielo picado o cualquier otro refrigerante disponible. Si el bastón no es de madera, agitar el hisopo en el tubo 10 veces hacia arriba y abajo. Identificar la muestra. Para realizar recuentos, utilizar la cantidad necesaria del diluyente para obtener una dilución inicial de 10^{-1} .
- b.2) *Toma de muestras por disección.* Con un escalpelo y pinza estériles tomar lonchas superficiales muy delgadas de aproximadamente 2 mm de espesor de la herida del sacrificio, región pectoral, costado, regiones sacra, anal, renal y cuello. De las canales de cerdo, tomar a partir del cuello y del área situada detrás de las orejas. Colocar las lonchas en el frasco para muestras. Tomar una muestra no menor de 100 g
- b.3) *Toma de muestras con portaobjetos.* Este método se utiliza especialmente para recuentos directos. Presionar un portaobjeto estéril contra la muestra del alimento, identificar y dejar que se seque. Enviar al laboratorio donde se fija, tiñe y se observa al microscopio. Para determinaciones cualitativas rápidas de la microflora dominante proceder de la siguiente manera: después de presionado el porta contra la superficie de la carne aplicar el porta a la superficie de agar de una placa y retirarlo con una pinza estéril y luego incubar la placa.

6. ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO.

6.1 Enviar las muestras al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

6.2 Manipular y empacar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda a cerca de su identidad.

6.3 Siempre que sea posible, se deben enviar las muestras al laboratorio en su envase original, sin abrir. Todas las muestras envasadas, para su envío deben empacarse con materiales que puedan absorber los golpes para evitar que sufran daños durante el transporte.

6.4 Los productos de vida comercial prolongada, no necesitan de precauciones especiales excepto, por ejemplo: evitar temperaturas por encima de 45°C para los productos enlatados (latas en su estado normal) y ambientes húmedos para los productos en polvo.

6.5 Las latas hinchadas se deben refrigerar y enviarlas acondicionadas con mucho papel y material amortiguador y material refrigerante.

(Continúa)

6.6 Los productos perecederos no congelados se enfrían hasta 0 a 5°C, sea en un refrigerador o más rápidamente en un baño de hielo (en fundas plásticas) y se los envía en recipientes isotérmicos, cubiertos con una bandeja que contenga suficientes fundas plásticas con hielo picado o una mezcla de polialcoholes congelados, para mantener la temperatura de 0 a 5°C hasta su llegada al laboratorio. No utilizar hielo suelto ya que si el envase se revienta o tiene fugas puede contaminar el producto. Si se utiliza hielo seco, acondicionar la muestra de manera que no entre en contacto con el hielo para evitar su congelamiento.

6.7 Productos congelados, las muestras de estos productos se deben recoger en recipientes pre-enfriados y colocarlos inmediatamente en un congelador, o en hielo seco. Enviar al laboratorio en un recipiente isotérmico, o en caja de cartón, con nieve carbónica (dióxido de carbono sólido). Evitar que las muestras congeladas, tomadas en fundas plásticas, entren en contacto directo con el hielo seco porque el plástico se torna friable y puede romperse. Utilizar papel u otro material adecuado para proteger la muestra. Como control que la muestra no se ha descongelado durante el transporte, colocar dentro del paquete un recipiente con trocitos de hielo que deben estar intactos a la llegada del paquete con las muestras.

6.8 Indicar claramente sobre el paquete si la muestra es peresible o no, la temperatura a que debe mantenerse, refrigerada en hielo seco, si es frágil, etc.

6.9 Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma (ver 5.1.4).

7. RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO.

7.1 Chequeo de las condiciones de las muestras. Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

7.1.1 Etiquetado e informe. Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras (ver 5.1.2 y 5.1.4).

7.1.2 Estado de los envases. Chequear cuidadosamente si el envase tiene defectos, tales como: fisuras, perforaciones, fugas, deformaciones; fracturas y tapas flojas en los de plástico; perforaciones en fundas plásticas.

7.1.3 Control de la temperatura. Anotar la temperatura de las muestras perecederas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio en su estado congelado, controlar si no ha habido descongelamiento (ver 6.7). Las muestras frescas perecederas deben tener una temperatura entre 0 a 5°C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

7.1.4 Apego al programa de muestreo. Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado.

7.2 Almacenamiento de las muestras. Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de la luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:

7.2.1 Productos congelados, a -20°C, máximo hasta siete días.

7.2.2 Productos perecederos no congelados, entre 0°C y 5°C, por no más de 24 horas.

7.2.3 Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.

7.2.4 Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0°C y 4°C, hasta 12 h.

(Continúa)

8. PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS

8.1 Generalidades. Implica la preparación en el laboratorio de una submuestra de modo que sea tan representativa como sea posible de la muestra de población de la cual procede.

8.1.1 Si es posible, realizar los ensayos de las muestras luego después de la recepción en el laboratorio. Las muestras deben manipularse asépticamente y de preferencia sin interrupciones, si éstas son inevitables, deben ser lo más cortas posible y el producto se debe mantener en refrigeración durante este período.

8.1.2 Antes de manipular la muestra limpiar el área de trabajo y sus proximidades, e inmediatamente desinfectar el área con etanol al 70% o con cualquier otro desinfectante.

8.1.3 En muchos casos la unidad de muestreo, sin preparación adicional alguna, puede utilizarse como unidad de muestra. Si se necesita mezclar dos o más unidades de muestreo para formar la unidad de muestra, transferir las unidades de muestreo a un recipiente estéril suficientemente grande y mezclar bien.

8.1.4 Antes de abrir cualquier envase, sean éstos rígidos o semirígidos, limpiar externamente el envase con jabón o detergente y agua, secarlos con papel toalla y, en las proximidades de la tapa o en el área donde se va a abrir el envase flamear (con o sin etanol al 70% v/v evitando sobrecalentamientos) o aplicar una mezcla desinfectante que se le deja secar sin aplicar calor; sin embargo, cuando el envase o el material del embalaje es muy delgado y no resiste el proceso de limpieza omitir este paso y desinfectar con mucho cuidado. Cuando el envase puede removerse sin riesgo alguno de contaminar el producto, entonces, la limpieza y desinfección del envase no son necesarias. Todas las manipulaciones, durante y después de la abertura deben realizarse en condiciones tan asépticas como posible y de preferencia sin interrupciones; utilizar una cámara de flujo laminar vertical, si es posible. Durante cualquier interrupción se debe mantener el producto bajo refrigeración. El intervalo entre la agitación de la muestra y la remoción de la unidad analítica no debe ser mayor de tres minutos, y se debe tener cuidado para eliminar, incluso, cualquier espuma de la unidad analítica.

8.1.5 Abrir los envases de lata por la tapa no codificada, cuidando de no dañar el doble cierre.

8.1.6 Al tomar muestras de latas abombadas deben observarse las siguientes precauciones a fin de disminuir la salida violenta del contenido:

8.1.6.1 Abrir las latas abombadas en sitios especiales y NUNCA deben abrirse en áreas destinadas a pruebas de esterilidad.

8.1.6.2 Antes de abrir, refrigerar la lata lavada y seca.

8.1.6.3 Colocar la lata en una bandeja poco profunda que contenga una mezcla desinfectante, ver NTE INEN 1529.1. Si se sospecha la presencia de *Clostridium botulinum*, la bandeja debe contener una solución saturada de carbonato de sodio.

8.1.6.4 Desinfectar la lata frotando una mezcla desinfectante y dejando secarse, pero, NUNCA aplicando calor.

8.1.6.5 Para tapar la lata, utilizar un embudo de vidrio que tenga el vástago largo y firmemente taponado con algodón hidrófilo, a través del cual pasa un varilla de acero con su extremidad inferior afilada (todo el aparato debe estar envuelto, y esterilizado). Cubrir la lata con el embudo y sobre la tapa de ésta hacer descansar el extremo afilado de la varilla, y luego, cuidadosamente, golpear la varilla.

8.1.6.6 Abrir la lata después que la presión ha descendido, y según proceda, continuar con uno de los procedimientos indicados a continuación:

(Continúa)

8.2 Procedimiento

8.2.1 Líquidos

8.2.1.1 Si el espacio de cabeza es lo suficientemente grande, se debe mezclar el producto agitando el envase 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm. Se puede utilizar un homogeneizador estandarizado para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos.

8.2.1.2 Si el espacio de cabeza es pequeño, mezclar el producto invirtiendo el envase 25 veces y luego:

- a) retirar una porción de líquido hasta que haya suficiente espacio de cabeza y entonces mezclar mediante agitación (ver 8.2.1.1); o
- b) transferir la muestra completa, o un parte de ella, a un envase estéril de tamaño adecuado y agitando mezclar bien (ver 8.2.1.1). En el caso de muestras líquidas con gas, incorporar unas perlas de vidrio estériles y agitar.

8.2.2 *Polvos.* Seguir los procedimientos indicados en 8.2.1.1 y 8.2.1.2 utilizando una espátula estéril.

8.2.3 *Productos congelados.* Si las muestras están congeladas, utilizar una de los siguientes procedimientos:

8.2.3.1 Descongelarlas parcialmente en su recipiente original cerrado (o en el que llegó al laboratorio), por no más de 24 h en un refrigerador entre 2°C y 5°C. Cuando se necesitan más de 24 h para descongelar las muestras, se pueden colocar en un baño de agua a una temperatura menor de 37°C y se les mantiene solo hasta que se fundan (máximo hasta 15 minutos, pero, la temperatura debe permanecer baja para evitar lesionar a los microorganismos) o, a temperatura ambiente por no más de 1 hora.

8.2.3.2 Si la muestra congelada puede picarse fácilmente, el descongelamiento no es necesario.

8.2.3.3 Con productos fácilmente descongelables (productos obtenidos con taladro, por ejemplo: jujos congelados, huevos congelados, etc.), se les descongela en un baño de agua o a temperatura ambiente, según se indica en 8.2.3.1.

8.2.3.4 Los helados se funden según se indica en el numeral 8.2.3.1 (si se encuentran en su envase original primero se los transfiere a un frasco estéril con tapa). Mezclar bien la muestra fundida.

8.2.4 Mantequilla, margarinas y mantecas.

8.2.4.1 Colocar la muestra de mantequilla en el refrigerador (4°C ± 1°C), hasta que se tome dura y se pueda cortar.

8.2.4.2 Con utensilios estériles, dividir la muestra de mantequilla, margarina o manteca en tres partes y del centro de cada una de estas superficies (no contaminadas) que quedan expuestas, pesar la unidad analítica en un frasco y añadir el diluyente (ver 4.3.11) a 32°C, en un volumen necesario para completar, juntamente con la fase acuosa, dos veces la unidad analítica, por ejemplo: las mantequillas y margarinas que tengan una humedad de 16%, pesar 25 g de muestra y añadir 46 cm³ de diluyente; si se pesan 50 g, añadir 92 cm³.

8.2.4.3 En el caso de las mantecas añadir un volumen igual a dos veces la muestra: 25 g de muestra y 50 cm³ diluyente.

8.2.4.4 Colocar el frasco en un baño de agua a no más de 45°C y, evitando un calentamiento excesivo, agitar hasta que la muestra y el diluyente se mezclen completamente.

(Continúa)

8.2.4.5 Conservar el frasco en el baño de agua hasta que la materia grasa se separe de la fase líquida. Utilizar esta fase líquida para las determinaciones microbiológicas: 2 cm³ de este líquido corresponden a 1 g de muestra y 0,2 cm³ a 0,1 g. Continuar el ensayo según lo indicado en 9.2.1.2

8.2.5 *Mayonesa.* Preparar la muestra según lo indicado en 8.2.4

8.2.6 *Carnes y otros productos.* Cuando por su naturaleza, el producto en análisis puede causar dificultades si se homogeneiza directamente, entonces, antes de manipular, asépticamente proceder según 8.2.6.1 y/o 8.2.6.2

8.2.6.1 *Picado.* Colocar el material en una superficie estéril, cortar en cubos de 1 cm³ y continuar según lo indicado en 8.2.6.2.

8.2.6.2 *Trituración.* Colocar el material (picado o no) en un frasco estéril, adicionar el exudado que hubiere, mezclar, homogeneizar dos veces y continuar según lo indicado en 9.2.2.

8.2.7 *Canales de aves y productos misceláneos.* Anotar el peso de la muestra, colocar la canal en una funda plástica estéril y lavar con 300 cm³ de agua peptonada al 0,1% friccionando la superficie de la muestra durante 30 segundos. Aplicar este procedimiento a frutas secas, cereales, legumbres y ensaladas, lavando con una cantidad de diluyente 10 veces el peso de la muestra. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3

8.2.8 *Hisopos o torundas.* Al tubo que contiene el hisopo juntamente con el diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1) y 5.3.2.4), agitarlo vigorosamente, haciendo 50 ciclos completos de 15 cm en 10 segundos golpeando contra la palma de la otra mano, para desprender los microorganismos de la superficie del hisopo. La dispersión obtenida se puede diluir decimalmente. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3.

8.2.9 *Productos formados por capas.* Si el alimento está formado por capas o extractos, examinar una porción de 10 g del paquete completo o, separadamente, preparar una suspensión inicial de cada una de estas partes, dependiendo del propósito del ensayo. Preparar como se indica en 9.2.2.

9. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL O DILACIÓN PRIMARIA Y OTRAS DILUCIONES

9.1 Generalidades.

9.1.1 El tamaño de la unidad muestra generalmente es 10 g ó 10 cm³ o un múltiplo de 10 y, debe ser tal, que permita realizar todos los ensayos requeridos.

9.1.2 Para la detección de *Salmonella*, en general, preparar la suspensión inicial con una unidad de muestra de 25 g (cm³) y 225 cm³ del diluyente indicado en la NTE INEN 1529-15. Si la unidad de muestra prescrita difiere de 25 g, utilizar la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución de aproximadamente 1/10 (masa/volumen). Ver nota 5.

NOTA 5 Con el objeto de reducir la sobrecarga de trabajo en el laboratorio, y cuando hay evidencias de que la mixtura de dos o más unidades de muestra no afecta el resultado para aquel alimento particular, existe la alternativa de preparar unidades de muestra compuesta. El tamaño máximo de una unidad de muestra compuesta es de 375 g (15 unidades de muestra de 25 g). Por ejemplo, si es necesario analizar 10 unidades de muestra de 25 g, se mezclan las 10 unidades para formar una unidad de muestra compuesta de 250 g y se adicionan 2,25 litros del diluyente, ver NTE INEN 1529-15. Alternativamente, se puede preparar una muestra compuesta transfiriendo alícuotas de 0,1 cm³ de cada uno de los 10 cultivos de pre-enriquecimiento a un frasco que contenga 100 cm³ de caldo RV, o alícuotas de 10 cm³ a un frasco que contenga 1 litro de caldo selenito cistina o caldo tetrationato.

(Continúa)

9.1.3 Mezclar la unidad de muestra o porción de ensayo con un volumen de diluyente igual a nueve veces el peso de la unidad analítica. Si se obtiene una suspensión inicial demasiado viscosa o espesa adicionar más diluyente. Esto se debe tener en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o expresión de resultados.

9.1.4 Para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de la temperatura, la temperatura de los diluyentes debe ser aproximadamente la misma de la muestra, a menos que haya otra indicación.

9.1.5 La preparación de la suspensión inicial de algunos tipos de productos necesitan de cuidados especiales, tales como:

9.1.5.1 Calentar a temperaturas inferiores a 45°C por no más de 15 minutos productos como el cacao en polvo, gelatina, productos en polvo, mantecas, mantequillas. Para los quesos utilizar el diluyente a 44°C ± 1°C.

9.1.5.2 Neutralizar los alimentos ácidos con una solución estéril de fosfato tripotásico al 8%, antes de preparar la suspensión inicial.

9.1.5.3 Reconstituir los productos deshidratados y revitalizar a los microorganismos lesionados por los procesos de elaboración y almacenamiento de los productos alimenticios.

9.1.5.4 Para productos grasosos o pulverulentos que forman grumos adicionar al diluyente un agente humectante tal como el "Tergitol Aniónico 7" (1% m/v).

9.1.5.5 Cuando se va a realizar recuento de esporos, a la suspensión inicial, inmediatamente después de preparada, someterla a un tratamiento térmico (por ejemplo, 80°C por 10 minutos) seguido de un enfriamiento rápido en un baño de agua helada.

9.2 Suspensión inicial o dilución primaria (10^{-1})

9.2.1 Líquidos: Productos líquidos no viscosos (agua, leche, jugos, enjuagues, etc.) en los cuales los microorganismos se distribuyen homogéneamente o que fácilmente se los puede homogeneizar por medios mecánicos; fase líquida de mezclas heterogéneas que se considera que es lo suficientemente representativa de la muestra en conjunto (fase líquida de las grasa vegetales o animales) y productos líquidos viscosos.

9.2.1.1 Líquidos no viscosos, con una pipeta estéril transferir 10 cm³ a un frasco y añadir 90 cm³ de diluyente. Mezclar cuidadosamente esta solución agitando el frasco 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm, o aspirando 10 veces con una pipeta estéril, o utilizando un homogeneizador tipo "vortex" por 5 a 10 segundos. Seleccionar la velocidad de tal manera para que el líquido, en torbellino, suba hasta 2 o 3 cm del borde del vaso. Si se requieren otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.2 De las mantequillas y mantecas, de la fase líquida (ver 8.2.4.5) tomar 2 cm³ y añadir 8 cm³ de diluyente, se obtiene la dilución 10^{-1} . Para otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.3 Enjuagues, la solución de enjuague obtenida en los numerales 8.2.7 y 8.2.8 constituye la dilución primaria, siempre que, para el enjuague se utilice el volumen adecuado de diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1). Para otras diluciones, continuar como se indica en 9.3.

9.2.1.4 De los líquidos viscosos y helados fundidos (ver 8.2.3.4) pesar 10 g de muestra en 90 cm³ de diluyente y mezclar bien mediante agitación (para pesar, se puede utilizar una cuchara o una pipeta, dependiendo de la consistencia de la muestra). Para otras diluciones continuar según lo indicado en 9.3.

(Continúa)

9.2.2 Productos sólidos. (Ver notas 6)

9.2.2.1 Pesar con una precisión de 0,1 g en un frasco (si se utiliza homogeneizador rotatorio), o en una funda plástica (si se utiliza "stomacher") 10 g (o un múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la submuestra preparada. Añadir 90 cm³ de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10⁻¹).

9.2.2.2 Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pasar a la velocidad entre 15 000 a 20 000 rpm. Cuidar escrupulosamente que el tiempo de homogeneización a alta velocidad no exceda los dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto.

9.2.2.3 Hacer funcionar el "stomacher" 1 ó 2 minutos, según la naturaleza del producto (ver nota 6.2).

9.2.2.4 Si es necesario, dejar en reposo hasta 15 minutos para que las partículas grandes se sedimenten. Para preparar otras diluciones utilizar la capa superficial y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa.

9.3 Otras diluciones. (Ver nota 7)

9.3.1 Si la dilución primaria se homogeneizó con pipeta, utilizar la misma pipeta para transferir 1 cm³ de la suspensión inicial (dilución 10⁻¹) a otro tubo que contenga 9 cm³ de diluyente estéril a la temperatura adecuada, evitar que la pipeta entre en contacto con el diluyente y con otra pipeta estéril mezclar cuidadosamente. De esta manera se obtiene la dilución 10⁻².

9.3.2 Si es necesario, repetir lo indicado en el numeral 9.3.1 para la dilución 10⁻³ y siguientes diluciones, hasta obtener el número necesario de diluciones y alcanzar el número adecuado de microorganismos por cm³. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

9.4 Duración del procedimiento. El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y la mezcla de las diluciones con el medio de cultivo (descrito en el método específico de ensayo) no debe ser mayor que 45 minutos. El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el inicio de la preparación de las siguientes diluciones no debe exceder los 30 minutos.

9.5 Revitalización

9.5.1 Los microorganismos presentes en los alimentos pueden estar lesionados o debilitados debido a los tratamientos que se utilizan en el procesado de alimentos. Entre los tratamientos que lesionan a los microorganismos tenemos el calor, frío, desecación, liofilización, congelación, baja actividad de agua e irradiación. Los tratamientos químicos adversos como carencia de nutrientes, pH bajo, preservantes y exposición a desinfectantes.

NOTAS 6:

6.1 Con algunos productos no es aconsejable utilizar el "stomacher" (por ejemplo, los que tienen elementos puntiagudos o cortantes, o aquellos que no se disgregan fácilmente), pudiéndose utilizar siempre que haya evidencia (datos publicados o ensayos comparativos) que los resultados obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos con un homogeneizador rotatorio.

6.2 Prestar atención al hecho que para determinados productos, en especial cereales, los tiempos de 1 y 2 minutos no son adecuados para microorganismos tales como los mohos y levaduras. En este caso el "stomacher" permite una mejor recuperación que el homogeneizador rotatorio. Hacer funcionar el "stomacher" por 10 minutos evitando separaciones, ya que se pueden perder algunos mohos y levaduras del líquido sobrenadante.

NOTA 7 Para las pruebas de presencia o ausencia de microorganismos en 0,1 cm³ ó 0,1 g de producto, no se necesita preparar las siguientes diluciones.

(Continúa)

9.5.2 El número de microorganismos que son detectados en los diferentes medios depende de la severidad y duración de las condiciones adversas, tipo de microorganismos presentes y la composición del medio utilizado, especialmente si es selectivo.

9.5.3 Cuando es necesario, los procedimientos de revitalización están incluidos en las secciones pertinentes de las NTE INEN 1529.

(Continúa)