



## **LABORATORIO MICROBIOLÓGICO EN CERVECERÍAS**

LABORATORIO PARA CERVECERÍAS  
NORMAS DE TRABAJO EN LABORATORIOS  
ELEMENTOS Y MATERIALES MÁS FRECUENTES  
DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA  
MANEJO DE MICROORGANISMOS EN EL  
LABORATORIO  
ESTERILIZACIÓN  
MEDIOS DE CULTIVO  
DESCRIPCIÓN DE COLONIAS EN CAJA  
TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA



## CAPÍTULO 5: LABORATORIO MICROBIOLÓGICO EN CERVECERÍAS

*Gallace, María Eugenia y Dalmasso, Lucas Pablo*

La microbiología cervecera es la rama de la microbiología de los alimentos, que se encarga del análisis de la composición microbiana de cervezas y mostos, mediante técnicas que permiten la detección de diferentes agentes microbianos, e incluye las técnicas de recuento y viabilidad de levaduras para su posterior reutilización.

Esta disciplina asume el análisis de aspectos positivos que tienen los microorganismos sobre las cervezas, como la producción de aromas y sabores, particularmente de las levaduras y en casos excepcionales algunos géneros de bacterias. También analiza los aspectos negativos que tienen los microbios sobre las cervezas, como la alteración de sus características sensoriales.

Los microorganismos se encuentran en todos los hábitats, en el cuerpo humano, los alimentos, el suelo, las plantas, el aire y en toda superficie a nuestro alrededor, es decir las cervezas no son estériles. Aquellos microorganismos que poseen los alimentos de manera natural, se los conoce como flora normal. La flora de un alimento se puede clasificar de acuerdo al tipo de microorganismo que contenga, en algunos casos pueden ser beneficiosos, como la flora microbiana de la cerveza que en su composición normal son levaduras. En otros casos perjudiciales, como podría ser la flora alterada de cervezas descompuestas por bacterias productoras de ácido acético.

En este capítulo del manual se abordan las funciones de un laboratorio en las cervecerías, las normas de seguridad y los principios básicos del manejo de microorganismos en el laboratorio.

### 5.1 LABORATORIO PARA CERVECERÍAS

Una microcervecería debe contar, indefectiblemente, con un laboratorio para lograr estabilidad en la calidad de los productos elaborados. La inversión en equipamiento de laboratorio dependerá en gran medida del volumen de producción de la cervecería; sin embargo, no es necesario un gran espacio físico, puede ser desde un lugar pequeño en el cual se realizan determinaciones sencillas, hasta un laboratorio totalmente equipado para determinaciones más complejas.

Un laboratorio de microbiología cervecera es un lugar convenientemente adecuado donde se pueden manejar y examinar microorganismos, que puede constar de un lugar seguro para almacenar medios y reactivos, una mesada de trabajo con mechero de bunsen y bacha para la limpieza de material, un área de esterilización, una zona de incubación y una mesa para apoyar el microscopio y realizar las observaciones. Es recomendable contar con al menos dos ambientes, y reservar uno para la manipulación de microorganismos exclusivamente.

La importancia de tener un laboratorio propio en un microcervecería radica en tres funciones principales: **1)** permite determinar la calidad microbiológica en crema de levaduras, cervezas en producción y terminadas, para establecer las posibles fuentes de contaminación; **2)** hace posible la reutilización de levaduras a través de los análisis microscópicos y la determinación de la concentración de células de levadura y su viabilidad; y **3)** establece la calidad físico-química mediante análisis de materias primas, productos en proceso y terminados. Para este último punto, es necesario contar con equipamiento de laboratorio costoso que solo son accesibles a centros de investigación, malterías, cervecerías industriales y algunas cervecerías artesanales con alto volumen de producción. Algunas de las técnicas de calidad físico-químicas son extracto potencial de maltas, concentración de alfa y beta ácidos en lúpulos, color, amargor y concentración de etanol en cervezas, que no serán abordadas ya que exceden los objetivos de este manual.

Cada empresa debe esforzarse por realizar al menos algunas determinaciones básicas *in situ* que les permitan obtener información rápida y tomar decisiones críticas sobre la calidad de la cerveza. Algunos análisis son económicos y fáciles de realizar y proporcionan información importante, tanto de la elaboración del mosto como de la calidad de la fermentación.

La capacitación del personal es fundamental tanto en técnicas de laboratorio como en el análisis sensorial de las cervezas. Algunos autores proponen un programa de degustación regular que consiste en probar todos los fermentadores con cerveza, a la misma hora (todos los días laborables) y registrar la evolución de la fermentación o detalles del proceso como así también la determinación de pH y densidad, de esta manera se pueden tomar medidas correctivas y anticiparse a los problemas (White y Zainasheff, 2010).

Es fundamental brindar al mercado un producto de calidad, estable y seguro para los consumidores, en esta instancia los controles bromatológicos, tanto municipales como provinciales y nacionales, no son suficientes. El control de calidad de cada lote es una forma de evitar que cervezas en mal estado lleguen al mercado y evitar así que los consumidores tengan una mala experiencia y en consecuencia una imagen negativa de la cervecería. Esto no solo afectaría a la cervecería, sino al sector cervecero en general. Garantizar productos de buena calidad es responsabilidad de cada uno de los actores que intervienen en la cadena productiva (proveedores de insumos, productores, distribuidores, dueños de bares, centros de recarga, otros puntos de venta y el estado) y será la única manera que el sector cervecero artesanal se mantenga y desarrolle.

***“Garantizar productos de buena calidad es responsabilidad de cada uno de los actores que intervienen en la cadena productiva (proveedores de insumos, productores, distribuidores, dueños de bares, centros de recarga, otros puntos de venta y el estado) para lograr el crecimiento del sector cervecero artesanal.”***

## 5.2 NORMAS DE TRABAJO EN LABORATORIOS

Los laboratorios en general exigen tener en cuenta una serie de detalles minuciosos ya que, las técnicas son delicadas y deben cumplirse a la perfección. Es imprescindible trabajar en un espacio ordenado, respetar las normas de higiene y ser precisos, ya que frecuentemente el trabajo requiere el uso de llamas abiertas y manipulación de productos químicos que pueden ser peligrosos.

Una estricta atención a la seguridad resultará en menores riesgos de accidentes y posibles lesiones. A continuación se detallan una serie de recomendaciones a considerar antes de comenzar a trabajar:

- Utilice únicamente productos químicos correctamente etiquetados y lea atentamente los rótulos o fichas de seguridad (FDS, en inglés MSDS) donde se detallan las características de los diferentes productos que se utilizan en laboratorio, su manejo, almacenamiento, medidas ante accidentes y sus efectos sobre la salud (Ver anexo 4).
- Mantenga copias de las FDS para todos los productos químicos que utilice e indique al personal donde encontrarlas en caso de accidente.
- Almacene soluciones o mezclas en recipientes adecuados de acuerdo al tipo de producto y asegúrese de etiquetar apropiadamente ese recipiente para evitar confusiones, además permite la segregación de materiales incompatibles. De igual manera si transfiere algún producto a un contenedor secundario.

- Siga las recomendaciones del fabricante para la dilución o mezcla productos químicos compatibles.
- Asegúrese de tener extintores de incendios apropiados de acuerdo a los productos que utiliza, e instruya al personal en el uso del mismo.
- Trabaje en una superficie sellada y resistente al fuego, sin armarios bajos u otros materiales inflamables en la parte superior. Los armarios de metal son recomendables para almacenar la mayoría de los líquidos inflamables, ya que pueden ser conectados a tierra para evitar chispas estáticas durante la transferencia de líquidos, y no son tan susceptibles a los efectos del fuego.
- Se debe minimizar la presencia de materiales inflamables como cortinas, manteles, mesas de madera, almohadillas absorbentes, toallas, contenedores de residuos, entre otros.

Es importante utilizar los elementos de protección personal y seguir protocolos para prevenir cualquier posible accidente:

- Antes de ingresar al laboratorio vístase con un guardapolvo para su protección y tenga a disposición guantes de nitrilo, son la mejor opción para trabajar con líquidos a base de agua y desinfectantes oxidantes.
- Cada trabajador deberá mantener las manos limpias y el cabello de recogido o recogido.
- No comer, no beber, ni fumar durante la realización del trabajo.
- Conozca previamente las tareas a realizar en el laboratorio. Tómese un tiempo para organizar los materiales y revisar las técnicas.
- Todo material descartable debe arrojarse en envases dispuestos para tal fin.
- Registrar las observaciones y actividades que realice con el mayor detalle posible.
- Todo material en estudio debe identificarse debidamente para que pueda ser fácilmente reconocido.
- A pesar que no se trabaje con patógenos, todo el material biológico se debe considerar como peligroso y manipulado con cuidado.
- Trabajar de manera segura permitirá reconocer y anticipar peligros, y tener un plan de acción en caso de que las cosas se salgan de control.
- Ante la ocurrencia de un accidente personal con los materiales de trabajo (cortaduras, quemaduras o derramamiento de cultivos), así como exposición a sustancias químicas deberá informar de inmediato a la persona responsable del lugar y consultar a un médico.
- Antes de retirarse del laboratorio, controle que los mecheros, autoclaves, estufas de esterilización estén apagados. También las lámparas de luz artificial y las canillas de agua para evitar accidentes y contratiempos.
- Aquellos materiales de plástico descartable y el vidrio que haya estado en contacto con material biológico deben ser tratados con solución desinfectante de hipoclorito de sodio (lavandina) antes de ser arrojados, o disponerlos para su lavado y esterilización.

### 5.3 ELEMENTOS Y MATERIALES MÁS FRECUENTES DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



Figura 5.1: Mechero Bunsen.



Figura 5.2: Estufa de incubación. Es una cámara de temperatura controlada para cultivo de microorganismos. Se utiliza para facilitar el desarrollo de los microorganismos a su temperatura óptima de crecimiento.



Figura 5.3: Autoclave eléctrico automatizado.



Figura 5.4: Cabina de flujo laminar.

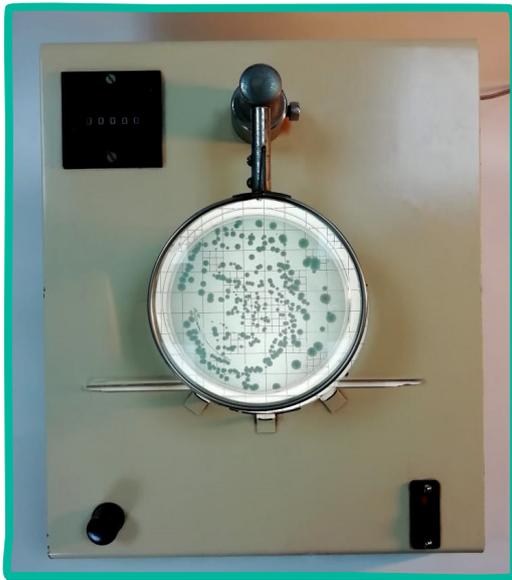


Figura 5.5: Contador de colonias. Es un aparato que mediante la iluminación de la placa de Petri y una lupa, nos permite observar con mayor nitidez las colonias y por tanto facilita su recuento.



Figura 5.6: Balanza.



Figura 5.7: Baño termostático, contiene agua y un sistema de regulación de la temperatura. Se utilizan para atemperar medios de cultivo o incluso para incubar cultivos de microorganismos.



Figura 5.8: Agitador orbital.



Figura 5.9: Vortex, sirve para agitar pequeños tubos o frascos de líquido.



Figura 5.10: Oxímetro de membrana, mide concentración de oxígeno en medios líquidos.



Figura 5.11: Microscopio óptico.

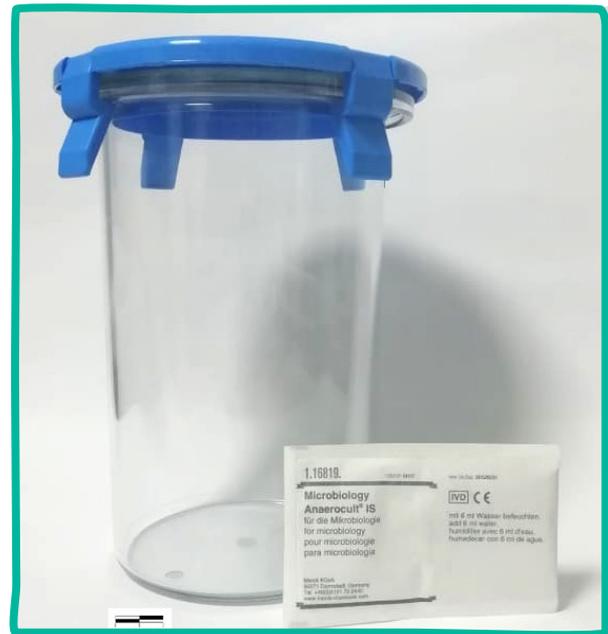


Figura 5.12: Jarra de anaerobiosis, se usa para conseguir una atmósfera libre de oxígeno para el cultivo de microorganismos anaerobios.



Figura 5.13: Ansa en anillo o de siembra.



Figura 5.14: Placas de Petri plásticas y estériles.



Figura 5.15: Placa de Petri con medio sólido.



Figura 5.16: Micropipeta automática con punta autoclavable, se utiliza para fraccionar pequeñas cantidades de líquidos. Las puntas (tips) son descartables y de distinto tamaño y color según el modelo de micropipeta.



Figura 5.17: Asa acodada o espátula de Digralsky, se utiliza para la extensión de microorganismos sobre la superficie de un medio de cultivo sólido en placa Petri.



Figura 5.18: Vasos de precipitados.



Figura 5.19: Cucharas y espátulas de laboratorio, se utilizan para fraccionar muestras o medios de cultivo.

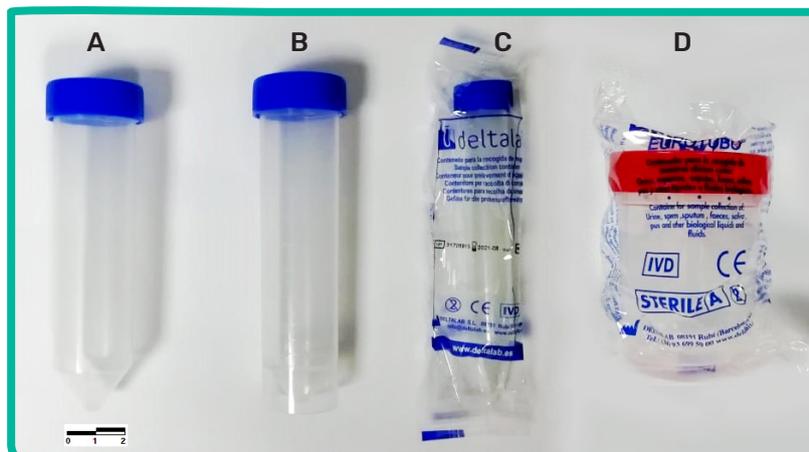


Figura 5.20: Recipientes estériles. A) Tubo cónico tipo Falcon™ de 50 mL de capacidad. B) Tubo cónico tipo Falcon™ de 50 mL de capacidad con faldón. C) Tubo cónico tipo Falcon™ estéril de 15 mL de capacidad. D) Recipiente estéril de 125 mL de capacidad.

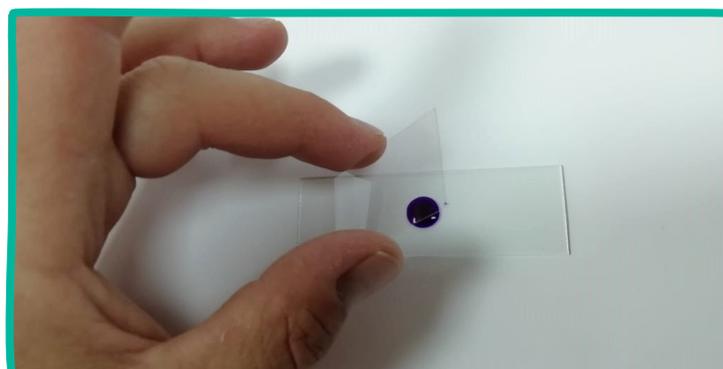


Figura 5.21: Porta y cubre objetos, para observaciones al microscopio.



Figura 5.22: Pinza de madera, permite sostener portaobjetos para secar y fijar muestras con un mechero Bunsen.



Figura 5.23: Cámara de Neubauer para recuento de células.



Figura 5.24: Frascos de tapa azul de diversos volúmenes. Se utilizan para esterilización de soluciones y medios de cultivos al resistir el proceso de esterilización en autoclave.

## 5.4 MANEJO DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO

La destreza para una adecuada manipulación de microorganismos se denomina “técnica estéril o aséptica” y requiere atender ciertos recaudos para minimizar la posibilidad de obtener errores, falsos positivos y contaminación. Las siguientes reglas generales de trabajo son ejemplos de técnica estéril:

- Desinfectar el área de trabajo con alcohol al 70% antes y después de trabajar.
- Lavarse las manos con agua y jabón y desinfectar con alcohol 70% de manera recurrente.
- Esterilizar todos los medios de cultivo y materiales que estén en contacto con muestras o cultivos microbianos.
- Disponer el instrumental a utilizar a la mano para reducir los tiempos que un recipiente o elemento estéril esté expuesto al ambiente.
- Trabajar cerca de la llama del mechero en forma constante, la corriente ascendente de la llama crea a su alrededor una atmósfera estéril y esto reduce la posibilidad de contaminación de microorganismos del ambiente.
- Mantener en posición inclinada los recipientes que estén abiertos. Esto reducirá el área expuesta a la caída de partículas.
- Para abrir un recipiente las tapas o tapones deberán ser sostenidos por el técnico de laboratorio durante toda la manipulación, no apoyarlos sobre la mesada.
- Para realizar transferencias, trasvases o estrías, se deben destapar Erlenmeyers y tubos de ensayo y flamear las bocas de estos recipientes de vidrio, luego realizar la tarea y flamear nuevamente antes de volver a taparlos.
- Esterilizar en llama abierta el anillo (debe tomar color rojo vivo) antes y después de realizar un repique, estriado o siembra. Después de utilizarla, y antes de apoyar el anillo en la mesada, debe estar estéril, en caso de duda reiterar la esterilización por fuego directo.
- Esterilizar la espátula de Digrasky, antes y después de sembrar una placa de Petri, según el siguiente método: sumergir el extremo de la espátula en alcohol, escurrir y encender con la llama del mechero Bunsen. Retirar inmediatamente la espátula del fuego directo del mechero y esperar hasta que se apague y enfríe. Procurar apoyar en la mesada de trabajo espátulas de Digrasky siempre esterilizadas. Mantener el recipiente alejado de la llama del mechero.
- **IMPORTANTE:** En caso que se encienda el recipiente con alcohol, mantener la calma, tapar el mismo para que se consuma todo el oxígeno y el fuego se apague.

## 5.5 ESTERILIZACIÓN

La esterilización es el proceso a través del cual se eliminan todos los microorganismos incluidas las esporas microbianas de cualquier objeto, superficie o medio, por remoción o muerte de estos. Se puede realizar mediante la exposición del material a diferentes agentes letales, físicos, químicos o a través de separación mecánica por filtración de los organismos. La elección adecuada del método de esterilización depende, fundamentalmente, de la naturaleza de los materiales a esterilizar y de la conveniencia (Figura 5.25). En cambio, para la desinfección se emplean distintos agentes químicos que solo disminuyen el riesgo de contaminación, sin garantizar la esterilidad, pero eliminan microorganismos patógenos.

En resumen, la elección del procedimiento y del agente apropiado está determinada por la situación específica, es decir si la eliminación es total o es necesario destruir sólo ciertas especies. En un laboratorio de microbiología cervecera es indispensable la eliminación com-

pleta de todos los organismos presentes sobre cualquier material o en su interior, como así también los medios de cultivo y el material de vidrio para el cultivo de microorganismos.

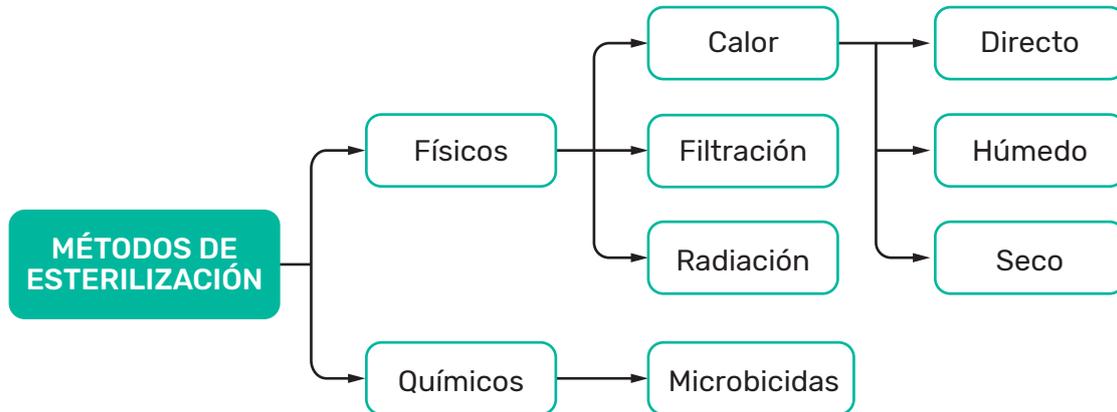


Figura 5.25: Clasificación de los métodos de esterilización.

### 5.5.1 Métodos físicos

#### 5.5.1.1 Calor Directo (Flameado)

Este método es usado para esterilizar de manera superficial cualquier material de laboratorio, agujas, ansas, espátulas, varillas de vidrio, exterior de las pipetas de vidrio, cuello de los balones y tubos de ensayos. Consiste en someter a la acción directa de la llama de un mechero Bunsen los utensilios a esterilizar, sólo en el caso del material metálico se lleva al rojo vivo.

#### 5.5.1.2 Calor Húmedo

Existen dos métodos de esterilización por calor húmedo, la esterilización por vapor saturado a presión (autoclave) y la tindalización. Si bien el agente de esterilización es el mismo, tiene variaciones en cuanto a los procedimientos.

El vapor saturado a presión es el método más utilizado en Microbiología, es rápido y seguro para esterilizar medios de cultivo, agua, soluciones, frascos, tubos de ensayo y cultivos de bacterias y levaduras que se desechan. El vapor de agua se difunde por ósmosis a través de las membranas de las formas vegetativas y esporuladas, coagulando su protoplasma, fenómeno que se acentúa si este vapor es saturado y a presión.

El dispositivo requerido es el autoclave, aparato que permite sobreelevar la presión, lo que equivale a una temperatura de ebullición del agua por encima de los 100 °C. En la Figura 5.26 se expone un ciclo típico de esterilización con autoclave automático.

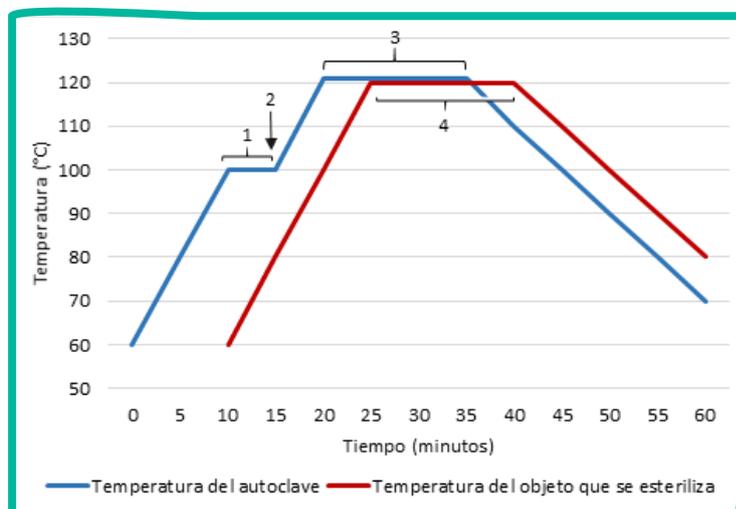


Figura 5.26: Ciclo típico de esterilización con autoclave. Línea negra: temperatura del autoclave. Línea roja: temperatura del objeto que se esteriliza. 1: Inicio de la generación de vapor. 2: Cierre de válvula de salida de vapor (espita) e inicio del aumento de la presión de vapor. 3: Tiempo de esterilización programado en el autoclave. 4: Tiempo de esterilización del objeto.

El tiempo de esterilización depende de la presión alcanzada y de la temperatura. En la tabla 5.1 se exponen presiones y tiempos recomendados, a mayor presión (mayor temperatura) se requiere menor tiempo de esterilización.

Tabla 5.1: Presiones y tiempos recomendados para ciclos de esterilización de material de laboratorio.

Relación entre presión, temperatura y tiempo			
Presión (ATM)	Presión (Kg/cm <sup>2</sup> )	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	1	120	15
¾	0,7	114	20

El modelo de autoclave Chamberland se encuentra entre los más usados (Figura 5.27), está constituido por un recipiente de cobre con una fuente calórica externa en la parte inferior. En el interior posee una rejilla sobre la cual se coloca el material a esterilizar. En la parte superior tiene una tapa de bronce con un manómetro, una válvula de seguridad y una llave de purga. La tapa se cierra herméticamente debido a una junta especial y a un mecanismo de ajuste de tornillos con tuercas mariposa.

Las capacidades y fuentes de calor de los autoclaves son variables, desde un pequeño autoclave eléctrico de pocos litros de capacidad a grandes autoclaves con mecheros a gas de 200 litros o más de capacidad. En las cervecerías, se podría reemplazar este dispositivo por una olla a presión hogareña. Si bien, las ollas tienen poca capacidad y no regulan estrictamente la presión y la temperatura, se podrían obtener resultados similares al de un autoclave.



Figura 5.27: Autoclave modelo Chamberland.

El funcionamiento del autoclave “Chamberland” es el siguiente: se introduce agua hasta llegar casi a la rejilla inferior, se coloca el material a esterilizar convenientemente acondicionándose cerrándose la tapa y ajustándose los tornillos en cruz (debe estar abierta la llave de purga). Se calienta hasta salida continua de vapor. Esto indica que todo el aire interior ha sido eliminado (se ha purgado). Para tener mayor seguridad se puede hacer burbujear en agua la salida de vapor, constatándose por la ausencia de burbujas la inexistencia de aire en el interior. Este detalle tiene mucha importancia puesto que las indicaciones manométricas son ciertas y expresan la temperatura interna solamente si se ha excluido el aire (en el interior sólo hay vapor saturado). Luego se cierra llave de purga y se continúa calentando hasta que el manómetro indique la presión adecuada, momento en el cual se empieza a contabilizar el tiempo de esterilización, regulando la llama del mechero para que la presión se mantenga constante. Cumplido el tiempo se corta el calentamiento y se deja descender la presión hasta que el manómetro marque cero, luego se abre la llave de purga muy lentamente dejando

entrar el aire (esto sucede porque el interior se encuentra a presión negativa respecto a la atmosférica). Se abre el autoclave, se retira con precaución el material húmedo, y se lo coloca a temperatura ambiente para secarlo.

El proceso de tindalización también se efectúa con autoclave, pero con la llave de purga abierta (sin sobrepresión). Se utiliza para medios de cultivo que pueden alterarse por exposición a temperaturas más elevadas (medios con carbohidratos fácilmente hidrolizables o gelatina). Estos medios se calientan a 100 °C por 30 minutos al día durante tres días consecutivos. En el primer hervor se eliminan las células vegetativas, cualquier espora que sobreviva germinará en los intervalos dando formas vegetativas que serán destruidas durante los calentamientos posteriores. Este método también puede efectuarse colocando el material a esterilizar en una olla con tapa y algo de agua en la base de la misma.

#### 5.5.1.3 Calor Seco

El empleo de calor seco como medio de esterilización es de gran difusión por su sencillez. Como el calor seco se transfiere más lentamente que el calor húmedo, los tiempos y temperaturas de esterilización son mayores (160-170 °C durante 60 minutos). El horno de esterilización tiene una doble pared dentro de la cual circula el aire caliente lo que asegura un calentamiento uniforme, además posee una regulación del flujo de aire y un termómetro que indica la temperatura interior. Este procedimiento se utiliza para esterilizar material de vidrio o metálico previamente acondicionado envuelto en papel o cajas metálicas (cajas de Petri de vidrio, pipetas de vidrio, pinzas metálicas). **IMPORTANTE:** este método no es apto para líquidos ni medios de cultivo.

#### 5.5.1.4 Filtración

Los filtros pueden ser de porcelana, yeso, vidrio incrustado, siendo los más comunes los de membrana. Los filtros se ubican en un portafiltros y la filtración se realiza por succión y succión más presión. Las bacterias son eliminadas de las soluciones debido al “efecto colador” por el tamaño de los poros. Se emplea para aquellas sustancias que son alteradas por el calor en sus estructuras y características físico-químicas, sueros, soluciones de enzimas o toxinas bacterianas.

Las cabinas de flujo laminar utilizan un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro especial para brindar aire estéril a una mesada de trabajo. Estos filtros de aire se denominan HEPA (High Efficiency Particulate Air) y están compuestos por pliegues de acetato de celulosa que retienen las partículas (incluidos los microorganismos) que contiene el aire que sale de la campana del flujo laminar. Este equipo brinda láminas de aire estéril sobre la mesada de trabajo para poder manipular microorganismos y reducir así el riesgo de contaminación (Figura 5.4).

#### 5.5.1.5 Radiación

En el espectro de luz, la región ultravioleta (UV) entre 2400 a 3000 Å, es la que tiene mayor acción antimicrobiana. El material genético (ADN) tiene un pico de absorción a los 2650 Å e interfiere en la correcta replicación y función del ADN, como consecuencia la célula bacteriana pierde la capacidad de reproducirse.

Este método es empleado para desinfección de aire o superficies debido a que las radiaciones UV no tienen poder de penetración. Para emplear este método se utilizan lámparas germicidas (Figura 5.28). **IMPORTANTE:** la exposición a la radiación UV también es peligrosa para los humanos, por eso se deben tomar medidas de seguridad.



Figura 5.28: Cabina de flujo laminar con lámpara de radiación UV.

Las radiaciones ionizantes incluyen rayos de longitud de onda corta (rayos X, rayos cósmicos y rayos gamma). En contraste con la radiación UV, las radiaciones ionizantes penetran fácilmente a través del vidrio y otros materiales, pero por ser más peligrosas y menos accesibles tienen un uso restringido como agente esterilizante.

### 5.5.2 Métodos químicos

El término compuesto antimicrobiano es usado para designar a cualquier sustancia capaz de destruir o inhibir el desarrollo de microorganismos. Las sustancias antimicrobianas pueden clasificarse en:

- **Germicidas:** sustancias que provocan la destrucción de las células vegetativas y esporas de los microorganismos. Los germicidas específicos para bacterias u hongos se los designa bactericidas o fungicidas respectivamente. El hipoclorito de sodio (lavandina) y el ácido peracético son germicidas muy potentes, sin embargo en superficies en contacto con alimentos se usa ácido peracético ya que no es tóxico y no impregna olores desagradables. El alcohol al 70% también es germicida pero no elimina esporas.
- **Germistáticos:** son sustancias que impiden el desarrollo de microorganismos, si bien muchos mueren, algunos quedan en estado latente con la capacidad de multiplicarse nuevamente cuando la acción del agente disminuye. Los productos germistáticos específicos para bacterias u hongos se los llama bacteriostáticos y fungistáticos respectivamente. Los germicidas pueden actuar como germistáticos cuando no se utilizan a la concentración adecuada y el tiempo de contacto es insuficiente.
- **Antibióticos:** son sustancias de acción germicida o germistática producida por ciertos microorganismos, o bien sintetizados en laboratorios especializados (cicloheximida, cloranfenicol, penicilinas).

#### 5.5.2.1 Mecanismos de acción de las sustancias antimicrobianas

Las células microbianas pueden ser inactivadas o desorganizadas de maneras muy diferentes. Por un lado, los mecanismos de acción antimicrobiana pueden destruir o alterar de estructuras celulares, como la pared celular, alterar la permeabilidad selectiva de la membrana celular, precipitar proteínas y alterar ácidos nucleicos. Además pueden inactivar reacciones enzimáticas, por ejemplo aquellas que inhiben la síntesis de la pared celular, ADN y ARN.

Factores que influyen sobre la acción de compuestos antimicrobianos:

- **Tiempo:** una sustancia antimicrobiana debe estar en contacto con el material a desinfectar por un período de tiempo adecuado. La muerte de los microorganismos es un fenómeno gradual, la mayoría muere rápidamente y otros tienen mayor resistencia.
- **Concentración:** los agentes químicos no tienen efecto mientras su concentración no llega a un determinado valor. Aumentándola gradualmente se observa primero un efecto germistático y luego germicida.
- **Temperatura:** la eficiencia en general aumenta con la temperatura.
- **Humedad:** la presencia de agua facilita la penetración del antimicrobiano a la célula.
- **Naturaleza del medio:** la presencia de materia orgánica en el medio disminuye la acción de los antimicrobianos porque actúa protegiendo al microorganismo.
- **Naturaleza del microorganismo:** los microorganismos que tienen alguna forma de resistencia (bacterias que tienen cápsulas) son menos afectados por los antimicrobianos.

Los compuestos antimicrobianos empleados regularmente en laboratorios de microbiología son alcoholes y sustancias oxidantes. El alcohol más utilizado es el etanol, que diluido al 70% aumenta su poder de penetración a la célula y por consiguiente, aumenta su eficacia.

Las sustancias oxidantes como el ácido peroxiacético (ácido peracético) se emplea para desinfecciones de superficies en general (fermentadores, barriles, líneas de llenado). El ácido peracético se considera inestable, particularmente diluido, ya que las diluciones se hidrolizan con el tiempo y pierden actividad; los productos de su degradación son ácido acético, oxígeno y agua. Además, su acción disminuye drásticamente en presencia de materia orgánica.

## 5.6 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un conjunto de sustancias (nutrientes) que permite el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, estos pueden presentarse en estado líquido o sólido. El tipo de microorganismo que desarrolla depende del medio de cultivo y de las condiciones de incubación a la cual se exponen (temperatura, aireación e iluminación). Existen diferentes medios de cultivo que son utilizados en laboratorios según los objetivos de trabajo que plantea el investigador.

Los componentes de los medios de cultivo están desarrollados para satisfacer las necesidades nutricionales de los microorganismos y contienen:

- **Agua:** todos los medios de cultivo son de base acuosa.
- **Energía química:** a través del Carbono (C) que aporta a los microorganismos esqueletos carbonados que por catabólismo obtienen energía para su crecimiento y multiplicación. Las fuentes de carbono pueden ser orgánicas, como los hidratos de carbono (lactosa, sacarosa, maltosa, dextrosa, xilosa, manitol, almidón, etc.), aminoácidos (aa), ácidos orgánicos entre otras.
- **Nitrógeno (N):** en la naturaleza puede encontrarse en forma orgánica (aminoácidos, peptonas) e inorgánica ( $N_2$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ).
- **Sales minerales:** son fuente de cationes y de aniones. Los microorganismos necesitan captar una serie de elementos químicos que según las cantidades requeridas se pueden clasificar en macroelementos (K, Na, S, P, Ca, Fe) y microelementos (Mn, Zn, Co, Cu, Ni).
- **Factores de crecimiento:** son aquellos elementos esenciales que algunos microorganismos requieren para su desarrollo, y que deben incorporar ya que estos no pueden sintetizarlos a partir de compuestos más simples. Por ejemplo: vitaminas (biotina, tiamina, niacina), coenzimas, aminoácidos (arginina, asparagina, cisteína).

Las sustancias orgánicas pueden ser de manera simultánea fuente de distintos nutrientes. Ejemplo 1: una peptona provee a los microorganismos energía, carbono y nitrógeno. Ejemplo 2: la glucosa que le proporciona energía y carbono.

Algunos medios de cultivo pueden contener indicadores de pH que permiten visualizar fácilmente si hay crecimiento o si lo acidifica o alcaliniza, como el indicador verde de bromocresol en el medio de cultivo WLN.

La solidificación de cualquier medio líquido se logra al adicionar agar-agar o gelatina, sin embargo es más eficiente el agar-agar ya que no pierde las propiedades (solidificación) a temperatura de incubación.

### 5.6.1 Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo se pueden clasificar según su composición química en, Medios de Cultivo Definidos son aquellos compuestos por sustancias puras, lo que permite que sean reproductibles, y Medios de Cultivo Indefinidos o Complejos, aquellos que en su constitución intervienen sustancias de origen natural de composición química variable (extractos de carne, de levadura, entre otros).

Otra clasificación que se utiliza habitualmente es según su uso:

- **Generales (no selectivos):** por sus características desarrollan numerosos microorganismos, por ejemplo agar mosto.
- **Selectivos:** desarrolla determinado tipo de microorganismos, aun cuando estén presentes otros en el inóculo; por ejemplo el medio ABD para recuento de bacterias ácido lácticas.
- **Diferenciales:** aquellos que según el desarrollo (si existe o no crecimiento) el tipo de desarrollo (diferencias en la coloración o forma de las colonias) permite reconocer grupos o de microorganismos; por ejemplo el medio de cultivo WLN permite diferenciar colonias de levadura ambiental de colonias de levadura domesticadas.

### 5.6.2 Preparación de medios de cultivo

Existen medios de cultivo comerciales que contienen, todos los componentes de la fórmula en un solo envase, para lo cual solo se deben seguir las instrucciones de la etiqueta. En general no es necesario ajustar el pH, y en caso de ser un medio sólido tampoco se debe de agregar agar-agar. Otra opción es preparar los medios de cultivo a partir de mezclar cada constituyente siguiendo estrictamente el orden indicado en la fórmula y si es necesario, se puede calentar suavemente para una rápida disolución. Evitar temperaturas demasiado elevadas que puedan alterar los componentes o producir sustancias tóxicas.

Los medios de cultivo deben ajustarse al pH indicado en la fórmula, generalmente se realiza con soluciones de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). En los medios con agar-agar, el pH se puede corregir antes del agregado de agar, pues este no lo altera. En cambio en los medios con gelatina, por ser esta una proteína ácida, se debe realizar la corrección posterior al agregado de la misma.

## 5.7 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS EN CAJA

Una colonia es una agrupación de bacterias o levaduras formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido (Figura 5.29), aunque poseen tamaño variable son visibles a simple vista. Una UFC puede ser un microorganismo o un grupo de microorganismos de una misma especie que tienen tendencia a permanecer unidas (estafilococos o estreptococos). Las colonias bacterianas tienen determinado tamaño,

forma, consistencia y en algunos casos color característico, que puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, pero generalmente es constante bajo condiciones controladas y dependen de la especie bacteriana que las forme.

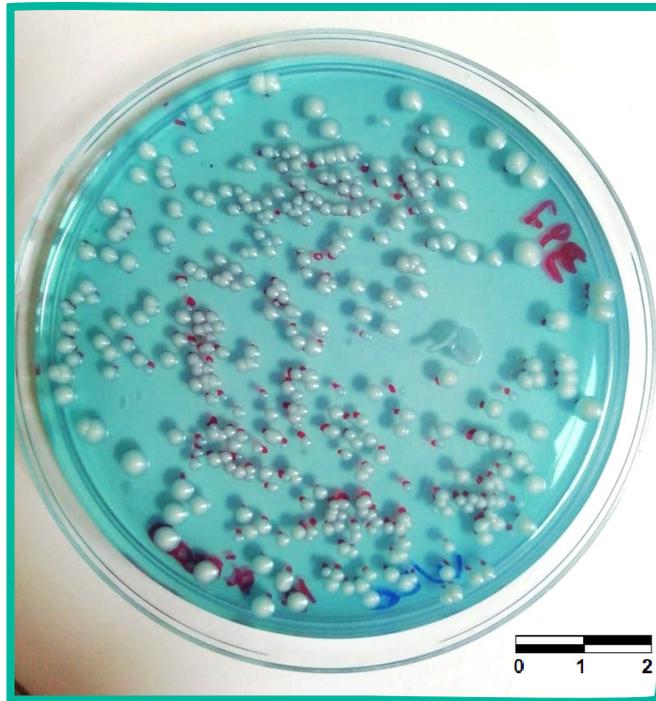


Figura 5.29: Caja de Petri con medio WLN y colonias típicas de levadura en la superficie.

Las características de las colonias ocurren en varias combinaciones y sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados. La morfología colonial, aunque deriva de una célula individual, es característica de la masa celular, por ejemplo la pigmentación es aparente en la colonia, pero no en la célula individual. Otro atributo es la consistencia de la colonia, puede ser dura, mucosa (se pegan al ansa y forma filamentos o hilos mucosos cuando se trata de separarla del agar), seca (que puede moverse sobre el agar con el ansa) y cremosa como en las colonias de levadura de cerveza. En el caso de la consistencia mucosa de algunas colonias ésta deriva de la sustancia capsular en bacterias con cápsulas muy grandes.

El tamaño de las colonias es bastante constante para cada especie y puede ir desde colonias muy pequeñas hasta colonias de varios milímetros de diámetro. La forma está determinada por su borde y elevación (Figura 5.30). La superficie de la colonia puede ser uniformemente brillante y suave o puede ser estriada con muescas concéntricas o quebradas. Al examinar la colonia con luz transmitida (contador de colonias o cuando la caja se interpone entre el observador y una fuente de luz) puede aparecer con textura granular o amorfa. La velocidad de desarrollo de una colonia hace referencia al tiempo que tarda en hacerse visible la colonia y pueden ser de desarrollo lento (no perceptible a las 24 horas) o rápido (perceptible a las 24 horas).

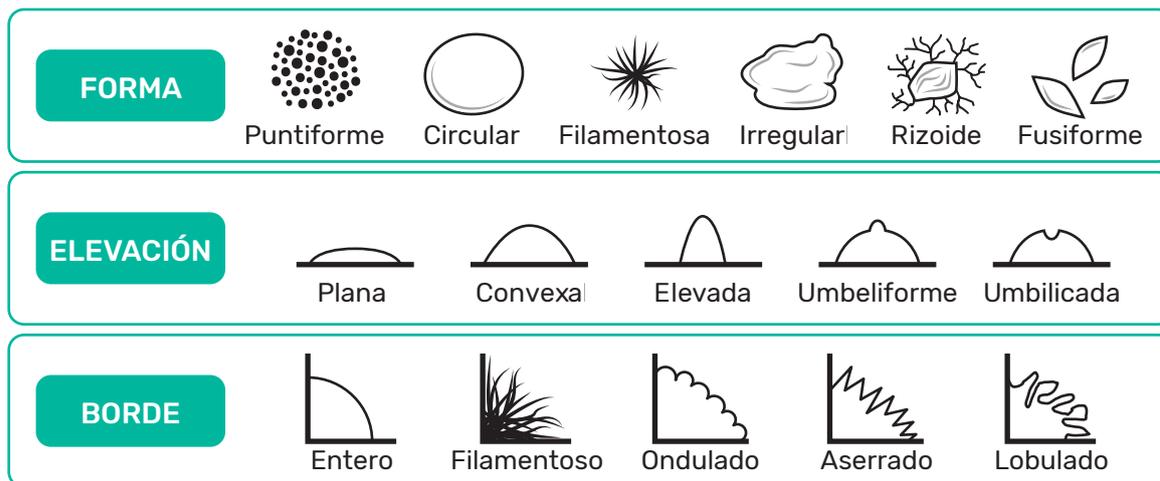


Figura 5.30: Descripción morfológica de las colonias según su elevación, borde y forma.

En resumen, las colonias deben describirse de acuerdo con la planilla bacteriológica (planilla donde se registran los resultados de los análisis microbiológicos) e incluye fecha de siembra y de recuento, tipo de muestra y dilución, UFC totales, número de colonias diferentes y UFC por cada tipo de colonia. Además, por cada tipo de colonia diferente se debe describir su velocidad de desarrollo, tamaño, forma, elevación, borde, pigmentación, superficie, textura y consistencia.

## 5.8 TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA

En este apartado se expondrán diferentes técnicas que se utilizan en muchas determinaciones microbiológicas. Para evitar confusiones se deben tener en claro algunas definiciones:

- **Inóculo:** Denominación que se da al material microbiano que se transfiere a un medio de cultivo.
- **Siembra:** acción de colocar un microorganismo en un medio nutritivo que permita su desarrollo y multiplicación.
- **Repique:** transferencia de una pequeña cantidad de cultivo microbiano a un medio nutritivo fresco.
- **Aislamiento:** separación de microorganismos para la obtención de cultivos puros.
- **Colonia:** masa microbiana visible a simple vista, que desarrolla como una unidad a partir de una sola célula, sobre un sustrato sólido.

### 5.8.1 Plaqueo de medios de cultivo

Esta técnica que consiste en verter un medio sólido (fundido y estéril) dentro de las cajas de Petri en un ambiente aséptico y obtener placas para ser sembradas.

#### Procedimiento:

1. Se esteriliza el medio de cultivo, cuando disminuya la temperatura entre 40 - 45 °C, se homogeniza y antes que se solidifique, se vierte el medio en placas apoyadas sobre la mesada de trabajo del flujo laminar. Cada placa de Petri lleva aproximadamente 18 mL de medio, se deben dejar las placas semi abiertas hasta que se enfríen y la condensación de vapor de agua desaparezca.
2. En caso de no poseer flujo laminar, verter el medio de cultivo en las placas de Petri cerca de la llama de un mechero Bunsen. Mantener las cajas cerradas por unos minutos hasta se solidifique el medio. Luego, dentro de una estufa de cultivo, abrir cuidadosamente

las cajas y posicionarlas de manera invertida para eliminar y evitar la condensación de vapor de agua.

3. Luego de unos minutos, cuando se elimine la condensación, tapan las cajas y conservarlas invertidas.
4. En caso de presencia de espuma en la superficie del medio en la placa, flamear con un mechero Bunsen para romper las burbujas.
5. Se pueden almacenar en heladera hasta por una semana.

### 5.8.2 Dilución en serie

Una dilución es la reducción de la concentración de una sustancia en una solución. En microbiología tiene un significado diferente pero en el mismo sentido ya que en general, no se trata de sustancias en solución sino de microorganismos en suspensión. Entonces en microbiología una dilución consiste en la disminución de la concentración microorganismos en un líquido (en general solución fisiológica o mosto que ayuda a separar células de levadura).

Una dilución en serie consiste en diluciones consecutivas partiendo de una suspensión madre (inicial). Por ejemplo, un 1 mL de cerveza previamente desgasificada se diluye en 9 mL de solución fisiológica, a partir de esto se obtiene una dilución 1:10 con un factor de dilución de 10. A partir de esta dilución se toma una alícuota de 1 mL y se diluye en 9 mL de solución fisiológica, se obtiene una dilución 1:100 con un factor de dilución de 100. De este modo se puede seguir diluyendo las suspensiones hasta llegar a la concentración deseada (Figura 5.31). Entre diluciones se debe homogenizar la muestra agitándolas manualmente o con la ayuda de un agitador de vórtice (Figura 5.9).

**“Para preparar solución fisiológica diluir 9 g de Cloruro de Sodio (grado analítico, se adquiere en droguerías) en 1 litro de agua destilada.”**

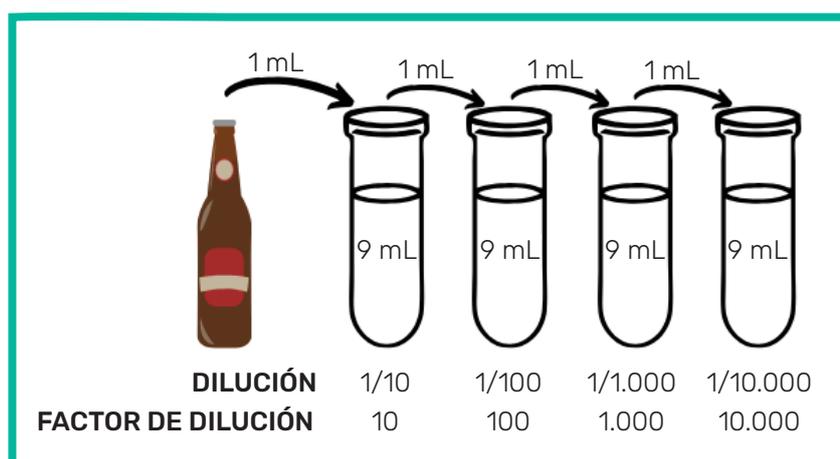


Figura 5.31: Dilución en serie.

Por ejemplo, un factor de dilución (FD) de 100 indica las veces que está diluida la suspensión madre. Si se siembra 0,1 mL una dilución 1:100 (factor de dilución 100) en una caja de Petri con un medio sólido para recuento de microorganismos y se obtiene como resultado 50 UFC (unidades formadoras de colonias) el resultado referido a 1 mL es:

$UFC/mL = \frac{UFC * FD}{VS}$	donde: <b>UFC</b> es unidades formadoras de colonias. <b>FD</b> es factor de dilución. <b>VS</b> es volumen sembrado en la caja.
$UFC/mL = \frac{(50 * 100)}{0,1}$	
$UFC/mL = 50\ 000 = 5.10^4$	

### 5.8.3 Siembra de microorganismos

La siembra es la operación que consiste en colocar microorganismos en un ambiente adecuado para que se desarrollen y multipliquen; en este medio ambiente deben encontrar los recursos necesarios para las actividades metabólicas y respiratorias, un cierto grado de humedad y una temperatura adecuada (Thuar et al., 2015).

Los métodos de siembra más usados en medios solidos son:

- **Siembra en profundidad:** se coloca una alícuota de una muestra (o su dilución) en el interior de una caja de Petri estéril y se vuelca sobre la misma el medio de cultivo agarizado fundido (previamente autoclavado y enfriado a 40 - 45 °C). Este método se utiliza para recuento de microorganismos que requieren un ambiente microaerófilo.
- **Siembra masal en superficie:** en una caja con medio agarizado se siembra un volumen conocido (generalmente 0,1 mL) de la muestra mediante una micropipeta y se distribuye sobre toda la superficie con ayuda de una espátula de Drigalsky (Figura 5.29). Este método se utiliza para recuento de microorganismos aerófilos o anaerófilos si se incuba en la atmósfera modificada de una jarra de anaerobiosis (Figura 5.12).
- **Siembra en estrías por agotamiento:** el objetivo de este procedimiento es obtener colonias separadas y aislarlas fácilmente. Procedimiento adaptado de Madigan (2015), se toma la muestra (o su dilución) con un ansa previamente esterilizada en la llama del mechero (Figura 5.32 A). Se descarga sobre la superficie de una placa de Petri con medio de cultivo agarizado estéril formando estrías. La estría inicial se traza a un costado de la placa con medio sólido. Las estrías se realizan formando ángulo con las estrías iniciales (Figura 5.32: 2B).

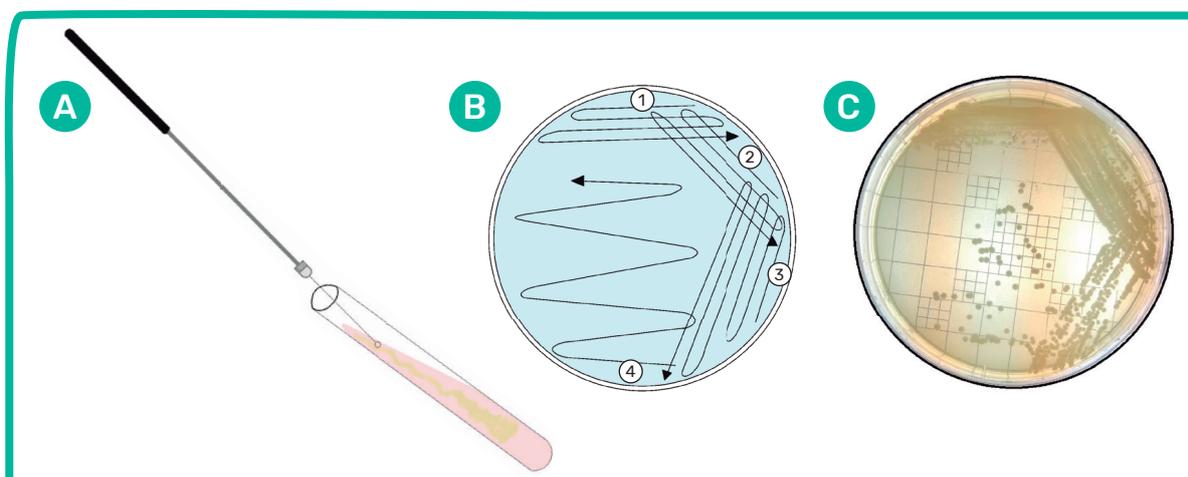


Figura 5.32: Método de siembra en estría por agotamiento. A partir de un inóculo inicial (A), se traza la estría inicial (B1) y las siguientes (B2, B3 y B4). Imagen de una caja de Petri sembrada en estrías por agotamientos luego de incubada (C).

#### 5.8.4 Tinciones

Previo a la tinción propiamente dicha se debe realizar un frotis. El frotis es la operación de fijar microorganismos en la superficie de un portaobjetos para evitar que se laven con los colorantes.

Las tinciones de microorganismos son procedimientos que aumentan el contraste de las células con el medio, lo que permite distinguir su forma y tamaño. De esta manera, a través de la utilización de un microscopio se pueden diferenciar grupos bacterianos por su reacción frente a ciertos colorantes. Existen diversos tipos de coloraciones, las cuales se pueden clasificar en:

- **Coloraciones simples:** usan un solo colorante, como tinción con safranina, cristal violeta o azul de metileno, todas las células se tiñen uniformemente.
- **Coloraciones compuestas:** cuando se emplean dos o más colorantes. La tinción de Gram, es una coloración compuesta, y a su vez diferencial, ya que permite separar las bacterias en dos grandes grupos.

En el capítulo 7 se desarrolla la metodología para realizar frotis y tinciones de interés para un laboratorio cervecero.