

# MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LEVADURA Y CERVEZA

MUESTREO DE CERVEZA DESDE FERMENTADORES

PRUEBA DE MOSTO FORZADO

PRUEBA DE DIACETILO

PRUEBA DE FERMENTACIÓN FORZADA

PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL MOSTO INOCULADO

ENSAYOS DE FERMENTACIÓN

PRUEBA DE DETERIORO DE PRODUCTO TERMINADO

HISOPADO DE SUPERFICIES

RECuento DE COLONIAS EN PLACA

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES





## CAPÍTULO 6: MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LEVADURA Y CERVEZA

*Dalmaso, Lucas Pablo y Gallace, María Eugenia*

La selección de los métodos que se describen a continuación responde a técnicas que se pueden realizar con bajo nivel tecnológico y relativamente pequeñas inversiones, desde algunos test sencillos hasta pruebas microbiológicas más complejas.

### 6.1 MUESTREO DE CERVEZA DESDE FERMENTADORES (adaptado de White y Jamil Zainasheff, 2010)

La toma de muestras directamente desde los fermentadores es un método simple, que requiere de la preparación previa del kit de materiales a utilizar, ya que la muestra se debe obtener de manera aséptica para evitar lecturas erróneas en el laboratorio. Es fundamental que el operario, se quite todos los accesorios de las manos y antebrazos, se lave bien las manos con agua y jabón, y posteriormente se desinfecte con alcohol 70%; otra opción es utilizar guantes de nitrilo y alcohol 70% en las manos enguantadas.

#### **Materiales:**

- Recipientes estériles de muestreo previamente rotulados con tipo de muestra y fecha
- Hisopos de algodón y esferas de algodón
- Alcohol medicinal (96%)
- Pulverizador con alcohol al 70%
- Encendedor

#### **Procedimiento:**

Si bien puede ser realizado por un operario, es recomendable que intervengan dos, uno para desinfectar y manipular la canilla del fermentador mientras el otro se encarga del recipiente de muestreo.

1. Limpiar el interior del tomamuestras o canilla media del fermentador con un hisopo empapado con alcohol. Repetir hasta que esté limpio e impecable.
2. Limpiar el exterior de la llave con una esfera de algodón empapada con alcohol.
3. En fermentadores de acero inoxidable se puede flamear la canilla con el encendedor. **IMPORTANTE:** no realice este paso en fermentadores plásticos.
4. Tener cerca el recipiente de recolección estéril, etiquetado y con la tapa desenroscada pero no retirarla aún.
5. Abrir la válvula y dejar que fluyan a través del grifo aproximadamente unos 350 mL de cerveza antes de recoger en el recipiente de muestreo estéril. Recolectar un mínimo de 100 mL para realizar pruebas microbianas completas. Cerrar la tapa de forma segura, limpiar y desinfectar el exterior. Trabajar tan rápido como sea posible una vez que haya abierto el recipiente estéril.
6. Repetir el procedimiento de limpieza posterior a la recolección de la muestra, y llevar rápidamente las muestras al laboratorio.

### 6.2 PRUEBA DE MOSTO FORZADO (adaptado de Libkind Frati y Latorre, 2017)

Este método se utiliza para indicar la eficiencia del protocolo de limpieza y sanitización, permite detectar microorganismos en el proceso de elaboración de mosto y en el circuito hasta su llegada al fermentador (etapas previas a la inoculación de la levadura).

**Materiales:**

- Ídem materiales para el muestreo desde fermentadores
- 3 recipientes para recolección de mosto estéril
- Estufa de cultivo o lugar cálido

**Procedimiento:**

1. Recoger de manera aséptica en un recipiente estéril una muestra de mosto desde la olla de hervor. Rotular la muestra como “Control Negativo”.
2. Recoger de manera aséptica una muestra de mosto luego del enfriador y antes de ingresar al fermentador. Rotular la muestra como “Enfriador”.
3. Recoger de manera aséptica una muestra de mosto del fermentador antes de inocular la levadura. Rotular la muestra como “Fermentador”.
4. Colocar las tres muestras en estufa de cultivo a 30 °C durante 7 días o más.
5. Inspeccionar y registrar las observaciones de las muestras desde el primer día (presencia de turbidez y burbujas).
6. Se considera que la muestra está contaminada (positivo) cuando se observa producción de gas y/o turbidez. Siempre se compara con Control Negativo (Figura 6.1) y considerando las tablas 6.1 y 6.2. Si la muestra Control Negativo da positivo indica que los recipientes no estaban estériles y/o el procedimiento de toma de muestra no fue el adecuado.



Figura 6.1: Resultados de la prueba de mosto forzado. (A) resultado negativo (-), sin turbidez y (B) resultado positivo (+), con turbidez y presencia de burbujas.

Tabla 6.1: Resultados de la prueba de mosto forzado.

MUESTRA			OBSERVACIONES	MEDIDAS CORRECTIVAS
control	enfriador	fermentador		
-	+	-	Problemas de limpieza y sanitización del enfriador.	Revisar el protocolo de limpieza y desinfección. Si el problema persiste considerar desarmar el enfriador de placas para una limpieza profunda. Además revisar las mangueras, estas deben conservar su color y estado original.
-	-	+	Problemas de limpieza y sanitización del fermentador, accesorios o conectores.	Revisar el protocolo de limpieza y desinfección. Verificar el estado de la superficie interior del fermentador, especialmente si es de plástico, no se deben detectar incrustaciones minerales ni ralladuras.
-	+	+	Falta de sanitización del enfriador y fermentador o bien, los microorganismos presentes en el intercambiador de calor contaminaron el fermentador.	Tomar las medidas correctivas para los dos casos anteriores.
-	-	-	Los protocolos de limpieza y sanitización funcionan correctamente.	No es necesario tomar medidas correctivas.

Tabla 6.2: Resultados positivos de la muestra de mosto forzado en función del tiempo de incubación y recomendaciones.

TIEMPO HASTA RESULTADO POSITIVO	GRADO DE CONTAMINACIÓN	MEDIDAS CORRECTIVAS
1 día	Contaminación excesiva	Falla grave en la limpieza y desinfección. Se recomienda NO vender la cerveza, ni reutilizar levadura.
2-3 días	Muestra altamente contaminada	Es necesario revisar los protocolos de limpieza, la cerveza podría verse afectada. No mezclar con otros lotes. Realizar análisis sensoriales con frecuencia. No reutilizar la levadura.
4-6 días	Contaminación leve	Verificar los protocolos de limpieza. La cerveza podría o no verse afectada.
7 o más días	Limpieza adecuada	Continuar trabajando de esta manera.

### 6.3 PRUEBA DE DIACETILO (adaptado de Libkind Frati y Latorre, 2017)

Es una prueba simple no cuantitativa para detectar precursores de diacetilo en una cerveza. Existen numerosas cepas de levaduras cerveceras que son grandes productoras de este tipo de precursores, en particular las levaduras de origen inglés. Para eliminar estos precursores se requiere que la levadura sea viable al finalizar la fermentación, que no haya sedimentado completamente, y suficiente temperatura para que el proceso de reabsorción sea más eficiente. Esto sucede durante la maduración en caliente, una vez que la cerveza llega a la atenuación deseada (Ver capítulo 3).

La prueba de diacetilo permite evaluar si la maduración en caliente fue efectiva, y establecer el tiempo mínimo requerido para completarla para cada estilo de cerveza. Los precursores de diacetilo se convierten en diacetilo por oxidación y se puede forzar esta conversión en el laboratorio, usando calor y oxígeno para transformar el precursor de diacetilo (no posee sabor) a diacetilo (presenta sabor) en poco tiempo. Si efectivamente hay presencia de diacetilo será necesario continuar con la maduración en caliente. Para realizar esta prueba es necesario haber realizado cursos de análisis sensorial y poseer cierta experiencia en reconocer este *off-flavor*.

#### **Materiales:**

- Dos vasos de vidrio
- Papel de aluminio o plástico *Film*
- Baño de agua caliente (baño termostático o baño maría)
- Baño de agua helada (baño maría inverso)
- Termómetro

#### **Procedimiento:**

1. Calentar el baño de agua caliente entre 60 y 70 °C.
2. Recoger cerveza en maduración en caliente en cada vaso y cubrirlos con papel de aluminio o plástico *Film* (rotular un vaso como “Control” y otro como “Caliente”).
3. Colocar el vaso “Caliente” en el baño de agua caliente, y mantener el vaso “Control” a temperatura ambiente.
4. Luego de 20 minutos, retirar la cerveza del baño caliente y enfriar con un baño de agua fría a la misma temperatura que la otra muestra.
5. Retirar el papel aluminio o plástico *Film* y percibir el aroma de cada muestra. El aroma mantecoso permite reconocer la presencia del diacetilo (Tabla 6.3). Ante la presencia del mismo se recomienda elevar unos grados la temperatura del fermentador y dejar que la levadura siga con el proceso de absorción de diacetilo y su precursor (no transferir, envasar ni embarrilar la cerveza y evitar disminuir la temperatura). Repetir la prueba días posteriores hasta no detectar diacetilo en ambas muestras (control y caliente).

Tabla 6.3: Resultados de la prueba de diacetilo.

MUESTRA		RESULTADO	MEDIDAS CORRECTIVAS
control	caliente		
Sin diacetilo	Sin diacetilo	Ausencia del precursor.	La cerveza está lista.
Sin diacetilo	Con diacetilo	Presencia del precursor.	La cerveza necesita más tiempo de maduración en caliente.
Con diacetilo	Con diacetilo	La cerveza tiene mucho diacetilo o su precursor.	Posible contaminación. Si no es un problema bacteriano, la cerveza necesita más tiempo con la levadura.
Con diacetilo	Sin diacetilo	Resultado incoherente.	Error en el rotulado de los vasos o en el análisis sensorial.

#### 6.4 PRUEBA DE FERMENTACIÓN FORZADA (adaptado de White y Jamil Zainasheff, 2010)

El objetivo de esta prueba es forzar la fermentación para llegar a la máxima atenuación, esto se logra con alta temperatura y agitación constante. El resultado suele ser una densidad final ligeramente inferior a la fermentación principal, es decir el límite de atenuación posible con esa combinación de levadura y mosto (esta fermentación de prueba alcanza la densidad final más rápido que la fermentación principal). La información que brinda este test ayuda a la toma de decisiones acerca del lote de cerveza que se está fermentando, si se detiene temprano y la densidad final es alta, se conoce qué nivel de atenuación era posible. Otra aplicación de esta prueba es ajustar la temperatura de fermentación en base a un porcentaje de atenuación, se sabrá qué valor representa el 100% de la fermentación.

##### Materiales:

- Ídem materiales para el muestreo desde fermentadores
- Cuarto estufa (opcional)
- Agitador orbital o magnético (opcional)
- Erlenmeyer de 500 mL estéril con tapón de algodón cubierto con papel aluminio. Si se cuenta con agitador magnético colocar la barra magnética (buzo) en el Erlenmeyer previo a la esterilización
- Autoclave u olla a presión

##### Procedimiento:

1. Recoger asépticamente mosto inoculado y listo para la fermentación en el Erlenmeyer. La muestra debe ser de 100 o 150 mL (Ver ítem 6.1).
2. Colocar el Erlenmeyer en el agitador en cuarto estufa a 28 °C. Si no se cuenta con un cuarto estufa, regular la temperatura ambiente utilizando algún elemento calefactor.
3. Una vez que toda la actividad se detiene, entre 48-72 horas, se debe medir la densidad.

#### 6.5 PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL MOSTO INOCULADO

Esta prueba permite comprobar si el proceso de inoculación introdujo contaminación bacteriana, a través de la verificación de la estabilidad del mosto inoculado. Importante: no detecta levaduras ambientales.

**Materiales:**

- Ídem materiales para el muestreo desde fermentadores
- Solución de cicloheximida 0,1%
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- *Tips* o puntas para micropipeta
- Cuarto estufa, estufa de cultivo o lugar cálido
- Agitador orbital (opcional)

**Procedimiento:**

1. Recoger asépticamente una muestra de mosto del fermentador después de inocular la levadura (Ver ítem 6.1).
2. Agregar con micropipeta 400 µL (0,4 mL) de solución de cicloheximida al 0,1% por cada 100 mililitros de muestra. **Marcar claramente la muestra como veneno. El consumo accidental de esta muestra es nociva para la salud. En caso de que ocurra, diríjase al centro médico más cercano con la etiqueta del producto.**
3. Colocar la muestra en un cuarto estufa a 30 °C (o en un lugar cálido), durante 7 días en un agitador orbital, o agitar manualmente de manera periódica.
4. Inspeccionar y registrar las observaciones de las muestras desde el primer día (presencia de turbidez y burbujas).
5. Obtener el resultado comparando con la Tabla 6.2.
6. Desechar la muestra.



Peligro, sustancia tóxica.  
Al manipular cicloheximida  
use gafas, guantes y barbijo.

**6.6 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN** (adaptado de White y Jamil Zainasheff, 2010)

Los ensayos de fermentación en laboratorio tienen como objetivo conocer las características de una cepa de levadura, su atenuación, efectos de tasas de inoculación y características de sabor. Además, se pueden realizar múltiples ensayos simultáneos para comparar diferentes variables (cepa, temperatura, tasa de inoculación, agregado de frutas).

**Materiales:**

- Erlenmeyers estériles de 2 o 3 litros o botellones (*growler*) preferentemente transparentes para poder observar la fermentación
- *Airlock*
- Pulverizador con alcohol al 70%
- Mosto

**Procedimiento:**

1. Recoger mosto hasta completar el 75% del volumen de cada recipiente estéril, antes de la inoculación con levaduras del fermentador principal (Ver ítem 6.1). Otra opción es preparar un pequeño volumen de mosto exclusivamente para realizar este ensayo.
2. Inocular con levadura los mostos contenidos en cada recipiente, previamente rotular la fecha y el tipo de cepa de levadura que se inocula en cada caso, la tasa de inoculación y cualquier otro tratamiento con el que se desea experimentar.
3. Registrar y monitorear la temperatura de fermentación desde el momento de la inoculación. El control de temperatura es el parámetro más importante a perfeccionar, caso contrario, la prueba de fermentación no tendrá el mismo resultado que la cerveza de una fermentación principal. Si se cuenta con una cámara de flujo laminar, tomar de manera

aséptica muestras diarias para medir la densidad y construir una curva de fermentación.

4. Una vez concluida la fermentación, registrar el resultado de la degustación de la cerveza y medir los valores de pH y densidad final.

## 6.7 PRUEBA DE DETERIORO DE PRODUCTO TERMINADO

Las muestras de un mismo lote se pueden someter a diferentes condiciones de almacenamiento para verificar cambios sensoriales a lo largo del tiempo. Este protocolo permite distinguir si existe deterioro de la cerveza y el grado del mismo, además de definir sus posibles causas (oxidación, contaminación) y considerar diferentes estrategias para contrarrestar el efecto negativo. La desventaja de este método es que se requiere personal entrenado en análisis sensorial.

### Materiales:

- Tres muestras de cerveza terminada de un mismo lote (en botellas o latas)
- Estufa de cultivo
- Refrigerador o cámara de frío (es necesario mantener la temperatura cerca de 0 °C)

### Procedimiento:

1. Día 1: Rotular las muestras de cerveza con los números 1 a 3 (Tabla 6.4). Colocar las muestras 1 y 2 en el refrigerador y la muestra número 3 en estufa de cultivo a 37 °C.
2. Día 7: Colocar en estufa de cultivo a 37 °C la muestra número 2.
3. Día 14: Retirar las muestras de la estufa de cultivo y la muestra almacenada en frío y mantenerlas a hasta que se igualen a temperatura ambiente. Realizar el análisis sensorial a ciegas (sin conocer el tipo de muestra que se evalúa). Para ello, se deberá contar con otra persona para que asista, sirva y organice las muestras (podrá rotular las copas con algún código para su identificación). Lo primero que debe hacer la persona que llevará adelante el análisis será ordenar de manera ascendente y de acuerdo a su criterio el grado de envejecimiento de las cervezas (ejemplo: numerará las copas con el número 1 la de mayor grado de conservación, hasta 3 la de mayor envejecimiento y deterioro. A continuación, podrá proseguir con el protocolo de análisis sensorial y describir diferentes atributos.

Tabla 6.4: Rótulos de las muestras de cerveza de la prueba de deterioro de producto terminado.

Nº DE MUESTRA	DÍAS DE ALMACENAMIENTO A 37°C	DÍAS DE ALMACENAMIENTO EN FRÍO
1	0	14
2	7	7
3	14	0

## 6.8 HISOPADO DE SUPERFICIES

Es un método muy utilizado en la validación de la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección de áreas con superficie plana o con diferentes formas (mangueras, tanques, juntas, enfriadores de mosto y otras superficies) y es relativamente económico (Mostert et al., 2005; Pérez-Rodríguez et al., 2008). Sin embargo, presenta la incapacidad de recuperar

con eficacia todos los microorganismos de la superficie, solo permite un valor aproximado del 20% (Salo et al., 2000). La detección y el recuento de UFC dependen de la liberación eficaz de los microorganismos del material para su posterior recuperación, por ejemplo para las células que forman parte de un biofilm que presentan resistencia al desprendimiento (Salo et al., 2000; Moore y Griffith, 2002; 2007). A continuación, se detallan dos métodos:

### 6.8.1 Muestreo con hisopos de algodón estériles (adaptado de Brewing Science Institute, 2019)

En este método se utilizan hisopos estériles protegidos en un tubo de polipropileno con fondo redondo y etiqueta-precinto. Un ejemplo comercial es el hisopo Deltalab™, modelo 300250 o cualquier otro de similares características.

#### **Materiales:**

- Cajas de Petri
- Medios de cultivo adecuados (Ver ítem 6.9)
- Hisopos de algodón estériles
- Agua destilada estéril en un tubo de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Estufa de cultivo o ambiente templado
- Autoclave u olla a presión
- Mechero Bunsen portátil a gas o alcohol

#### **Procedimiento:**

1. Colocar en una gradilla un tubo de ensayo con agua estéril y un hisopo con su tubo protector.
2. Humedecer la punta del hisopo en agua estéril y evitar tocar el interior de los tubos. Para muestrear diferentes superficies, prever un tubo con agua destilada estéril por cada hisopo, de esta manera se minimiza el riesgo de contaminación de la muestra.
3. En superficies planas: sostener el hisopo en ángulo de 30° con la superficie, frotar completamente el hisopo sobre un cuadrado de 100 cm<sup>2</sup> (cuadrado de 10 cm de lado) unas tres veces invirtiendo la dirección entre los trazos alternos, en superficies irregulares frotar completamente el hisopo en varias direcciones. Para obtener mejores resultados, trabajar cerca de la llama de un mechero (Por ejemplo, materiales pequeños como un conector rápido de un extremo de una manguera).
4. Colocar inmediatamente el hisopo dentro de su tubo protector, cerrar bien la tapa, rotular las muestras y llevarlas al laboratorio lo más pronto posible.
5. En el laboratorio rotular cajas de Petri con el lugar donde se obtuvo la muestra, tomar un nuevo hisopo de algodón estéril y estriar una caja de Petri con el medio de cultivo seleccionado. Rotular esta placa como "Control", la ausencia de crecimiento microbiano asegura que los hisopos y el medio están estériles y que el procedimiento es adecuado.
6. Rotular las placas con el área frotada (por ejemplo: manguera post enfriador) y la fecha. Usar placas con medio WLD para detectar bacterias, Agar para recuento en placa (PCA) o Agar mosto, como medios generales, u otros medios que considere adecuados (más adelante en este capítulo se describen varios medios de cultivo utilizados habitualmente en laboratorios de microbiología cervecera).
7. Colocar las cajas de Petri en estufa de cultivo a 30 °C en posición invertida, es decir con el medio hacia arriba durante 3 a 5 días.
8. Registrar resultados de las colonias: número, tipo, tamaño y color de las colonias. El resultado de hisopado de superficies planas se puede expresar como UFL/cm<sup>2</sup>, mientras

que los resultados de los hisopados de superficies irregulares se expresan como UFC/unidad, por ejemplo 56 UFC/interior de conector rápido.

### 6.8.2 Muestreo húmedo con hisopos de algodón estériles con Caldo Lethen

Consiste en un hisopo que utiliza caldo Lethen para facilitar la recuperación de bacterias durante el muestreo (Figura 6.2). El caldo Lethen tiene la propiedad de neutralizar iodo, cloro, halógenos, amonio cuaternario, sanitizantes ácidos y otros sanitizantes residuales que permanecen en las superficies, pre o post proceso de sanitización. Este tipo de hisopo incrementa la exactitud de los recuentos obtenidos en los muestreos, está diseñado para ser utilizado en conjunto con cualquier placa Petrifilm™ u otro método de control microbiológico.

#### **Materiales:**

- Hisopos Quick Swab Caldo Lethen 6433 de la marca 3M™ u otro de similares características
- Placas Petrifilm™
- Mechero Bunsen

#### **Procedimiento:**

1. Rotular el hisopo con los datos del tipo de muestra.
2. En el lugar de muestreo, preparar el hisopo sosteniéndolo con el extremo del bulbo cerca del pulgar. Doblar la válvula roja en un ángulo de 45° hasta que escuchar que la válvula se rompe, esto permite que el caldo de Lethen fluya hacia el extremo inferior del tubo y humedezca el hisopo.
3. Apretar el bulbo que contiene la válvula para transferir todo el caldo de Lethen al extremo inferior del tubo del hisopo.
4. Sostener el bulbo superior, girar y separar el hisopo del tubo que contiene el caldo de Lethen.
5. Sostener el hisopo para formar un ángulo de 30° con la superficie. Frotar completamente el hisopo sobre la superficie (100 cm<sup>2</sup>) tres veces invirtiendo la dirección entre los trazos alternos. Luego de completar el muestreo, insertar de manera segura el hisopo en su tubo protector y transportar lo más pronto posible al laboratorio.
6. En laboratorio, agitar el hisopo con Vortex (o manualmente de manera vigorosa) durante 10 segundos para liberar las bacterias de la punta de algodón.
7. Exprimir el contenido de la punta del hisopo presionando y girando el hisopo contra la pared del tubo.
8. Cerca de la llama del mechero Bunsen verter cuidadosamente todo el contenido del tubo en una placa Petrifilm™ del modelo que se ajuste a sus necesidades (Por ejemplo: placa Petrifilm™ para recuento de aerobios totales o placa Petrifilm™ para bacterias ácido lácticas).
9. Seguir las indicaciones específicas de incubación de la placa Petrifilm™ (generalmente a 30 °C) durante 48 horas.
10. Registrar los resultados: número de colonias, tipo, tamaño y color.



Figura 6.2: Hisopos de algodón estériles con Caldo Lethen.

## 6.9 RECUENTO DE COLONIAS EN PLACA (cajas de Petri)

Es un método muy utilizado para determinar el tamaño de la población de microbios en una muestra. El recuento de microorganismos en placa se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible, pero dado que una muestra no es totalmente homogénea, es posible que una colonia se origine de uno o más microorganismos. En este último caso se realiza una subestimación del número de microbios de la muestra, por ejemplo un diplococo generará una sola colonia a pesar que son dos bacterias. Además, muchos de los microorganismos presentes en la muestra no pueden crecer en las condiciones dadas de pH, temperatura, medio de cultivo, tiempo, por lo que el recuento también puede ser inferior al real. Sin embargo, se puede afirmar que cada colonia se formó a partir de por lo menos un microorganismo, entonces la colonia se considera una unidad formadora de colonia (UFC) a los efectos de los cálculos. Se admite por lo tanto que, en los métodos de recuento de microorganismos vivos son inevitables los errores. En los análisis microbiológicos cuantitativos los resultados se expresan en  $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (UFC/mL de muestra) y deben considerarse las reglas que se detallan a continuación.

### 6.9.1 Reglas para la expresión de resultados

La Organización Internacional para la Estandarización (ISO por sus siglas en inglés) estableció en 2014 reglas generales para exámenes microbiológicos. Aquí se detallan los aspectos más importantes de estas normas:

- Los resultados más fiables se obtienen contando placas que contengan entre 10 y 300 colonias.
- Si dos diluciones de la misma muestra contienen entre 10 y 300 colonias, realizar un promedio teniendo en cuenta la dilución. Es decir, cuando las cajas de Petri de dos diluciones decimales consecutivas contienen entre 10 a 300 colonias, calcular el número de UFC/mL de cada dilución y el promedio de los dos valores: éste será el valor UFC/mL de la muestra.
- Redondear los resultados hasta dos dígitos significativos sólo en el momento de la conversión a UFC/mL, y expresar los resultados como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia correspondiente de 10 (Por ejemplo:  $1,3 \cdot 10^8$  UFC/mL).
- Si las muestras se inocularon en series duplicadas y una o dos placas inoculadas con la misma dilución contienen colonias, calcular el promedio de colonias y multiplicar por el recíproco del factor de dilución para obtener el número de UFC/mL.

- En caso de que todas las placas tengan más de 300 colonias, contar las menos pobladas. Si contienen menos de 10 colonias/cm<sup>2</sup>, contar 12 cuadros de 1 cm<sup>2</sup> y multiplique el promedio por 56 (si la placa es de 90mm de diámetro); si las colonias están más pobladas, contar 4 cuadros de 1 cm<sup>2</sup> y multiplicar el promedio por 56. Expresar los resultados como “UFC/mL estimadas”. No exprese los resultados como TNTC (*Too numerous to count*, demasiado numerosos para el recuento) siempre que sea posible.
- Aquellas placas con menos de 10 colonias, pero 4 como mínimo, se calculan los resultados tal como se expone en el caso general y expréselos como “UFC/mL estimadas”.
- Si el total de colonias en una caja es de 3 a 1, la precisión del resultado es demasiado baja, por lo que el resultado se expresará como:

"Los microorganismos estudiados están presentes, pero menos de =  $(\frac{4 * FD}{VS}) UFC/mL$ "

donde:

**FD:** Factor de dilución

**VS:** Volumen sembrado

- El resultado de las placas en que todas las diluciones de cualquier muestra no tienen colonias, se expresa como:

"menos de =  $(\frac{1 * FD}{VS}) UFC/mL$ "

donde:

**FD:** Factor de dilución

**VS:** Volumen sembrado

- Considerar que para cada lote de medio de cultivo se usa una placa como control de esterilidad después del autoclavado que se mantiene cerrada todo el tiempo. Además, se destina otra caja de Petri por cada medio de cultivo que se deja abierta en la campana de flujo laminar durante todas las operaciones de manipulación del ensayo, a modo de control de esterilidad del entorno de trabajo. Ambas cajas se incubarán del mismo modo que las sembradas con las muestras.

### 6.9.2 Recuento con Agar mosto

Es un medio de cultivo general donde se desarrollan tanto bacterias como levaduras. En su composición contiene mosto de cerveza, este resulta apropiado para determinar contaminantes comunes del mosto y de equipos de la cervecería. Es de fácil elaboración y no requiere insumos costosos, por lo que es uno de los principales medios utilizados cuando una empresa incursiona con pruebas microbiológicas.

La preparación del mosto para este medio de cultivo es sencillo, pero es posible ahorrar tiempo preparando un volumen mayor para mantenerlo conservado a -18 °C (freezer), llamado mosto *stock*.

#### **Materiales:**

- Olla de cocina común
- Recipiente plástico o metálico de volumen igual o superior a la olla
- Botellas plásticas de 500 mL con tapa (reutilizada, de agua o gaseosa)
- Mosto *stock*
- 2 g de Agar-Agar
- Solución de Hidróxido de sodio 1 M
- Ácido clorhídrico 1 M
- Medidor de pH digital

- Autoclave u olla a presión
- Frasco autoclavable de 250 mL (Figura 5.24)
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Espátula de Drigalsky
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

**Preparación de mosto stock:**

1. Durante la elaboración de una cerveza 100% malta base, y una vez concluido el macedado, retirar mosto en una olla de cocina, diluir con agua hasta ajustar la densidad a 1025 – 1030 kg/m<sup>3</sup>, es importante que este mosto no contenga lúpulo.
2. Hervir durante 15 minutos y si es necesario agregar agua para compensar el volumen evaporado.
3. Trasvasar el mosto a otro recipiente evitar los sedimentos, suplementar con Zinc a razón de 0,2 - 0,3 ppm y ajustar pH a 5,2 ± 0,2 utilizar hidróxido de sodio o ácido clorhídrico según corresponda.
4. Lavar la olla de cocina y hervir nuevamente el mosto durante 5 minutos. Una vez concluido el hervor realizar un torbellino (*whirlpool*) y esperar a que la temperatura descienda y sedimenten los sólidos.
5. Llenar las botellas con el volumen de mosto que utilizará posteriormente, (evitar los sedimentos) y congelar a -18 °C.

**Procedimiento:**

1. Disolver 20 gramos de Agar-Agar en 1 L de mosto *stock* previamente descongelado. Preparar el volumen necesario, considerar que cada caja de Petri contendrá entre 18 y 20 mL.
2. Ajustar el pH hasta un valor de 5 ± 0,2 (utilizar ácido clorhídrico para acidificar o hidróxido de sodio para alcalinizar el medio).
3. Autoclavar el medio a 121 °C durante 15 minutos (temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales para este medio).
4. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
5. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
6. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie y esparcir con espátula de Drigalsky previamente flameada con alcohol, cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra si hay sospecha de contaminación severa.
7. Colocar en estufa de cultivo a 30 °C o en un ambiente cálido e incubar por 72 horas.
8. Registrar el crecimiento, identificar las diferencias entre tipos de colonias y realizar el recuento de cada una de ellas.
9. Seleccionar colonias típicas para identificación por tinción de Gram u otros métodos.

**Opcional:**

- Se puede agregar cicloheximida una concentración final de 4 mg/L para hacerlo selectivo para

	Peligro, sustancia tóxica. Al manipular cicloheximida use gafas, guantes y barbijo.
--	---

contaminantes bacterianos, ya que suprime el crecimiento de la mayoría de las levaduras y hongos filamentosos.

- El agregado de antibióticos debe ser posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45 °C.
- Este medio con cicloheximida también se utiliza para detectar bacterias anaeróbicas. Para esto incubar dentro de una jarra o bolsa de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis; otra opción es recrear un ambiente microaerófilo realizando siembra en profundidad.

### 6.9.3 Recuento con medio WLN y WLD (Wallerstein Laboratories Nutrient y Wallerstein Laboratories Differential)

Los medios de cultivo WLN y WLD sirven para detectar contaminantes usuales en cervezas. Contienen indicador verde de bromocresol que permite que medios tornen su coloración de azul a amarillo o verde claro en presencia de bacterias productoras de ácidos. También pueden incubarse cajas de Petri con este medio de forma aeróbica y anaeróbica. Las condiciones aeróbicas ayudarán a identificar bacterias productoras de ácido acético y bacterias entéricas, mientras que las condiciones anaeróbicas a *Lactobacillus* y *Pediococcus*. La única diferencia entre estos dos medios de cultivo nutritivos es que el medio WLN no contiene cicloheximida, y al no ser selectivo permite el crecimiento de levaduras de cerveza, levaduras ambientales, bacterias y hongos filamentosos.

Interpretación de resultados: *Saccharomyces cerevisiae* puede crecer como una colonia blanca, verde pálido o azul verdosas, la interpretación se realiza de manera sencilla, si el crecimiento de las colonias es espaciado y poco abundante. Otras especies de *Saccharomyces* y géneros de levaduras ambientales generalmente se distinguen fácilmente del típico crecimiento que tiene la levadura en WLN, porque la morfología de las otras colonias es notablemente diferente (arrugadas, levantadas, ásperas, polvorientas), y su color generalmente difiere también, pasando de blanco por sombras de azul a verde (Torres Torres, 2007).

El medio de cultivo WLD presenta un color azulado, cuando bacterias ácido lácticas o acéticas comienzan a crecer, estas acidifican el medio y se torna de color amarillo que permite diferenciarlas (Trochine y Latorre, 2018).

#### **Materiales:**

- Medio WLN
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y papel aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

#### **Preparación de las placas con medio WLN:**

1. Disolver 15 g de medio WLN comercial en un Erlenmeyer de 500 mL, con 200 mL de

agua destilada. Cerrar con un tapón de algodón cubierto de papel aluminio y hervir el contenido durante 1 minuto agitando constantemente para fundir el medio.

2. Autoclavar a 121 °C. durante 10 minutos (recordar que temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio).
3. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
4. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
5. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie del medio y esparcir con espátula de Drigalsky, previamente flameada con alcohol. Cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra según corresponda.
6. Colocar en estufa de cultivo a 25 °C. o en ambiente cálido.
7. Incubar cuatro (4) días y realizar el recuento de levaduras. Es posible que las colonias bacterianas demoren entre cuatro y siete días en desarrollar lo suficiente para identificar el organismo.

#### Opcional:

- Para preparar el medio WLD siga el procedimiento para la preparación de las placas con medio WLN con la diferencia de agregar cicloheximida al medio a una concentración final de 4 mg/L.
- Es importante que el agregado del antibiótico cicloheximida sea posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45°C.
- Considerar incubar las placas en anaerobiosis. Para esto se deberá contar con jarra o bolsa de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis.



Peligro, sustancia tóxica.  
Al manipular cicloheximida use gafas, guantes y barbijo.

#### 6.9.4 Recuento con Medio UBA (Universal Beer Agar)

Es un medio de cultivo definido que se encuentra disponible de manera comercial y contiene nutrientes y agar. Se puede agregar una proporción de cerveza para simular de manera más certera el ambiente natural que se encuentra en una cervecería, de esta manera, el medio se vuelve más selectivo a microorganismos contaminantes de cerveza. También puede agregarse cicloheximida (4 mg/L) y de esta manera se corroboran sólo contaminaciones por bacterias.

Este medio permite detectar la presencia de organismos no deseados junto con la levadura que se va a inocular en un fermentador, también en el mosto o en la cerveza almacenada. Las técnicas de incubación aeróbica detectan la presencia de *Acetobacter* sp., en cambio la incubación en una jarra o bolsa de anaerobiosis es adecuada para recuento de anaerobias estrictas y facultativas, y la siembra en profundidad para recuento de especies microaerófilas.

#### Materiales:

- Medio UBA
- Agua destilada
- Cerveza 25 mL
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y aluminio
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)

- *Tips* o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Espátula de Drigalsky
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

#### **Procedimiento:**

1. Disolver 5,5 gramos de medio UBA en un Erlenmeyer con 75 mL de agua destilada, cerrar con un tapón de algodón y papel aluminio, y hervir el contenido durante un minuto con agitación constante para fundir el medio.
2. Agregar 25 mL de cerveza sin desgasificar al medio caliente.
3. Autoclavar a 121 °C. durante 10 minutos, temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
4. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
5. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
6. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie y esparcir con espátula de Drigalsky previamente flameada con alcohol, luego cerrar e invertir las placas. Realizar diluciones seriadas de la muestra si se sospecha la existencia de contaminación severa.
7. Colocar en estufa de cultivo a 28– 30 °C. o en un ambiente cálido e incubar por 72 horas.
8. Registrar el crecimiento, tipo y número de colonias.
9. Seleccionar colonias típicas para identificación por tinción de Gram u otros métodos.

#### **Opcional:**

- Agregar cicloheximida al medio a una concentración final de 4 mg/L. El medio se vuelve selectivo para los contaminantes bacterianos al suprimir el crecimiento de la mayoría de levaduras y hongos filamentosos.
- Es importante que el agregado del antibiótico cicloheximida sea posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45°C.



Peligro, sustancia tóxica.  
Al manipular cicloheximida use gafas, guantes y barbijo.

#### **6.9.5 Recuento con Medio ABD (Advanced Beer-spoiler Detection Medium)**

Este medio permite la detección de una amplia gama de bacterias lácticas que deterioran cervezas, incluidas cepas que son difíciles de revelar por metodología convencional. Además, el medio ABD puede usarse como único indicador para diferenciar la capacidad de descomposición de la cerveza de bacterias lácticas sin más pruebas confirmatorias en las cervecerías, lo que proporciona considerables beneficios para la industria cervecera (Suzuki et al., 2008).

#### **Materiales:**

- Caldo MRS (Man Rogosa Sharpe)
- Acetato de sodio
- Agar-Agar
- Cerveza Lager comercial tipo Pilsner

- Solución de cicloheximida 0,1%
- Hidróxido de sodio 1 M
- Ácido clorhídrico 1 M
- Medidor de pH
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 1 L
- Tapón de algodón y aluminio
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- *Tips* o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles de tipo ventilada
- Espátula de Drigalsky
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar
- Jarra de anaerobiosis
- Sobre generador de anaerobiosis

**Procedimiento:**

1. Disolver 1,3 gramos de Caldo MRS, 0,25 gramos de acetato de sodio y 7,5 gramos de Agar-Agar en un Erlenmeyer.
2. Agregar 500 mL de cerveza Lager comercial tipo Pilsner previamente desgasificada mediante agitación.
3. Ajustar el pH hasta un valor de  $5 \pm 0,2$  con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio para acidificar o alcalinizar el medio.
4. Cerrar con un tapón de algodón y papel aluminio y disolver el medio hirviendo el contenido durante un minuto con agitación constante.
5. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
6. Finalizado el proceso de esterilización, esperar que el medio de cultivo alcance 40 - 45 °C y agregar 5 mL de solución de cicloheximida 0,1%, homogenizar y antes que se solidifique, plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
7. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
8. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie y esparcir con espátula de Drigalsky previamente flameada con alcohol, cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra si hay sospecha de contaminación severa.
9. Incubar las placas en la jarra de anaerobiosis con el sobre generador de anaerobiosis en estufa de cultivo a 28 - 30 °C durante 7 días.
10. Crecimiento en este medio indica contaminación bacteriana. Seleccionar colonias típicas para identificación por tinción de Gram u otros métodos.

**6.9.6 Recuento con Medio HLP (Hsu's *Lactobacillus Pediococcus* Medium)**

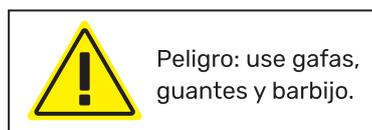
Es una prueba para determinar la presencia de bacterias ácido lácticas Gram positivas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Este medio contiene cicloheximida y es selectivo para el crecimiento de bacterias anaerobias. La inoculación cuando el medio está aún en forma líquida (40 °C.) permite crear un efecto anaeróbico del ambiente antes de solidificarse.

**Materiales:**

- Medio HLP
- Agua destilada
- Agar-Agar
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000  $\mu\text{L}$  (P1000)
- *Tips* o puntas para micropipeta
- Tubos de cultivo estériles con tapa de rosca de 16 x 150 mm (tubos falcon)
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y papel aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo

**Procedimiento:**

1. Mezclar 7 gramos de medio HLP y 2 gramos de agar con 100 mililitros de agua destilada en un Erlenmeyer, cerrarlo con tapón de algodón y papel aluminio.
2. Calentar a ebullición haciendo girar el contenido con frecuencia hasta que el medio se disuelva completamente.
3. Pipetear 1 mL de la muestra a analizar y eyectar en un tubo Falcon estéril. Rotular cada tubo con un número de muestra y fecha.
4. Esperar a que el medio se enfríe hasta 45 °C.
5. Transferir 17 mL de medio HLP a cada tubo que contiene la muestra y cerrar bien las tapas.
6. Invertir suavemente los tubos dos veces para distribuir la muestra uniformemente.
7. Colocar los tubos en estufa de cultivo a 30 °C durante 48 horas.
8. Realizar un recuento preliminar. Las colonias de *Lactobacilos* aparecen con color blanco en forma de lágrima invertida, y las colonias de *Pediococcus* aparecen con forma esférica de color blanco.
9. Colocar nuevamente en estufa de cultivo a 30 °C durante un período adicional de 24 a 48 horas y realizar el conteo final.

**6.9.7 Recuento con Medio LMDA (Lee's Multi-Differential Agar)**

Es un medio de cultivo nutritivo complejo que permite detectar la mayoría de los microorganismos (bacterias y levaduras) que se encuentran comúnmente en una cervecería. Las bacterias productoras de ácido como *Acetobacter* y *Gluconobacter*, debido a su capacidad para disolver el carbonato de calcio, se identificarán mediante el desarrollo de una zona clara alrededor de las colonias. Además, la identificación de las colonias se verá facilitada por las características reacciones de color. Se puede usar el mismo medio bajo condiciones anaeróbicas para detectar *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Las colonias de *Lactobacillus* presentan una zona de halo y aparecen de color blanco verdoso con un centro verde oscuro y parte inferior amarilla. Las colonias de *Pediococcus* crecen más lentas que los otros organismos y aparecen más pequeñas con una zona halo estrecha. Este medio puede hacerse selectivo para la detección de bacterias mediante la adición de cicloheximida (4 mg/L) luego del autoclavado para suprimir el crecimiento de levadura en el cultivo.

**Materiales:**

- Medio LMDA
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000  $\mu\text{L}$  (P1000)
- *Tips* o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y papel aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

**Procedimiento:**

1. Mezclar 8,3 g de medio comercial LMDA en un Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de agua destilada, cerrar con un tapón de algodón y papel aluminio y hervir el contenido durante 1 minuto agitando constantemente para disolver el medio.
2. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
3. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
4. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
5. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie del medio y esparcir con espátula de Drigalsky previamente flameada con alcohol. Cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra si hay sospecha de contaminación severa.
6. Colocar en estufa de cultivo a 30 °C o en ambiente cálido.
7. Las colonias bacterianas demoran entre cuatro y siete días en desarrollar lo suficiente para identificar el organismo.

**Opcional:**

- Se puede agregar cicloheximida a una concentración final de 4 mg/L para hacer selectivo el medio para los contaminantes bacterianos (suprime el crecimiento de la mayoría de levaduras y hongos filamentosos).
- Es importante que el agregado de los antibióticos sea posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45 °C.
- Este medio con el agregado de cicloheximida también puede ser utilizado para detectar bacterias anaeróbicas. Para esto se deberá incubar dentro de una jarra o bolsa de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis. Otra opción es recrear un ambiente microaerófilo realizando siembra en profundidad.



Peligro, sustancia tóxica.  
Al manipular cicloheximida use gafas, guantes y barbijo.

**6.9.8 Recuento con Medio LWYM (Lin's Wild Yeast Medium)**

Este medio de cultivo se utiliza para la detección y cuantificación de poblaciones de levadura ambiental en cervezas. El crecimiento de la levadura domesticada es suprimido por un componente del medio (cristal violeta). La levadura ambiental se desarrolla como colonias

más grandes y distintas. Si bien este medio está diseñado para fomentar el crecimiento principalmente de levaduras silvestres del género *Saccharomyces*, varias cepas de levaduras que no son *Saccharomyces* también podrán crecer en este medio.

**Materiales:**

- Medio LWYM
- Solución comercial de Cristal Violeta
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 250 mL
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000  $\mu\text{L}$  (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Espátula de Drigalsky
- Tapón de algodón y aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)

**Procedimiento para preparar las cajas con medio sólido LWYM:**

1. Este medio se prepara a partir de dos recipientes separados, utilizando polvo deshidratado LWYM y solución Cristal Violeta. La concentración de cristal violeta está ajustada por el fabricante para proporcionar condiciones óptimas para el crecimiento de levadura ambiental y la inhibición de cultivo de levadura. Es esencial utilizar la solución de cristal violeta del mismo número de lote que se proporciona con el polvo deshidratado LWYM.
2. Agregar 4,4 gramos de medio LWYM en 100 mL de agua destilada en un Erlenmeyer de 500 mL y agregar 1 mL de solución de cristal violeta.
3. Calentar a ebullición para disolver el medio. Agitar el matraz con frecuencia para evitar que de apelmace o queme.
4. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos para esterilizar el medio. Retire rápidamente del autoclave y plaquee según las indicaciones del ítem 5.8.1.
5. Las placas con el medio sólido pueden almacenarse en posición invertida a 4 °C solamente durante 24 a 48 horas antes de su uso.

**Procedimiento para la siembra de muestras con altos niveles de levadura:**

1. La concentración celular debe determinarse según las indicaciones del ítem 7.4.6.1.
2. Diluir la suspensión de levadura para tener aproximadamente  $5 \cdot 10^6$  cél/mL.
3. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
4. Inocular con micropipeta 0,2 mL de muestra diluida que contiene aproximadamente 1 millón de células de levadura en una placa con medio LWYM.
5. Dispersar el inóculo de manera uniforme sobre la superficie del medio, usando una espátula de Drigalsky sin llegar hasta los bordes de la placa.
6. Incubar las placas invertidas en condiciones aeróbicas a 28–30 °C.
7. Examinar las placas después de 4 a 6 días. Las colonias desarrolladas en el medio pueden considerarse levaduras silvestres, algunas cepas de levadura domesticada pueden mostrar un ligero crecimiento en medio LWYM, por lo que solo las colonias distintas se

consideran levaduras silvestres o ambientales. Además, algunas levaduras ambientales de rápido crecimiento (por ejemplo *S. willianus* o *Candida mycoderma*) pueden mejorar el crecimiento de la levadura domesticada. Por lo tanto, algunas colonias de levadura domesticada pueden mostrar un ligero crecimiento en el entorno de las colonias de levadura silvestre.

8. Para el caso de muestras con baja concentración de levaduras, el procedimiento es más complejo y excede los objetivos del presente manual.

## 6.10 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES

Las enfermedades entéricas causadas por bacterias coliformes se transmiten casi exclusivamente por contaminación fecal. Aislar bacterias entéricas patógenas directamente de cervezas contaminadas es difícil, dado que en caso de estar presente, lo está en pequeña proporción, a menos que la contaminación haya sido reciente y masiva. Para demostrar la existencia de contaminación fecal, basta con poner de manifiesto que la muestra contiene bacterias que habitan normalmente en el tracto intestinal, incluso aunque éstas no sean agentes causantes de enfermedad. Las bacterias que principalmente se usan como indicadores de dicha contaminación son estreptococos fecales y *Escherichia coli*.

Los métodos de análisis sanitarios desarrollados por los bacteriólogos difieren ligeramente de unos países a otros, a continuación se detalla uno de ellos adaptado al análisis de cervezas y consta de dos partes, un análisis presuntivo y un análisis confirmativo.

### 6.10.1 Análisis Presuntivo

Este análisis determina la presencia de bacterias coliformes pero no indica que estas sean fecales.

#### **Materiales:**

- Tres tubos de ensayo con tapones por cada muestra de cerveza
- Medio caldo de Mac Conkey
- Trampa de gases (campanita Durham)
- Autoclave u olla a presión
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- *Tips* o puntas para micropipeta
- Erlenmeyer de 500 mL
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)

#### **Procedimiento:**

1. Preparar en el Erlenmeyer la cantidad necesaria de medio caldo de Mac Conkey según indicaciones del fabricante hasta que quede totalmente disuelto.
2. Dosificar 10 mL de medio caldo de Mac Conkey en los tubos de ensayo.
3. Colocar una trampa de gases por cada tubo de ensayo y cerrar el tubo con un tapón (Figura 6.3).
4. Autoclavar a 121 °C durante 10 minutos (temperaturas más altas o duraciones más prolongadas son perjudiciales al medio).
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

6. En la cabina de flujo laminar o cerca de la llama de un mechero Bunsen, sembrar 1 mL de muestra de cerveza en un tubo. Se recomienda realizar esta prueba por triplicado (3 tubos por cada muestra de cerveza).
7. Rotular e incubar en estufa de cultivo a 37 °C por 48 horas.
8. Registrar el resultado: observar presencia de gas retenido en la trampa. Se considera positivo si al menos ocupa el 10% del volumen (Figura 6.4).



Figura 6.3: Tubo con medio Mac Conkey y trampa para gases.

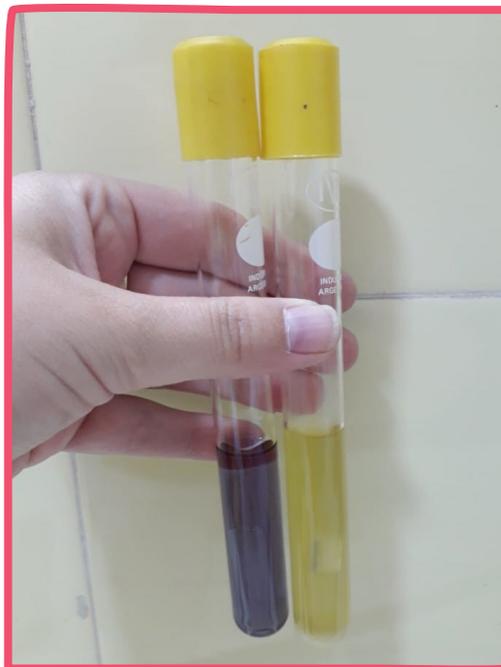


Figura 6.4: Posibles resultados de análisis presuntivos. Izquierda resultado negativo, derecha resultado positivo (presencia de gas mayor al 10% de la campana de Durham).

### 6.10.2 Análisis Confirmativo

Este análisis sirve para determinar la presencia o ausencia de bacterias fecales, específicamente *Escherichia coli*. Estas colonias son relativamente pequeñas con un brillo verde metálico con el centro negro (Figura 6.5). Las colonias de *Enterobacter aerogenes* (bacteria coliforme ambiental) son más grandes, mucosas, de color rosado y sin brillo.

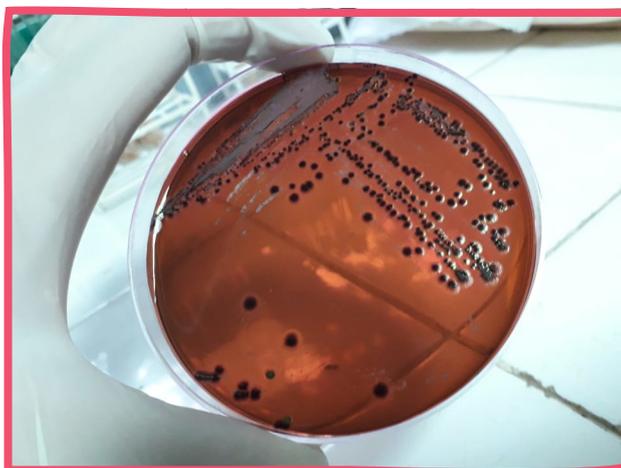


Figura 6.5: Placa del análisis confirmativo con colonias de *E. coli*.

**Materiales:**

- Medio de cultivo Agar Eosina Azul de Metileno (Agar EAM o de Levine)
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 500 mL
- Ansa en anillo
- Cajas de Petri estériles
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)

**Procedimiento:**

1. Preparar en el Erlenmeyer la cantidad necesaria de medio caldo de Mac Conkey según indicaciones del fabricante hasta que quede totalmente disuelto.
2. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
3. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
4. Rotular las cajas con tipo de medio y nombre de muestra.
5. Por cada tubo con resultado positivo del análisis presuntivo, tomar material con un ansa en anillo y sembrar en estrías por agotamiento en cajas Medio de cultivo Agar Eosina Azul de Metileno (Agar EAM o de Levine).
6. Incubar en estufa de cultivo las cajas en posición invertida de 24 a 48 horas a 37 °C.
7. Observar el desarrollo y registrar el resultado.