



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULAS
EN SUPERFICIES DE SALÓN DE EMBOTELLADO DE CERVEZA**

Diego Josué Milián Izeppi

Asesorado por la Inga. Hilda Piedad Palma de Martini

Guatemala, noviembre de 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULAS
EN SUPERFICIES DE SALÓN DE EMBOTELLADO DE CERVEZA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

DIEGO JOSUÉ MILIÁN IZEPPÍ

ASESORADO POR LA INGA. HILDA PIEDAD PALMA DE MARTINI

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Inga. Elvia Miriam Ruballos Samayoa
VOCAL IV	Br. Narda Lucía Pacay Barrientos
VOCAL V	Br. Walter Rafael Véliz Muñoz
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Carlos Salvador Wong Daví
EXAMINADORA	Inga. Dina Lissette Estrada Moreira
EXAMINADOR	Ing. Renato Giovanni Ponciano Sandoval
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULAS EN SUPERFICIES DE SALÓN DE EMBOTELLADO DE CERVEZA

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 20 de noviembre de 2013.


Diego Josué Milán Izeppi



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 21 de agosto de 2014

Ingeniero
Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Ingeniero Monzón:

Me dirijo a usted para comunicarle que he revisado y aprobado el informe final titulado: **IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULAS EN SUPERFICIES DE SALÓN DE EMBOTELLADO DE CERVEZA**, del estudiante Diego Josué Milián Izeppi, quien se identifica con el número de carné 201020164.

Atentamente,

Inga. Hilda Palma de Martini
Colegiado 453

INGA. HILDA PALMA DE MARTINI
COLEGIADO No. 453



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 20 de noviembre de 2013
Ref. EI.Q.TG-DI.107.2013

Ingeniero
Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el Acta TG-154-2013-DI le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN DE TRABAJO DE GRADUACIÓN
-Modalidad Seminario de Investigación-

Solicitado por el estudiante universitario: **Diego Josué Milián Izeppi.**

Identificado con número de carné: **2010-20164.**

Previo a optar al título de **INGENIERO QUÍMICO.**

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULAS EN SUPERFICIES DE SALÓN DE EMBOTELLADO DE CERVEZA

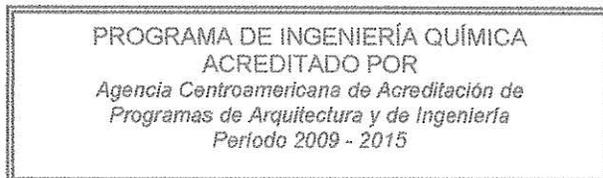
El Trabajo de Graduación es asesorado por la Ingeniera Química: **Hilda Piedad Palma de Martíni.**

Se autoriza al estudiante, proceder con la fase de ejecución del proyecto de investigación, del trabajo de graduación de acuerdo al cronograma aprobado.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ing. Pablo Enrique Morales Paniagua
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación

C.c.: archivo



ACAAI

Agencia Centroamericana de Acreditación de Programas de Arquitectura y de Ingeniería



Ref.EIQ.TG.242.2014

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación del estudiante, **DIEGO JOSUÉ MILIÁN IZEPPÍ** titulado: **"IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULAS EN SUPERFICIES DE SALÓN DE EMBOTELLADO DE CERVEZA"**.
Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.



Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, noviembre 2014

Cc: Archivo
VMMV/ale





El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULAS EN SUPERFICIES DE SALÓN DE EMBOTELLADO DE CERVEZA**, presentado por el estudiante universitario: **Diego Josué Milián Izeppi** y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, se autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.


Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
Decano a.i.



Guatemala, noviembre de 2014

/cc

ACTO QUE DEDICO A:

Dios	Por darme sabiduría, comprensión y discernimiento.
Mi madre	Claudia Izeppi Astorga. Por ser mi apoyo incondicional con su incesante amor y motivación desde mis primeros pasos.
Mi padre	Erwin Milián Ruiz. Por su apoyo y amor en los pasos de mi vida.
Mis hermanos	Erwin y Pamela Milián Izeppi. Por darme los momentos más chistosos, alegrías y momentos inolvidables.
Mis abuelos	Óscar Milián Dubón y María Yolanda Ruiz. Por brindarme su apoyo y motivarme a seguir estudiando.
Mi abuela	Ana María Astorga. Por hacerme reír y por su amor.
Mis tíos	Por acompañarme mientras crecía y sus sabios consejos.

AGRADECIMIENTOS A:

La Universidad de San Carlos de Guatemala	Por darme la oportunidad de ser un profesional y ser mi casa de estudios.
Facultad de Ingeniería	Por darme los conocimientos para llegar a este momento.
Ing. Hilda Palma	Por asesorarme durante la elaboración de este trabajo y sus consejos.
Ing. Pablo Morales	Por enseñarme otra perspectiva de la vida.
Mis amigos	Ángel Aragón, Michelle Espina, Bryan Carrera, Edgar Morales, José Villafuerte, Marvin Aguilar, Josué Tojes, José Alemán, Julio Morfin, Javier Hernández y Héctor Juárez. Por aprender a vivir la vida juntos y los momentos que todavía me hacen reír.
Nano Milián	Por recibirme siempre con gritos de alegría.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN.....	XI
OBJETIVOS.....	XIII
INTRODUCCIÓN	XV
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Cerveza	3
2.2. Proceso producción cerveza	3
2.2.1. Casa de cocimientos	3
2.2.2. Fermentación.....	4
2.2.3. Embotellado.....	4
2.3. Materias primas	4
2.3.1. Malta	5
2.3.2. Agua	5
2.3.3. Lúpulos	5
2.3.4. Almidones o materiales donadores de almidón	6
2.3.5. Azúcares.....	6
2.4. Salón de embotellado.....	7
2.4.1. Desentarrimadoras	7
2.4.2. Desencajonadora.....	8
2.4.3. Lavadora de botellas	8

2.4.4.	Inspectores y conteo	8
2.4.5.	Llenadora	8
2.4.6.	Tapadora	9
2.4.7.	Pasteurizadora	9
2.4.8.	Encajonadora	9
2.4.9.	Entarimadoras	10
2.5.	Biopelículas	10
2.5.1.	Composición.....	11
2.5.2.	Sustancias poliméricas extracelulares EPS	11
2.5.3.	Biopelículas en cervecería	12
2.5.3.1.	Formación biopelículas.....	13
2.5.3.2.	Contaminación secundaria	14
2.6.	Control microbiológico dentro de salón de embotellado.....	14
2.6.1.	Pasteurización	15
2.6.1.1.	Pasteurización <i>flash</i>	15
2.6.1.2.	Pasteurización por túnel	16
2.6.1.3.	Unidades de pasteurización	16
2.6.2.	Preservantes	18
2.7.	Medios microbiológicos	19
2.7.1.	Medio de enriquecimiento	19
2.7.1.1.	Medio de enriquecimiento NBB-B-AM.....	19
2.7.2.	Medio de cultivo	22
2.8.	Microorganismos	22
2.8.1.	Morfología de las células de <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
2.8.2.	Morfología de la células de <i>Pediococcus damnosus</i>	23
2.8.3.	Morfología de las células de <i>Pectinatus</i>	23

2.8.4.	Morfología de las células de <i>Megasphaera</i>	24
2.9.	Caracterización de microorganismos	25
2.9.1.	Tinción de Gram	25
2.9.2.	Prueba de la catalasa	25
2.9.3.	Prueba de la oxidasa	26
3.	DISEÑO METODOLÓGICO	27
3.1.	Variables.....	27
3.1.1.	Descripción de variables a manipular	27
3.1.2.	Independientes	27
3.1.3.	Dependientes.....	28
3.2.	Delimitación del campo de estudio	28
3.3.	Recursos humanos disponibles.....	28
3.4.	Recursos materiales disponibles	28
3.4.1.	Cristalería y equipo.....	29
3.4.2.	Reactivos	29
3.5.	Técnica cualitativa y cuantitativa	30
3.6.	Recolección de la información.....	30
3.6.1.	Preparación tubos de ensayo	31
3.6.2.	Preparación tubos con medio de enriquecimiento NBB –B-AM	32
3.6.3.	Análisis de superficies en el salón de embotellado por medio de hisopado.....	32
3.6.4.	Transporte e incubación	33
3.6.5.	Lectura de muestras en tubos de ensayo.....	34
3.6.5.1.	Tinción de Gram	34
3.6.5.2.	Prueba de la catalasa	35
3.6.5.3.	Prueba de la oxidasa	35

3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.....	36
3.7.1.	Delimitación de los puntos de muestreo.....	37
3.7.2.	Análisis de los puntos de muestreo por medio del medio de enriquecimiento NBB-B-AM.....	38
3.7.3.	Condiciones del salón de embotellado.....	44
3.8.	Análisis estadístico.....	45
4.	RESULTADOS.....	49
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	51
	CONCLUSIONES.....	55
	RECOMENDACIONES.....	57
	BIBLIOGRAFÍA.....	59
	APÉNDICES.....	61

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Microfotografía de SEM de una biopelícula de <i>L. monocytogenes</i> sobre una tubería de PVC.....	10
2.	Diagrama de pasteurización.....	17
3.	Perfiles de temperatura y unidades de pasteurización.....	18
4.	Generación de microorganismos dañinos	20
5.	Reporte resultados de medio de enriquecimiento NBB-B-AM.....	21
6.	Clave para la determinación de bacterias en cervecería.....	36
7.	Diagrama de Pareto de los puntos de análisis microbiológico	47
8.	Porcentaje de tubos positivos utilizando el medio nutritivo NBB-B-AM.....	49

TABLAS

I.	Reclamaciones debido a organismos que dañan la cerveza	12
II.	Consecuencias del crecimiento bacteriano en cerveza.....	13
III.	Descripción de variables	27
IV.	Descripción de los puntos de muestreo	37
V.	Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 1	38
VI.	Resumen del análisis microbiológico semana 1	40
VII.	Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 2.....	40
VIII.	Resumen análisis microbiológico semana 2	41
IX.	Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 3.....	41
X.	Resumen análisis microbiológico semana 3	42

XI.	Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 4	43
XII.	Resumen análisis microbiológico semana 4	44
XIII.	Temperatura del salón de embotellado.....	44
XIV.	Frecuencias de los puntos de muestreo	46
XV.	Confirmación de bacteria <i>Lactobacillus</i>	50
XVI.	Otras microorganismos encontrados en las muestras.....	50

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
°C	Grado Celsius
°F	Grado Fahrenheit
mL	Mililitros
μm	Micrómetros
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
EPS	Sustancia polimérica extracelular

GLOSARIO

Asa bacteriológica	Instrumento de laboratorio de tipo pinza que regularmente está hecho de una base de platino y un filamento de nicromo, utilizado para transportar inóculos de una solución madre al medio de cultivo.
Bacilo	Bacteria con forma alargada similar a un bastón, se dividen en diferentes grupos de acuerdo a sus ejes menores y son células procariotas.
Biopelícula	Matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida.
Coco	Bacterias que tienen forma esférica y se clasifican según la forma en la que se agrupan y son células procariotas.
Hisopado	Absorción de una muestra de microorganismos de un punto en específico por medio de un hisopo.
Inoculación	Implantación de microorganismos a un medio de cultivo.

Levadura	Hongo microscópico unicelular que tiene la capacidad de descomponer, por medio de fermentación, azúcares.
Levadura salvaje	Todo hongo microscópico unicelular que sea ajeno a la levadura que se cultiva para un particular tipo de cerveza.
Pasteurización	Tratamiento térmico utilizado para eliminar microorganismos no filtrados en el producto final y alargar la vida de anaquel. Los tratamientos varían dependiendo del tipo de producto y del equipo utilizado.
<i>Rinser</i>	Equipo utilizado para desinfectar el envase a llenar por medio de aspersores, utilizando una solución esterilizadora.
Tinción de Gram	Tinción diferencial para la visualización de bacterias, que se basa en la composición de la membrana celular para distinguir entre una prueba positiva o negativa, según el color remanente.

RESUMEN

Se realizó un análisis microbiológico de biopelículas en un salón de embotellado de cerveza para prevenir e identificar los focos de contaminación y evitar contaminaciones cruzadas en el producto a envasar o embotellar.

Por medio de un hisopado se recolectaron muestras de 34 puntos distintos diariamente durante cuatro semanas para analizar el nivel de higiene del salón. Dichas muestras se introdujeron en tubos de ensayo previamente esterilizados y se añadió 10 mililitros de un medio de enriquecimiento específico llamado NBB-B-AM, cuya función principal es identificar microorganismos que pueden afectar la calidad de la cerveza. Las muestras fueron incubadas durante 3 días a 27 grados centígrados para poder observar los resultados.

En el análisis de resultados se encontró que el porcentaje de tubos con viraje positivo, el cual indica presencia de microorganismos dañinos para la cerveza, está sobre el límite establecido y aumenta al pasar los días luego de la limpieza general. En las muestras se confirmó la presencia de *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, y levaduras salvajes; estas se encontraron por medio de microscopía y pruebas primarias de microbiología.

Se identificaron los puntos con mayor frecuencia con viraje positivo y se encontró que eran los que estaban más cerca de la llenadora y en lugares húmedos, para que así sean limpiados efectivamente con procedimientos de saneamiento.

OBJETIVOS

General

Implementar un análisis microbiológico de superficies para identificar y analizar los puntos críticos de contaminación por biopelículas dentro de un salón de embotellado de cerveza.

Específicos

1. Identificar el porcentaje de tubos positivos dentro de un salón de embotellado con un medio de enriquecimiento específico para biopelículas.
2. Encontrar los puntos críticos de contaminación dentro del salón de embotellado por medio de un hisopado.
3. Confirmar la presencia de *Lactobacillus* y *Saccharomyces cerevisiae* por medio de microscopía y pruebas primarias.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las grandes industrias compiten ofreciendo productos de alta calidad dentro de parámetros establecidos. Se realizan análisis de calidad rigurosos en el proceso de transformación de productos y en los terminados por medio de indicadores o patrones, y propiedades importantes que dotan de las características que identifican a un producto como tal y satisface una necesidad.

En el proceso de la cerveza se controlan tanto parámetros fisicoquímicos como microbiológicos en la elaboración y embotellado. Es importante controlar la actividad biológica de los microorganismos, ya que estos son seres vivos que pueden aumentar o reducir su actividad y reproducción de acuerdo a las condiciones del ambiente donde se encuentren.

En los salones de embotellado se tiene un ambiente que puede ser propicio para el crecimiento de microorganismos en biopelículas si no se da una adecuada limpieza. Los focos de contaminación por medio de microorganismos deben de ser controlados por medio de un sistema de limpieza más efectivo, reduciendo las posibilidades de que la cerveza se dañe o contamine por una fuente secundaria.

Es necesario un análisis que identifique los focos y los puntos críticos de contaminación en el salón de embotellado, asegurando la calidad del producto y la inocuidad del mismo. Las biopelículas es una temática que no se ha profundizado mucho en la actualidad, pero tiene gran importancia en la industria alimenticia.

1. ANTECEDENTES

Pocos estudios se han realizado acerca de las biopelículas en Latinoamérica. En la microbiología de la cerveza las biopelículas forman una parte importante debido a que son focos de contaminación. Se encontraron estudios en Europa con relación al estudio de biopelículas en el ámbito de la cerveza.

En 2003 en Osnabrück, Alemania, Markus Timke y un grupo de investigadores publicaron el artículo científico *Microbial composition of biofilms in a brewery investigated by fatty acid analysis, fluorescence in situ hybridisation and isolation techniques*. En él expone el análisis de biopelículas de microorganismos dañinos para el producto terminado en plantas de cervecería.

Dentro del análisis observaron que la mayoría de microorganismos que estropean la cerveza dependen de numerosas interacciones con microorganismos acompañantes. Se analizaron bandas transportadoras en salones de embotellado y el material obtenido a partir de ellas fue analizado después de ser cultivado y aislado. Se realizaron análisis de ácidos grasos e hibridación fluorescente in situ (FISH). Se encontraron comunidades heterogéneas con *Proteobacterias*. Con el análisis FISH se encontraron *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, el *Xanthomonadaceae*, la *Actinobacteria*, la *Bacteroidetes* y el *Firmicutes*, entre las más importantes.

En el 2006, las investigadoras finlandesas Riikka Juvonen and Maija-Liisa Suihko, presentaron el artículo científico *Megasphaera paucivorans sp. nov.*,

Megasphaera sueciensis sp. nov. And *Pectinatus haikarae* ps. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. En el artículo se presenta el análisis de caracterización de siete bacterias no identificadas, estrictamente anaeróbicas, Gram-negativo, no formadoras de esporas de cerveza estropeada del ambiente de la cervecería.

Basado en el análisis 16S rRNA análisis de secuencia de genes, todas las cepas estaban afiliados a la clase *Clostridia*. Tres de las cepas eran cocos no móviles, estando relacionados cercanamente con las especies *Megasphaera Anaeroglobus*. Las otras cuatro cepas eran bacilos móviles helicoidales. La más alta similitud de genes se encontró entre estas 4 cepas y *Pectinatus cerevisiiphilus*, en un 95,6 por ciento y con el *Pectinatus frisingensis* en un 93,6 por ciento.

En 2008, Tomas Branyic, Antonio Vicente y otros investigadores presentaron el artículo científico *Growth Model and Metabolic Activity of Brewing Yeast Biofilm on the Surface of Spent Grains: A Biocatalyst for Continuous Beer Fermentation*. En este artículo se expone el análisis de la levadura inmóvil dentro de los biorreactores y las biopelículas que estas forman. Se realizó un modelo matemático del crecimiento de la biopelícula de levadura inmovilizada en la superficie de partículas de bagazo, basado en la deposición de células, crecimiento de células inmovilizadas y biomasa inmovilizada. Se calculó también que el grosor promedio de una capa de biopelícula es de 10 micrómetros. Con el modelo se pueden predecir las dinámicas de células inmóviles, la carga máxima de biomasa y el consumo de glucosa en un reactor.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cerveza

Se define cerveza a una bebida obtenida por fermentación alcohólica de mosto, elaborado a partir de cereales malteados y lúpulo con o sin adición de cereales no malteados y azúcares, con la agregación de levadura cervecera (*Saccharomyces cerevisiae*), y con un grado alcohólico no mayor a 12 grados Gay Lussac.

2.2. Proceso producción cerveza

Una fábrica de cerveza puede dividirse en tres grandes secciones, las cuales comprenden desde el proceso de transformación de las materias primas hasta embotellar el producto final, dichas secciones son:

- Casa de cocimientos
- Fermentación y maduración
- Salón de embotellado

2.2.1. Casa de cocimientos

La casa de cocimientos es el inicio del proceso donde la malta y otras materias primas. Esta sección se encarga de efectuar trabajos de tipo físico, químico y biológico, como lo son: aumento de área superficial por medio de molienda, solubilización de almidones y su transformación en azúcares, lupulación, esterilización, entre otros.

La casa de cocimientos se encarga de realizar la receta cervecera. Todo carácter que la cerveza tenga, ha sido adquirido directa o indirectamente en esta sección. Entrega un mosto preparado para ser el caldo nutriente en la sección de fermentación.

2.2.2. Fermentación

En la sección de fermentación, el trabajo se puramente biológico. Es un proceso vivo, realizado por la levadura cervecera, no se le encuentra en la naturaleza. Su hábitat único, es el mosto de cervecería, y fue asilada por el biólogo sueco Christian Hansen. El producto principal de la fermentación cervecera es el alcohol etílico, y paralelo a este, se forma el buqué de la cerveza, constituido por ésteres, alcoholes, ácidos, aldehídos, entre otros. Una vez concluida la fermentación, la cerveza pasará un tiempo madurando su sabor y apariencia.

2.2.3. Embotellado

Luego del proceso de maduración, la cerveza se filtra para darle el último toque a la elaboración. Después de ser filtrada la cerveza se almacena y ya está lista para ser envasada, para lo cual se bombea por tuberías hasta llegar a maquinarias específicas que tienen como salida el producto terminado.

2.3. Materias primas

En la elaboración de cerveza se utiliza malta de cebada cervecera, agua, lúpulos, almidones o materiales donadores de almidón, llamados adjuntos y azúcares disacáridos y monosacáridos.

2.3.1. Malta

La malta utilizada para el proceso cervecero es específica para el mismo. Se fabrica a partir de cebada cervecera en un proceso llamado malteado, que consiste en remojo, germinación y tostado de la malta.

La malta contribuye a la elaboración de cerveza como donadora de carbohidratos, compuestos nitrogenados, minerales, ácidos, vitaminas, polifenoles, lípidos y compuestos coloreados.

Las características de la malta definen en gran parte el tipo de cerveza producida, por lo que las cualidades de ésta, deberán especificarse por el cervecero y mantenerse lo más constante que sea posible.

2.3.2. Agua

El agua para cervecería deberá ser potable, baja en alcalinidad, con un contenido de calcio de 100 a 300 partes por millón (ppm), de pH neutro o ácido, esto para evitar incrustaciones en equipos y afectar la calidad del producto.

2.3.3. Lúpulos

El lúpulo es una especie extraída de las flores de la planta femenina *Homulus lupulus*. Esta especie influye en la cerveza con compuestos que contribuyen en el sabor y olor, específicamente, el amargo característico de la cerveza es debido a los iso- alfa-ácidos, el componente básico de los lúpulos; además contribuye con compuestos polifenólicos.

Existen varias presentaciones de lúpulos: en flor, en extracto, en pastillas. Estos se compran de acuerdo a su contenido de alfa ácidos.

2.3.4. Almidones o materiales donadores de almidón

Cualquier material que contenga almidón es una posible materia prima en cervecería. Su uso dependerá de lo inerte que sean sus otros componentes en el proceso cervecero. No deberán contribuir con sabor, olor, color ni compuestos nocivos al proceso, como pueden ser lípidos, gomas y otros.

Los adjuntos más usuales son el maíz y el arroz. Se consideran los adjuntos como sustitutos económicos de la malta, el límite de su uso se ha considerado hasta en un 40 por ciento de la cantidad total del extracto original.

Puede definirse como adjunto ideal aquel capaz de producir azúcares fermentables provenientes del almidón y dextrinas no fermentables en proporciones semejantes a las que se encuentran en mostos hechos exclusivamente con malta, con el mínimo aporte posible de proteínas.

2.3.5. Azúcares

El más usado es la sacarosa. También es posible el uso de glucosa en pequeñas proporciones. La sacarosa es un donador de azúcar fermentable. Su uso también depende de factores económicos, además tendrá como límite la concentración máxima de sacarosa en el mosto tal que, no aumente el contenido de ésteres normales en una cerveza.

Es necesario hacer la observación de que el uso y los límites de las materias primas dependen del lugar de consumo, las leyes existentes y el consumidor.

2.4. Salón de embotellado

Como aspectos de la calidad, es esencial que la cerveza que se encuentra dentro de la botella, lata o barril llegue a su comprador en un recipiente que tenga buen aspecto y que pueda guardar las características de su sabor.

El salón de embotellado básicamente consiste en:

- Desentarrimadoras
- Desencajonadoras
- Lavadora de botellas
- Inspectores y contadores
- Llenadora
- Tapadora
- Pasteurizadora
- Etiquetadora
- Inspectores y contadores
- Encajonadoras
- Entarrimadoras

2.4.1. Desentarrimadoras

Son máquinas que recogen de las tarimas las cajas con botellas vacías y coloca estas en la línea transportadora. Las cajas luego son utilizadas para colocar el producto final.

2.4.2. Desencajadora

Es una máquina que se encarga de extraer las botellas vacías de las cajas. Las cajas siguen en un transportador hacia la lavadora de cajas y las botellas se dirigen en otro transporte hacia la lavadora de botellas.

2.4.3. Lavadora de botellas

Su función es lavar y esterilizar las botellas vacías, por medio de sucesivos baños de soluciones cáusticas a distintas temperaturas, y finalmente, chorros de agua para arrastrar las soluciones que queden en las botellas.

Es necesario un estricto cuidado sobre las concentraciones y temperaturas de los baños cáusticos para que la máquina trabaje correctamente.

2.4.4. Inspectores y conteo

Luego de lavadas las botellas, es necesaria una inspección mecánica y ocular para cerciorarse completamente que las botellas se encuentra limpia, vacía y apta previo a su llenado. Existen inspectores ópticos electrónicos que verifican el envase a una alta velocidad. Estos a su vez tienen un contador de botellas, a partir del cual se mide la velocidad de la línea de embotellado.

2.4.5. Llenadora

Son máquinas automáticas de forma circular giratoria y que debe mantenerse perfectamente limpia. Las hay de distintos tamaños y capacidades. La cerveza se mantiene en el recipiente giratorio bajo presión de aire o gas

carbónico, con el objeto de evitar agitaciones bruscas y que en una forma suave se traslade la cerveza al envase.

2.4.6. Tapadora

Inmediatamente a la salida de la llenadora, se efectúa el taponado de la botella o lata, en una máquina acoplada. Esta máquina también funciona con una estrella giratoria que transporta el envase para que pueda ser taponado.

2.4.7. Pasteurizadora

Las botellas llenas son transportadas a la pasteurizadora, la cual es una cámara con distintas secciones de temperatura, por las que se hacen transitar las botellas, teniendo las precauciones debidas. En este caso para tener un producto pasteurizado es necesario que tengan todas las botellas un determinado número de unidades de pasteurización, las que varían de 10 a 20.

Se define una unidad de pasteurización, como la permanencia durante un minuto a una temperatura de 60 grados centígrados.

Luego de que la botella ha sido pasteurizada, se le somete a una nueva inspección y conteo.

2.4.8. Encajonadora

Las botellas etiquetadas continúan hacia la encajonadora, que es la máquina encargada de introducir las botellas dentro de las cajas. Existe una amplia variedad de diseños de estas máquinas según opciones comerciales.

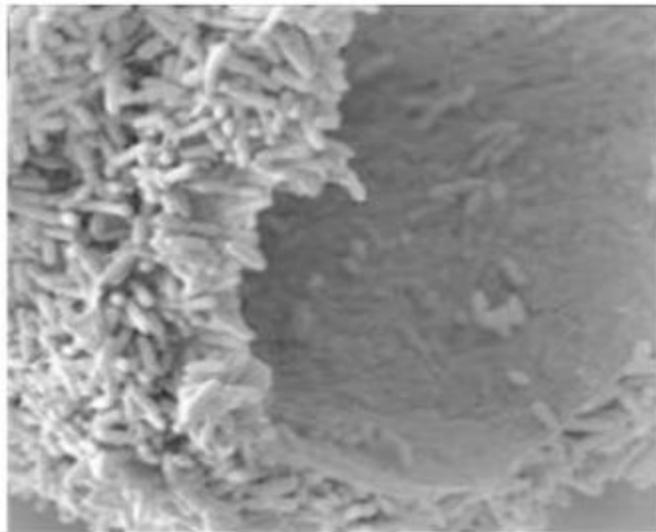
2.4.9. Entarimadoras

Son las máquinas encomendadas a ir formando las tarimas de cajas con producto terminado o botellas vacías, las que se transportan por distintos medios a las bodegas de productos terminados o de envase respectivamente.

2.5. Biopelículas

Una biopelícula se considera como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida, incluyendo superficies minerales, tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales.

Figura 1. **Microfotografía de SEM de una biopelícula de *L. monocytogenes* sobre una tubería de PVC**



Fuente: NAVIA, Diana. *Las biopelículas en la industria de alimentos*. p. 119.

La mayoría de las células se pueden adaptar porque se adhieren a superficies con presencia de sustratos que generalmente están contenidos dentro de una matriz orgánica polimérica de origen microbiano.

2.5.1. Composición

La composición de las biopelículas es variada y depende del tipo de células involucradas en la biopelícula. Las microcolonias pueden estar compuestas por:

- 10-25 % de células
- 75-90 % de matriz polimérica extracelular (EPS)

Los requisitos para el crecimiento de la biopelícula son la presencia de microorganismos y el sustrato; si alguno de estos no se encuentra disponible, la biopelícula no se formará. La sinergia existente dentro de la comunidad de la biopelícula, es el factor que permite que ésta soporte condiciones adversas y pueda sobrevivir.

2.5.2. Sustancias poliméricas extracelulares EPS

Las biopelículas que se encuentran en la naturaleza consisten en comunidades de microorganismos primarios viables y no viables protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) polianiónicas fijadas a la superficies.

Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas con un porcentaje de agua entre 85 y 95 por ciento. Las sustancias poliméricas extracelulares protegen a los microorganismos que hacen parte de la biopelícula contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes.

2.5.3. Biopelículas en cervecería

Los microorganismos que descomponen la cerveza se limitan a unos pocos. El microorganismo más importante en la descomposición de la cerveza ha sido el *Lactobacillus brevis*.

Tabla I. Reclamaciones debido a organismos que dañan la cerveza

Especie	1997	1998	1999	2000	2001	2002
<i>Lactobacillus brevis</i>	36.0	42.0	40.0	50.0	42.7	48.8
<i>Lactobacillus lindneri</i>	10.0	4.0	10.0	7.5	12.7	11.4
<i>L. brevisimilis</i>	5.0	1.0	1.0	1.9	0	2.4
<i>L. plantarum</i>	2.0	4.0	2.0	0.9	0.7	2.4
<i>L. casei/paracasei</i>	1.0	9.0	5.0	8.5	4.0	4.1
<i>L. coryniformis</i>	6.0	11.0	4.0	0.9	2.7	5.7
<i>Pediococcus damnosus</i>	4.0	14.0	12.0	14.2	21.3	12.2
<i>Pectinatus sp.</i>	31.0	3.0	6.0	4.7	10.0	6.5
<i>Megasphaera sp.</i>	6.0	2.0	4.0	3.8	4.0	1.6
<i>Obesumbacterium proteus/ Enterobacter agglomerans</i>	2.0	1.0	0	4.7	0	0
<i>Saccharomyces wild yeast</i>	0	6.0	2.0	4.7	2.0	3.3
<i>Non- Saccharomyces wild yeast</i>	7.0	3.0	0	0	0	1.6

Fuente: TIMKE, Markus. *Analysis of biofilm communities in breweries*. p. IX.

El crecimiento de estos microorganismos en la cerveza tiene diferentes impactos en la calidad del producto. Se puede observar algunos de estos impactos en la tabla II.

Tabla II. **Consecuencias del crecimiento bacteriano en cerveza**

Especie	Efecto en la cerveza
<i>Lactobacillus brevis</i>	Turbidez, sedimento
<i>Lactobacillus lindneri</i>	Turbidez, sedimento
<i>L. brevisimilis</i>	Ligera turbidez, ligeros sedimentos
<i>L. frigidus</i>	Turbidez fuerte, ligas
<i>L. casei</i>	Ligera turbidez, ligeros sedimentos, sabor a diacetil
<i>Pediococcus damnosus</i>	Sedimentos, en parte ligera turbidez, sabor a diacetil
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	Sedimentos, turbidez, sabor y olor desagradable
<i>Megasphaera cerevisie</i>	Ligera turbidez, en parte ligeros sedimentos, sabor y olor nauseabundos

Fuente: TIMKE, Markus. *Analysis of biofilm communities in breweries*. p. X.

2.5.3.1. Formación biopelículas

Las bacterias que dañan a la cerveza son sensibles al calor, desinfectantes y a un ambiente seco, debido a esto solo sobreviven en combinación con más microorganismos resistentes.

El primero de los pasos en la formación de biopelículas se da por la bacteria del ácido acético, la cual coloniza las superficies, en particular *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter frateurii*. Luego se da lugar a la formación de ligas en ciertos nichos.

El siguiente paso postulado es el asentamiento de levaduras y *Lactobacillus brevis*. La acidificación del ambiente por medio de las bacterias de ácido acético modifica el ambiente, permitiendo a las bacterias lácticas ácido tolerantes a asentarse. Las levaduras y bacterias de ácido acético producen ligas y baba que protege a los microorganismos. La presencia de lactato, originada de las bacterias de ácido láctico, permite la colonización de microorganismos anaeróbicos dañinos para la cerveza, como *Pectinatus spp.* y *Megasphaera sp.*

Finalmente, cerveza remanente y espuma proveen una fuente de nutrientes constante. Por lo tanto, las biopelículas son consideradas como una reserva de microorganismos dañinos para la cerveza.

2.5.3.2. Contaminación secundaria

Las biopelículas pueden ser acarreadas por personas, salpicaduras, movimientos, acción del aire a estructuras y equipo, las cuales pueden caer dentro de envases. Esto es conocido como contaminación secundaria, la cual toma lugar durante el proceso de llenado. Una infección de la cerveza durante el proceso de producción es definida como una contaminación primaria. Cualquiera de estas dos contaminaciones disminuye la calidad del producto.

2.6. Control microbiológico dentro de salón de embotellado

Idealmente, se tiene una carga microbiana baja, debido a que en el proceso de elaboración se le presta bastante atención a la higiene y el proceso de filtración es eficiente.

2.6.1. Pasteurización

A pesar de que la cerveza es relativamente resistente a arruinarse, esto no quiere decir que los microorganismos sean incapaces de crecer. Por esta razón, cerveza es tratada para eliminar cualquier residuo de levaduras cerveceras, levaduras salvajes y bacterias que puedan infectarla antes o durante el empacamiento. Para tratar la cerveza microbiológicamente, se debe pasteurizar.

La pasteurización se puede realizar de dos formas:

- Pasteurización *flash*
- Pasteurización por túnel

2.6.1.1. Pasteurización *flash*

En la pasteurización flash, la cerveza fluye a través de un intercambiador de calor, el cual aumenta la temperatura, por lo general a 72 grados centígrados (162 grados Fahrenheit). El tiempo de residencia de la cerveza en el intercambiador es de 30 a 60 segundos, lo cual es suficiente para matar a todos los microbios.

La configuración del pasteurizador flash funciona de manera que el calor de la cerveza que está dejando el equipo se utiliza para calentar a la cerveza entrante. Es esencial que el nivel de oxígeno sea lo más bajo posible antes de la pasteurización, debido a que cuando la temperatura aumenta, el oxígeno se cocina dentro del producto, causando sabores desagradables.

2.6.1.2. Pasteurización por túnel

Los pasteurizadores de túnel comprenden largas cámaras de calor a través de las cuales la cerveza sellada o tapada, ya sea en lata o botella, es transportada por un período de minutos. Las temperaturas en un túnel de pasteurización son bajas, aproximadamente 60 grados centígrados (140 grados Fahrenheit), por un tiempo de residencia de 10 a 20 minutos.

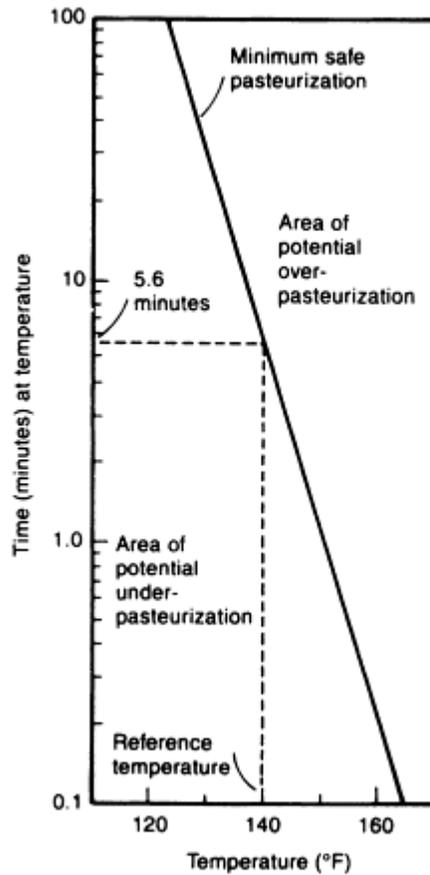
2.6.1.3. Unidades de pasteurización

Una unidad de pasteurización (PU) está definida como 1 minuto a 60 grados centígrados (140 grados Fahrenheit) o su equivalente basado en la curva promedio de muertes de microorganismos encontrados en la cerveza.

Los diagramas de pasteurización para microbios cerveceros presentan una línea continua que define las condiciones tiempo-temperatura que se necesitan para entregar un mínimo de unidades de pasteurización.

El diagrama de pasteurización es una curva logarítmica, establecida mediante observaciones empíricas. La curva relaciona el tiempo y la temperatura del tratamiento de calor a los microorganismos sobrevivientes o muertos.

Figura 2. Diagrama de pasteurización

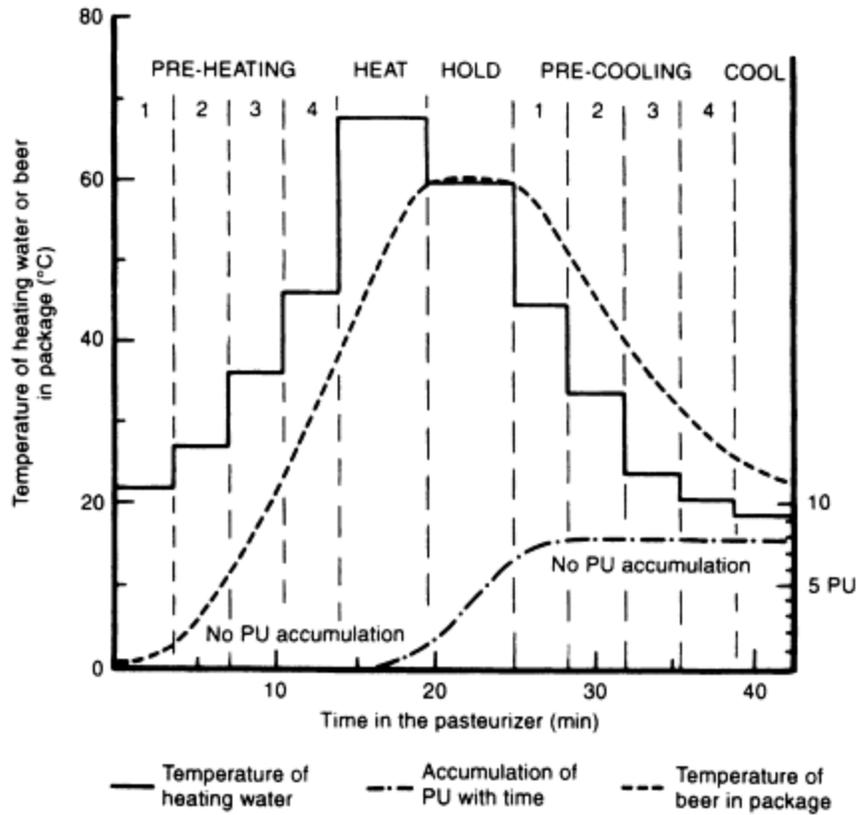


Fuente: LEWIS, Michael. *Brewing*. p. 358.

Cerveceros utilizan tradicionalmente de 5-15 unidades de pasteurización. Esta cantidad de calor debe ser recibida por el centro de la botella o lata, de manera que la cerveza cercana a las superficies del contenedor reciba más calor, en el caso de la pasteurización por túnel.

A continuación se muestran los perfiles de temperatura del agua y de la cerveza en un pasteurizador de túnel.

Figura 3. **Perfiles de temperatura y unidades de pasteurización**



Fuente: LEWIS, Michael. *Brewing*. p. 359.

2.6.2. **Preservantes**

No se añaden aditivos a la cerveza debido a un compromiso voluntario arreglado en la ley alemana de pureza. Esto hace que la bebida cumpla con altos parámetros de calidad y libre de compuestos químicos preservantes.

2.7. Medios microbiológicos

Los medios microbiológicos se pueden utilizar para diferentes fines, los cultivos se realizan en lugares asépticos, generalmente un laboratorio de microbiología en un ambiente aislado.

2.7.1. Medio de enriquecimiento

Un medio de enriquecimiento es un medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, entre ellos algunos de los más exigentes. Se utilizan comúnmente para la cosecha de diferentes tipos de microbios que están presentes en la muestra.

2.7.1.1. Medio de enriquecimiento NBB-B-AM

Es un medio de enriquecimiento para la detección de bacterias que dañan la cerveza. Tiene un pH de $5,9 \pm 0,1$. Se utiliza en el análisis de puntos débiles en llenadoras y lugares de producción, donde luego se pueden realizar análisis posteriores.

Para obtener un buen análisis acerca de la higiene del salón, se deben de tomar por lo menos una vez a la semana de 20 a 30 muestras en el salón. La incubación se realiza por un máximo de 3 días, de 26 a 28 grados centígrados, bajo condiciones anaeróbicas. Este medio de enriquecimiento es sensible a los microorganismos que dañan a la cerveza, y al momento de detectarlos, el color del indicador cambia de rojo a amarillo. El tiempo de respuesta al cambio de color, depende de varios factores, entre ellos:

- Conteo de células inicial
- Tipo de gérmenes
- Grado de adaptación a la cerveza
- Condición fisiológica y origen de los gérmenes

Figura 4. **Generación de microorganismos dañinos**

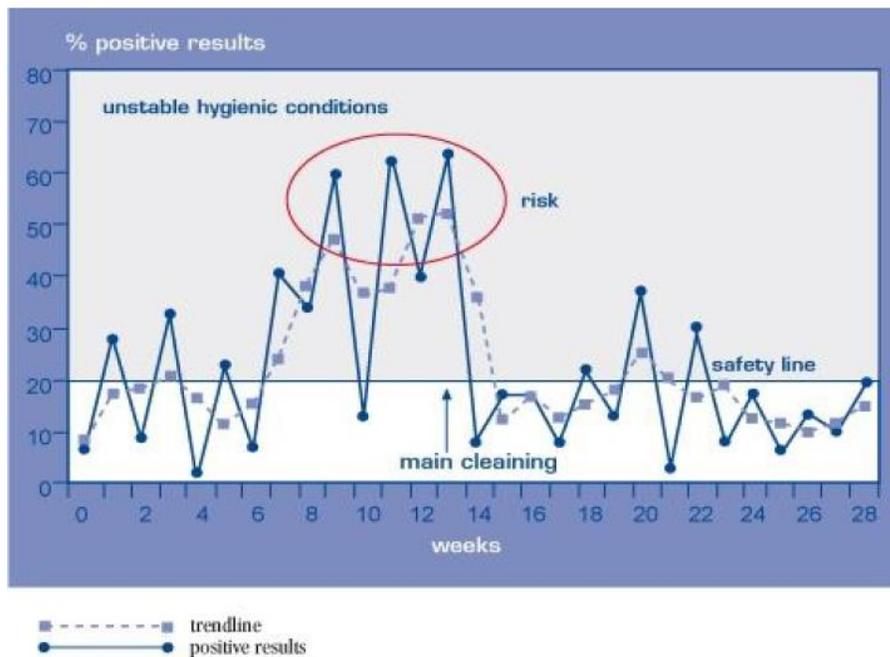
Etapa	Gérmenes	Resultados del hisopado con NBB-B-AM (cambio de color de rojo a amarillo) 27 °C
Caso Normal	Bacterias de ácido acético <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Acetobacter liquefaciens</i> y otros microorganismos formadores de ligas	- Después de 4-5 días
Paso 1	Capas de bacterias de ácido acético (Acetan) También microorganismos formadores de ligas.	+ Después de 3 días
Paso 2	Capas de bacterias de ácido acético (biofilms) <i>Biofilms</i> persistentes Formación de ligas Encapsulación	+ Después de 2 días
Paso 3	Capas de bacterias de ácido acético (biofilms) <i>Biofilms</i> persistentes Levaduras + Bacterias de ácido láctico + Bacterias coliformes +	+ Después de 1-2 días Gas +
Paso 4	Capas de bacterias de ácido acético <i>Biofilms</i> persistentes Levaduras + Bacterias de ácido láctico+ Pectinatus, Megasphaera + Bacterias coliformes + y gérmenes patógenos potenciales	+ Después de 1 día Gas +

Fuente: Döhler. *Microsafety design user manual NBB-B-AM*. p. 3.

Una incubación de un día puede ser suficiente en caso de una contaminación muy alta. La mayoría de las veces se requieren varios días para identificar trazas de contaminación. La evaluación final se debe realizar hasta dentro de tres días.

Los resultados proporcionados por el medio de enriquecimiento se reportan de dos maneras. La primera es la representación en porcentaje de la cantidad de tubos de ensayo donde hubo un viraje positivo. Un salón de embotellado con varias líneas de producción se encuentra en un buen estado cuando los tubos están debajo de un 30 por ciento de tubos con viraje positivo. El segundo, es el reporte del día en que el medio dentro del tubo de ensayo cambio de color de rojo a amarillo y los microorganismos que se encontraron.

Figura 5. **Reporte resultados de medio de enriquecimiento NBB-B-AM**



Fuente: Döhler. *Microsafety design user manual NBB-B-AM*. p. 4.

2.7.2. Medio de cultivo

Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

Existen varias presentaciones de estos medios. Existen presentaciones desecadas en forma de polvo fino o granulas antes de ser preparados. Ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.

Generalmente tras analizar un cultivo, se realiza un conteo bacteriano con el fin de saber cuál es la densidad de población microbiana que se encuentra en la muestra representativa.

2.8. Microorganismos

Son seres vivos que solo pueden ser observados por medio de un microscopio, presentan una organización biológica elemental y pueden ser unicelulares o pluricelulares. La ciencia que los estudia es la microbiología.

2.8.1. Morfología de las células de *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum pertenece a los bacilos heterofermentativos de ácido láctico. Estos forman gas del gluconato, pero no de los azúcares fermentables comunes. Es considerado un potencial dañador de la cerveza. Su presencia hace que se puedan distinguir malos sabores, por la acción del diacetil.

2.8.2. Morfología de la células de *Pediococcus damnosus*

El coco más importante de las bacterias de ácido láctico en la cervecería es el *Pediococcus damnosus*. Es una bacteria bastante temida debido a la formación de diacetil, el cual da un sabor a queso desagradable. En botellas contaminadas, se da la formación de sedimento y aparece el sabor que el diacetil posee.

2.8.3. Morfología de las células de *Pectinatus*

Las especies de *Pectinatus* son GRAM-negativos, estrictamente anaeróbicas y absolutos dañadores de la cerveza. Las células son delgadas, con paredes paralelas, un poco arqueadas o con forma helicoidal. Tienen un diámetro en promedio de 0,8 micrómetros (μm) y una longitud de 4 micrómetros (μm) y tienen extremos redondos. Están ciliados lateralmente y se mueven rápido si son jóvenes; al envejecer el movimiento es más lento.

El *Pectinatus* crece a temperaturas entre 15 y 40 grados Celsius, siendo su óptimo rango entre 30 y 32 grados Celsius. Fermenta varios azúcares, alcoholes de azúcar y ácidos orgánicos. En presencia de azúcares fermentables, el medio es acidificado, pero cuando el lactato o el piruvato es fermentado, se puede notar un pequeño incremento del pH. Los metabolitos primarios son los ácidos propionico, acético y succínico.

La bacteria crece en cualquier cerveza con un pH mayor a 4,4 y con bajo contenido de oxígeno (<0,3 mg/L). Altos valores de oxígeno son tolerados solo en casos de severas contaminaciones. La cerveza contaminada exhibe sedimentos pesados, neblina y coágulos, como mal sabor y olor. El *Pectinatus* se considera como una contaminación secundaria sólo en cerveza embotellada.

2.8.4. Morfología de las células de *Megasphaera*

La *Megasphaera cerevisiae* es GRAM-negativo, estrictamente anaeróbica, y absoluta dañadora de la cerveza. A diferencia del *Pectinatus*, presenta una forma de células ovalada o redonda, preferiblemente como pares o cadenas de cuatro. Tienen diámetros de 1,2 a 1,6 micrómetros (μm). El rango de temperatura para esta especie es de 15 a 37 grados Celsius, con un rango óptimo de 28 a 30 grados Celsius. Su crecimiento se da tanto en presencia de azúcares, como si no los hay. Sus principales metabolitos son el ácido butírico, acético, propanoico, valérico y caprílico, así como también dióxido de carbono e hidrógeno molecular. Sulfuro de hidrógeno se produce también.

Una ligera acidificación ocurre en la presencia de fructosa, mientras que el pH aumenta si el medio está libre de azúcares, debido a la fermentación del lactato o piruvato.

M. cerevisiae solo forma ligera neblina y sedimentos apenas visibles, pero causa sabores y olores desagradables. Se forman compuestos de mal olor como el sulfuro de hidrógeno y ácidos butírico y caprílico. Como la especie no tolera el alcohol muy bien, cervezas con bajo alcohol y cervezas de dieta están particularmente en riesgo. Se requiere bajos niveles de oxígeno ($<0,3 \text{ mg/L}$) y valores de pH arriba de 4,5 para que tenga crecimiento, mientras que el extracto fermentable y la amargura no influencia en la susceptibilidad a la contaminación.

M. cerevisiae es un típico contaminador secundario en los salones de embotellado, su comportamiento es bastante similar al *Pectinatus*, puede que ambos sean encontrados en los mismos puntos débiles.

2.9. Caracterización de microorganismos

Existen diferentes tipos de pruebas para caracterizar y confirmar un microorganismo, el cual ha sido aislado para su análisis. Entre las pruebas más importantes están las pruebas primarias, como la tinción de Gram y la prueba de la catalasa. También se utiliza la prueba de la oxidasa.

2.9.1. Tinción de Gram

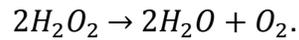
La tinción de Gram es una tinción diferencial que permite observar la morfología bacteriana. El fundamento radica en las diferencias estructurales de la pared celular de ambos grupos bacterianos. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacárida externa.

Al añadir alcohol-acetona se arrastrará el colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas queda retenido y las células permanecerán de color violeta, debido al colorante cristal violeta. Las células Gram negativas se teñirán de color rosado por el colorante de contraste utilizado (safranina).

2.9.2. Prueba de la catalasa

La prueba analiza la capacidad de destruir los derivados tóxicos del oxígeno, generados por algunas bacterias mediante la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno. Se debe utilizar agua oxigenada al 10 por ciento.

La reacción positiva de la catalasa implica desprendimiento de oxígeno:



2.9.3. Prueba de la oxidasa

La prueba hace uso de discos impregnados con el reactivo TMFD o DMFD, el cual también es un indicador redox. El reactivo pasa de azul oscuro a granate al ser oxidado, y se vuelve transparente al ser reducido.

Las bacterias oxidasa positiva poseen citocromo oxidasa o indofenol oxidasa. Ambas catalizan el transporte de electrones de compuestos donantes a receptores de electrones. El sistema citocromo está normalmente presente solo en los organismos aerobios capaces de usar el oxígeno como aceptor final de hidrógeno. El producto final de este metabolismo puede ser agua o peróxido de hidrógeno.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

Para la realización del análisis son fundamentales las variables tiempo, temperatura del ambiente y el porcentaje de muestras positivas tomadas del salón de embotellado.

Tabla III. Descripción de variables

Variable	Dimensional	Dependiente	Independiente
Tiempo	Día		X
Temperatura	°C		X
Porcentaje muestras positivas	%	X	

Fuente: elaboración propia.

3.1.1. Descripción de variables a manipular

No se manipularán variables debido a que se analizará periódicamente un fenómeno que está en desarrollo durante un período de tiempo. Las variables son dadas por las condiciones del salón de embotellado.

3.1.2. Independientes

La variable independiente será el tiempo entre el cual se toman las muestras y la temperatura del ambiente del salón del embotellado. Esto para representar la periodicidad del análisis y las condiciones a las que fue realizado.

3.1.3. Dependientes

La variable dependiente será el porcentaje de tubos con medio de enriquecimiento con viraje positivo. Esta variable es de interés debido a que refleja el estado de higiene del salón y la tendencia a formar biopelículas.

3.2. Delimitación del campo de estudio

El estudio se limitará a la implementación de análisis de biopelículas en superficies de un salón de embotellado de cerveza y a la caracterización de las especies de microorganismos dañinos para la misma, incluyendo el mejoramiento del sistema de limpieza.

3.3. Recursos humanos disponibles

Para realizar el análisis fue necesario un investigador y un asesor que guiara el trabajo a partir de la experiencia profesional, los cuales se presentan en la lista siguiente:

- Diego Josué Milián Izeppi: investigador
- Inga. Hilda Piedad Palma de Martini: asesor

3.4. Recursos materiales disponibles

Es necesario tener el equipo de laboratorio adecuado para poder analizar a los microorganismos formadores de biopelículas de manera correcta y obtener un resultado confiable.

3.4.1. Cristalería y equipo

En la siguiente lista se presenta la cristalería y el equipo de microbiología necesario para realizar un análisis de biopelículas en superficies y confirmar la presencia de ciertos microorganismos.

- Tubos de ensayo sellados
- Gradilla
- Pipeta de 10 mililitros
- Puntas para pipetas
- Hisopos estériles sellados
- Incubadora anaeróbica de 27 grados Celsius
- Campana de extracción
- Microscopio, marca Leica
- Cajas de Petri
- Termómetro
- Autoclave, marca Varioklav
- Porta objetos
- Mechero
- Asa bacteriológica
- Tiras Bactident® Oxidasa, marca Merck

3.4.2. Reactivos

Los reactivos brindan la capacidad de seleccionar y clasificar las muestras tomadas del salón de embotellados. Estos son específicamente para el análisis de microorganismos.

- Medio de enriquecimiento NBB-B-AM, marca Döhler
- Cristal violeta
- Lugol
- Agua estéril
- Solución alcohol acetona
- Safranina
- Agua oxigenada
- Alcohol al 95 % (v/v)
- Aceite de inmersión

3.5. Técnica cualitativa y cuantitativa

El trabajo de investigación posee tanto un análisis cualitativo y uno cuantitativo. Se analizará un fenómeno en un sistema, del cual los resultados dependen de los cambios cualitativos presentados en medios de enriquecimiento, para luego analizarlos cuantitativamente como un conjunto de datos.

El trabajo de investigación es de carácter cualitativo, cuantitativo y experimental.

3.6. Recolección de la información

Para obtener los datos que servirán para elaborar los resultados es necesario seguir una serie de procedimientos, de esta manera se puede recolectar y ordenar la información.

3.6.1. Preparación tubos de ensayo

Los tubos de ensayo deben de estar previamente esterilizados, para que microorganismos del ambiente no interfieran en el análisis, causando una contaminación cruzada.

Si los tubos no están esterilizados, proceder a esterilizarlos por medio de un autoclave.

- Esterilización: es determinante el esterilizar los instrumentos y equipo a utilizar durante un análisis microbiológico, para evitar contaminaciones cruzadas y datos erróneos.
 - Verificar que el autoclave esté conectado a una fuente de poder y que el recipiente de condensados tenga un nivel óptimo de agua.
 - Abrir la compuerta del autoclave y colocar dentro los instrumentos y equipo a esterilizar.
 - Colocar cinta de autoclave a los ítems a esterilizar.
 - Cerrar la compuerta y la válvula de presión del autoclave.
 - Fijar la temperatura a 121 grados Celsius.
 - Encender el autoclave.
 - Al finalizar, abrir lentamente la válvula de presión, para que el condensado salga.
 - Abrir la compuerta y sacar los instrumentos y equipos ya esterilizados.
 - Revisar que el nivel de condensados no supere el nivel óptimo, provocando un derrame.

3.6.2. Preparación tubos con medio de enriquecimiento NBB –B-AM

Los tubos de ensayo deben de contener el medio de enriquecimiento, el cual hasta ese momento debe de estar almacenado de 4 a 8 grados Celsius. De no ser así se pueden obtener lecturas falsas al momento de realizar el muestreo.

- Colocar los tubos de ensayo en una gradilla dentro de una campana de ventilación para microbiología.
- Abrir el medio de enriquecimiento NBB-B-AM dentro de la campana.
- Abrir un tubo de ensayo y utilizando una pipeta serológica y una punta esterilizada, extraer 10 mililitros del medio de enriquecimiento y verter dentro del tubo de ensayo.
- Cerrar el tubo de ensayo y colocar nuevamente en la gradilla.
- Repetir el procedimiento con todos los tubos de ensayo para muestrear.

3.6.3. Análisis de superficies en el salón de embotellado por medio de hisopado

El análisis de las biopelículas se realiza en puntos clave del salón de embotellado, en donde las botellas y latas sin tapar pueden tener contacto con el ambiente y sufrir una contaminación cruzada.

- Hisopado: la utilización de hisopos estériles de algodón para la toma de muestras es bastante útil para recoger materia que se encuentre dispersa en distintos tipos de superficies. El hisopo permite llegar a lugares que no están a la vista.

- Colocarse guantes.
- Identificar el tubo con medio de enriquecimiento con la superficie que se va a muestrear.
- Sostener el tubo de ensayo con la mano izquierda y con el dedo meñique de la mano derecha destapar el tubo de ensayo.
- Agarrar un hisopo por la punta posterior, utilizando para ello los dedos pulgar, índice y corazón.
- Sumergir el hisopo dentro del medio de enriquecimiento y luego haciendo fuerza con un ángulo de 90 grados barrer la superficie a analizar, tratando de recolectar la materia que se perciba.
- Quebrar el hisopo dentro del tubo, de modo que el extremo que ha sido tocado no caiga dentro del tubo de ensayo.
- Repetir el mismo procedimiento con todos los puntos críticos de muestreo.

3.6.4. Transporte e incubación

Luego de tomar las muestras es importante llevarlas a un lugar adecuado, para que estén libres de contaminación y en un ambiente adecuado según las indicaciones de incubación, esto para tener resultados confiables.

- Llevar los tubos de ensayo con las muestras tomadas de superficies lo más pronto posible al laboratorio de microbiología.
- Incubar en aeróbicamente a 27 grados Celsius.
- Revisar diariamente el viraje del medio de enriquecimiento en los tubos (el viraje de color es de rojo a amarillo).
- Incubar por un máximo de 3 días.

3.6.5. Lectura de muestras en tubos de ensayo

Durante un máximo de tres días de incubación, revisar diariamente el viraje de los tubos de ensayo y apartarlos según el día en que el medio de enriquecimiento tuvo un cambio de color (rojo a amarillo).

Con los tubos de ensayo que tuvieron un viraje positivo, se realizarán las siguientes pruebas en el siguiente orden:

3.6.5.1. Tinción de Gram

Esta es una tinción diferencial que permite distinguir los microorganismos dependiendo de la morfología celular bacteriana, esta tinción es de carácter cualitativo.

- Flamear toda la superficie del asa hasta el rojo vivo.
- Aislar y recoger una colonia bacteriana con el asa.
- Extender una colonia bacteriana sobre un portaobjetos con una gota de agua y fijarla en llama.
- Agregar cristal violeta de manera que se cubra toda la superficie de la colonia.
- Dejar en contacto por 1 minuto.
- Lavar con agua estéril el exceso de colorante.
- Añadir lugol, cubriendo toda la superficie.
- Dejar en contacto por 1 minuto.
- Lavar el portaobjetos utilizando únicamente 3 gotas de solución alcohol-acetona.
- Enjuagar con agua estéril.
- Teñir la superficie agregando safranina.

- Esperar 1 minuto.
- Enjuagar con agua estéril.

3.6.5.2. Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, algunas bacterias contienen esta enzima y se pueden clasificar según su reacción con el peróxido de hidrógeno.

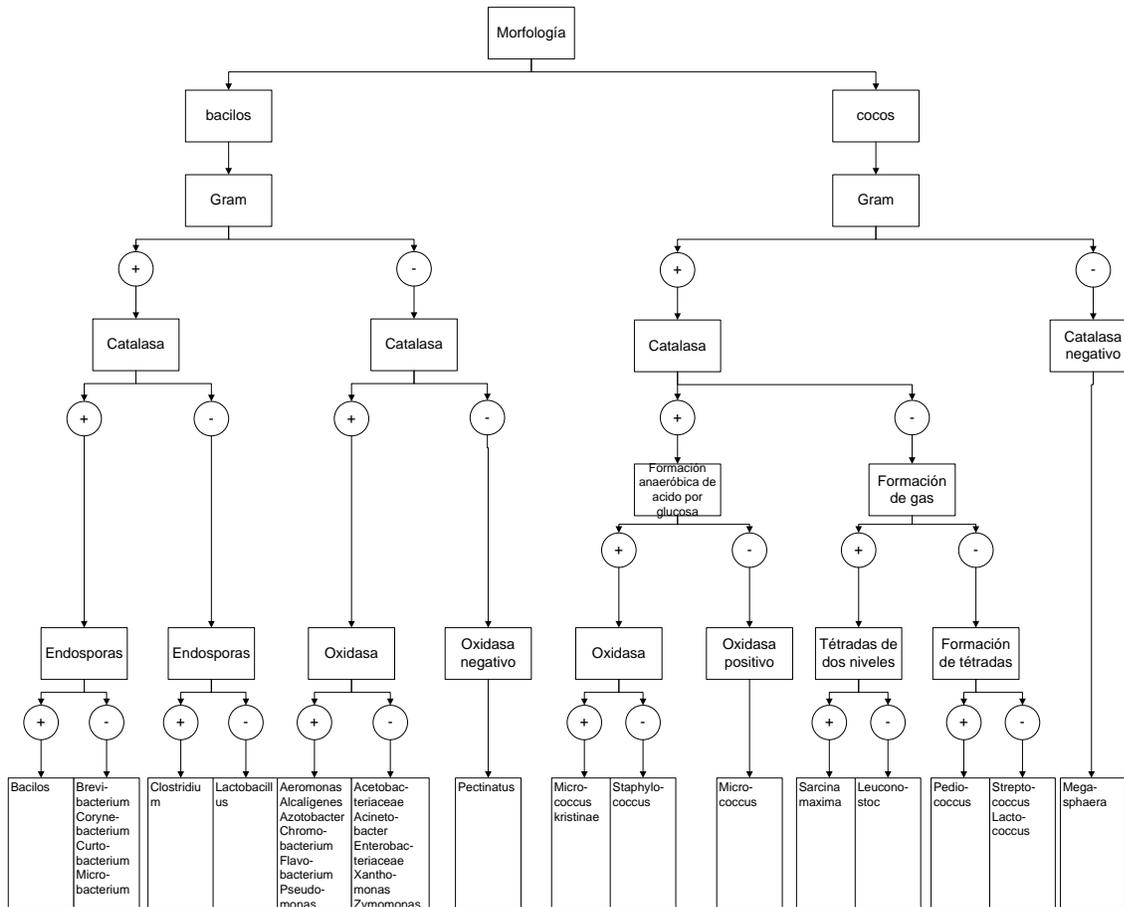
- Flamear toda la superficie del asa hasta el rojo vivo.
- Aislar y recoger una colonia bacteriana con el asa.
- Colocarla sobre un portaobjetos.
- Agregar una gota de agua oxigenada al 10 por ciento.
- Observar si hay desprendimiento de oxígeno, como efervescencia.
- Si lo hay, la prueba es positiva.

3.6.5.3. Prueba de la oxidasa

Esta prueba consiste en detectar la enzima oxidasa, generalmente en bacterias Gram negativas. Se da una reacción que da lugar a un sistema citocromo-oxidasa, el cual permite clasificar a la muestra como oxidasa positiva o negativa.

- Realizar una suspensión densa en 0,2 mililitros de agua destilada estéril a partir de un cultivo puro.
- Agregar una tira Bactident ® Oxidasa.
- Esperar un minuto.
- Si la prueba es positiva se observará una coloración rojo-fucsia en la tira y/o en la solución.

Figura 6. Clave para la determinación de bacterias en cervecería



Fuente: BACK, Werner. *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*. p. 43.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

En el presente análisis se recolectaron muestras de diferentes puntos para ser analizadas microbiológicamente. A continuación se presenta el detalle de los puntos de muestreo y los resultados de las muestras a través del tiempo.

3.7.1. Delimitación de los puntos de muestreo

Para tener consistencia en el análisis de biopelículas del salón, se eligieron 34 puntos que fueron considerados como posibles focos de contaminación. A partir de estos puntos se desarrolló el estudio.

Tabla IV. Descripción de los puntos de muestreo

PUNTO	LÍNEA	DESCRIPCIÓN
1	LÍNEA 1 A	Parte superior del transportador de envase
2		Panel del <i>rinser</i>
3		Parte media del transportador de envase
4		Parte inferior del transportador de envase
5		Superficie de la entrada a la llenadora
6		Canaleta protectora de la entrada de la llenadora
7		Canaleta protectora de la salida de la llenadora
8		Carril de salida de la llenadora
9		Estrella transportadora de la llenadora
10		Estrella transportadora de la selladora
11		Armadura 1 de transporte de envase
12		Armadura 2 de transporte de envase
13	LÍNEA 1 B	Parte superior del transportador de envase
14		Panel del <i>rinser</i>
15		Parte media del transportadora de envase
16		Parte inferior del transportadora de envase
17		Superficie de la entrada de la llenadora
18		Conducto de dióxido de carbono
19		Carril de salida de la llenadora
20		Estrella transportadora de la llenadora
21		Estrella transportadora de la selladora
22		Armadura 2 de transporte de envase
23		Armadura 4 de transporte de envase
24		Armadura 6 de transporte de envase

Continuación de la tabla IV.

PUNTO	LÍNEA	DESCRIPCIÓN
25	LÍNEA 1	Salida lavadora de envase
26		Domo cobertor plástico 1
27		Domo cobertor plástico 2
28		Domo cobertor plástico 4
29		Domo cobertor plástico 5
30		Superficie del transporte de envase 1
31		Superficie de transporte de envase 2
32		Superficie entrada inspector de envase
33		Estrella transportadora de la llenadora
34		Estrella transportadora de la coronadora

Fuente: elaboración propia.

3.7.2. Análisis de los puntos de muestreo por medio del medio de enriquecimiento NBB-B-AM

En las siguientes tablas se presentan los resultados de las 4 semanas de muestreo. Se presentan como 1 las muestras que obtuvieron un viraje positivo y como 0 las que no obtuvieron ningún viraje.

Tabla V. Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 1

Punto	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Frecuencia
1	0	1	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	1	0	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	1	0	0	0	2
5	1	1	1	1	1	1	1	7
6	1	1	1	1	1	1	1	7
7	0	1	1	1	1	1	1	6
8	0	0	1	1	1	1	1	5

Continuación de la tabla V.

9	1	1	1	1	1	1	1	7
10	1	1	1	1	1	1	1	7
11	0	0	0	1	1	1	1	4
12	0	0	1	0	1	1	1	4
13	1	0	0	1	0	0	1	3
14	1	1	1	0	1	0	0	4
15	0	0	0	1	0	1	0	2
16	0	0	0	0	0	1	0	1
17	1	1	1	1	1	1	1	7
18	1	1	1	1	1	1	1	7
19	1	1	1	1	1	1	1	7
20	1	1	1	1	1	1	1	7
21	1	1	0	1	0	1	1	5
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1	1	1	0	0	1	1	5
24	0	0	0	0	1	0	0	1
25	0	0	0	0	0	1	0	1
26	0	0	0	1	0	0	0	1
27	0	0	0	0	0	1	0	1
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	1	1	1	0	3
34	1	0	0	0	1	1	1	4

Fuente: elaboración propia.

Tabla VI. **Resumen del análisis microbiológico semana 1**

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Número de tubos con viraje positivo	13	13	14	17	16	21	16
Porcentaje de tubos con viraje positivo	38,24 %	38,24 %	41,18 %	50,00 %	47,06 %	61,76 %	47,06 %

Fuente: elaboración propia.

Tabla VII. **Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 2**

Punto	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Frecuencia
1	0	0	1	0	1	1	0	3
2	0	1	0	0	0	0	0	1
3	1	0	0	0	0	0	0	1
4	1	1	0	1	0	1	1	5
5	0	1	1	1	1	1	1	6
6	1	1	1	1	1	1	1	7
7	1	1	1	1	1	1	1	7
8	0	0	1	1	1	1	0	4
9	1	1	1	1	1	1	0	6
10	1	1	1	1	1	1	1	7
11	1	1	1	1	1	0	0	5
12	0	0	1	1	1	0	1	4
13	0	0	1	1	0	0	0	2
14	0	1	0	0	0	0	0	1
15	0	0	1	0	0	0	0	1
16	0	1	0	0	0	0	0	1
17	1	1	1	1	1	1	1	7
18	1	1	1	1	1	1	1	7
19	1	1	1	1	1	1	1	7
20	1	1	1	1	1	1	1	7
21	1	1	1	1	1	1	1	7
22	1	1	0	1	1	0	0	4
23	1	1	0	1	1	0	1	5
24	1	1	1	1	1	1	0	6
25	0	0	0	0	0	0	0	0

Continuación de la tabla VII.

26	0	0	1	0	1	0	1	3
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	1	0	0	0	0	0	0	1
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	1	0	1	2
31	0	0	1	0	1	0	0	2
32	1	1	1	1	1	0	0	5
33	1	1	1	0	1	1	0	5
34	1	1	1	1	1	0	1	6

Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. Resumen análisis microbiológico semana 2

	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
Número de tubos con viraje positivo	19	21	22	20	23	15	15
Porcentaje de tubos con viraje positivo	55,88 %	61,76 %	64,71 %	58,82 %	67,65 %	44,12 %	44,12 %

Fuente: elaboración propia.

Tabla IX. Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 3

Punto	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Frecuencia
1	1	0	0	0	1	1	1	4
2	0	0	1	0	0	0	0	1
3	0	1	0	0	0	0	0	1
4	1	1	1	1	1	1	1	7
5	1	1	1	0	1	1	1	6
6	1	1	1	1	1	1	1	7
7	1	1	1	1	1	1	1	7
8	1	1	0	1	1	0	1	5
9	1	1	1	1	1	1	1	7
10	0	1	1	1	0	1	1	5

Continuación de la tabla IX.

11	0	1	1	1	0	0	0	3
12	1	1	0	1	0	1	0	4
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	1	0	0	0	0	0	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	1	1	1	1	1	1	7
18	1	1	1	1	0	1	1	6
19	1	1	1	1	1	1	1	7
20	1	1	1	1	1	1	1	7
21	1	1	0	1	1	1	1	6
22	0	0	0	1	0	0	0	1
23	0	0	1	0	0	0	0	1
24	1	0	1	0	1	0	1	4
25	1	0	0	0	0	0	0	1
26	1	1	0	0	0	0	0	2
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0	0	0	0	1
31	0	0	1	0	0	0	0	1
32	0	0	0	1	0	0	0	1
33	1	1	1	0	0	1	1	5
34	1	1	1	1	1	1	0	6

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Resumen análisis microbiológico semana 3**

	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21
Número de tubos con viraje positivo	19	19	17	16	13	15	15
Porcentaje de tubos con viraje positivo	55,88 %	55,88 %	50,00 %	47,06 %	38,24 %	44,12 %	44,12 %

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Análisis microbiológico de puntos de muestreo semana 4**

Punto	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28	Frecuencia
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	1	1	1	4
5	1	1	1	1	1	1	1	7
6	1	1	1	1	1	1	1	7
7	1	1	1	1	1	1	1	7
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	1	1	1	1	1	1	7
10	0	0	0	1	1	1	1	4
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	1	0	1	1	1	4
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	1	1	1	1	1	1	7
18	1	1	1	1	1	1	1	7
19	1	1	1	1	1	1	1	7
20	1	1	1	1	1	1	1	7
21	1	1	1	1	1	1	1	7
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	1	0	0	0	0	0	1
25	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0

Continuación de la tabla XI.

31	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	1	0	1
34	0	0	0	1	1	1	1	4

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Resumen análisis microbiológico semana 4**

	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28
Número de tubos con viraje positivo	9	10	10	12	13	14	13
Porcentaje de tubos con viraje positivo	26,47 %	29,41 %	29,41 %	35,29 %	38,24 %	41,18 %	38,24 %

Fuente: elaboración propia.

3.7.3. Condiciones del salón de embotellado

Se tomó a la temperatura como variable para conocer las condiciones del salón de embotellado, debido a que la temperatura puede interferir en el crecimiento de microorganismos.

Tabla XIII. **Temperatura del salón de embotellado**

Día	Temperatura [°C]
1	25
2	25
3	23
4	23
5	24
6	24

Continuación de la tabla XIII.

7	23
8	21
9	25
10	24
11	24
12	26
13	26
14	25
15	24
16	24
17	24
18	24
19	23
20	24
21	25
22	25
23	24
24	24
25	25
26	23
27	24
28	25
Promedio	24.14
Desviación estándar	1.04

Fuente: elaboración propia.

3.8. Análisis estadístico

Para analizar la prioridad que cada punto de muestreo tiene en relación a los demás se realizó un diagrama de Pareto, el cual nos muestra cuales son los puntos que requieren más atención, teniendo una prioridad más alta. Para esto se tomó en cuenta la frecuencia con la cual cada punto dio un valor positivo.

Además se calculó la frecuencia relativa para poder representar gráficamente que porcentaje de incidencia tienen los puntos de muestreo elegidos.

Tabla XIV. Frecuencias de los puntos de muestreo

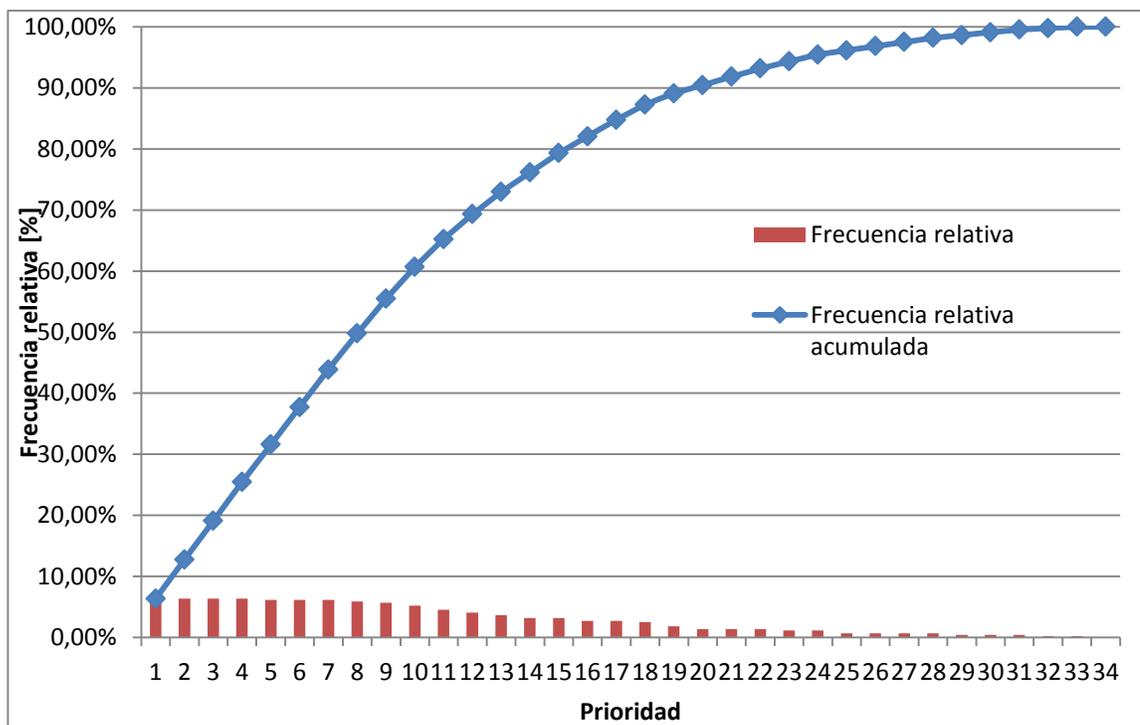
Prioridad	Punto	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulada
1	6	28	6,36 %	6,36 %
2	17	28	6,36 %	12,73 %
3	19	28	6,36 %	19,09 %
4	20	28	6,36 %	25,45 %
5	7	27	6,14 %	31,59 %
6	9	27	6,14 %	37,73 %
7	18	27	6,14 %	43,86 %
8	5	26	5,91 %	49,77 %
9	21	25	5,68 %	55,45 %
10	10	23	5,23 %	60,68 %
11	34	20	4,55 %	65,23 %
12	4	18	4,09 %	69,32 %
13	12	16	3,64 %	72,95 %
14	8	14	3,18 %	76,14 %
15	33	14	3,18 %	79,32 %
16	11	12	2,73 %	82,05 %
17	24	12	2,73 %	84,77 %
18	23	11	2,50 %	87,27 %
19	1	8	1,82 %	89,09 %
20	14	6	1,36 %	90,45 %
21	26	6	1,36 %	91,82 %
22	32	6	1,36 %	93,18 %
23	13	5	1,14 %	94,32 %
24	22	5	1,14 %	95,45 %
25	2	3	0,68 %	96,14 %
26	15	3	0,68 %	96,82 %
27	30	3	0,68 %	97,50 %
28	31	3	0,68 %	98,18 %

Continuación de la tabla XIV.

29	3	2	0,45 %	99,09 %
30	16	2	0,45 %	99,09 %
31	25	2	0,45 %	99,55 %
32	27	1	0,23 %	99,77 %
33	28	1	0,23 %	100,00 %
34	29	0	0,00 %	100,00 %

Fuente: elaboración propia.

Figura 7. **Diagrama de Pareto de los puntos de análisis microbiológico**

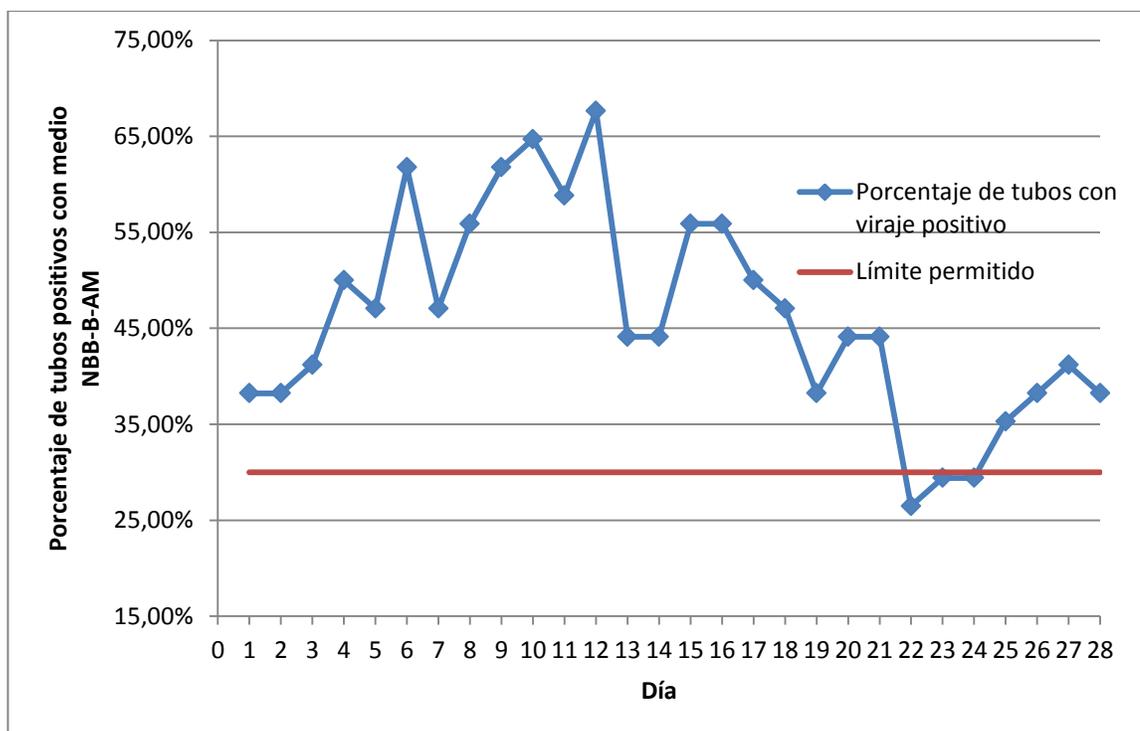


Fuente: elaboración propia.

4. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis microbiológico de superficies del salón de embotellado de cerveza, el cual se enfocó en el crecimiento de biopelículas.

Figura 8. **Porcentaje de tubos positivos utilizando el medio de enriquecimiento NBB-B-AM**



Fuente: elaboración propia.

Tabla XV. **Confirmación de bacteria *Lactobacillus***

Tinción de Gram	Prueba de la catalasa	Endosporas	Prueba de la oxidasa	Bacteria
+	-	-	-	<i>Lactobacillus</i>

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVI. **Otros microorganismos encontrados en las muestras**

MICROORGANISMO	PRESENCIA
<i>Pediococcus</i>	Negativo
Levadura cervecera (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Positivo
Levadura salvaje	Positivo

Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se evaluó la efectividad de las limpiezas de superficies de un salón de embotellado de cerveza por medio de un análisis de biopelículas. Se muestrearon 34 puntos de diferentes superficies que se catalogaron como posibles focos de contaminación secundaria por 28 días, utilizando hisopos estériles y un medio de enriquecimiento sensible a microorganismos que descomponen la cerveza.

En la selección de los puntos de muestreo se escogieron aquellos por los que el envase pasa sin estar tapado, de modo que es posible que el envase se contamine y así mismo se contamine el producto. Cada muestra se incubó por 3 días a 27 grados centígrados en tubos de ensayo estériles. Luego del tercer día se observa cuales cambiaron de color (de rojo a amarillo), para tomar el porcentaje de muestras positivas por día.

En la figura 8 se puede observar el comportamiento microbiológico del salón. El día número 1 pertenece al lunes de la semana 1. Se puede observar que mientras los días pasan, el porcentaje de tubos de enriquecimiento con viraje a amarillo aumenta, lo que significa que el salón de embotellado está más activo microbiológicamente al pasar los días. Hace falta mencionar que los días 7, 14, 21 y 28 corresponden a limpiezas generales y específicas en el salón de embotellado, razón por lo cual el nivel de actividad microbiológica disminuye en las semanas después de haber alcanzado un máximo.

Los resultados semana a semana se fueron analizando para reforzar la limpieza. El salón de embotellado trabaja las 24 horas los 7 días a la semana, por lo que la actividad nunca cesa y es difícil encontrar momentos para limpieza. Tras observar los resultados de la segunda semana se implementó realizar limpiezas diarias de aproximadamente 30 minutos. Esto ayudó bastante a mantener debajo del 50 por ciento el total de muestras con viraje positivo. Se enfatizó en limpiar lugares que podrían ser posibles nichos, como por ejemplo las áreas debajo de las estructuras del transporte, donde se puede guardar bastante suciedad y restos de cerveza.

Para la cuarta semana se pudo disminuir del límite propuesto, el cual era de 30 por ciento. Esto se logró enfocando las limpiezas en los puntos con mayor frecuencia y con la rigurosidad de las limpiezas diarias y la semanal. Conforme pasaron los días el porcentaje de tubos positivos creció, como es de esperarse al pasar los días desde la limpieza general. Se pudo observar la mejora en las últimas dos semanas, indicando que las limpiezas implementadas disminuyeron la actividad microbiológica.

A partir del análisis estadístico utilizando el diagrama de Pareto, se pudo observar cuales son los puntos más frecuentes y que son necesario atacar mejor en la limpieza. Los puntos número 6, 17, 19 y 20 presentaron una frecuencia con viraje positivo del 100 por ciento, lo que nos dice que estos puntos se contaminan fácilmente y es necesario prestarles atención. Estos fueron la canaleta protectora de la entrada de la llenadora de la línea 1A, superficie de la entrada de la llenadora de la línea 1B, carril de salida de la llenadora 1B y la estrella transportadora de la llenadora 1B.

Si se observan los puntos de muestreo que son menos frecuentes que los antes mencionados se puede observar que son puntos que se encuentran en la llenadora. Esto resulta lógico por el hecho de que la cerveza cae en las superficies circundantes y pueden crear actividad microbiológica, siendo un medio que provee de nutrientes a ciertos microorganismos, fase vital en la formación de las biopelículas. Según el diagrama de Pareto se pudo apreciar que en las superficies más húmedas es donde mejor se dan las condiciones para que los microorganismos formadores de biopelículas y que pueden arruinar la cerveza por medio de una contaminación secundaria puedan desarrollarse.

Para confirmar que microorganismos son los que se encontraron en el salón se tomaron los tubos que dieron positivo al análisis y se realizó un estriado microbiológico con ellos utilizando un asa bacteriológica previamente esterilizada en un mechero. Se tomó de la muestra el precipitado y la sedimentación que se formó para realizar el estriado. Se utilizó agar MRS y NBB-B como base para realizar el estriado. Se tomaron las colonias más resistentes y se procedió a analizarlas por microscopio y por pruebas primarias.

En el inciso 6 del apéndice 3 se puede observar la morfología de los bacilos a través del microscopio. En esta se puede observar la forma alargada de la bacteria y para confirmar dicha premisa se procedió a realizarse las pruebas primarias. La primera prueba que se realizó fue la tinción de Gram, la muestra retuvo el color azul purpura, característico del reactivo cristal violeta. Posteriormente se le hizo la prueba de la catalasa, la cual dio negativo ya que no hubo desprendimiento de oxígeno. Tampoco hubo formación de endosporas. Siguiendo el diagrama presentado en la figura 6, se puede observar con claridad que la bacteria observada es un *Lactobacillus*.

Los *Lactobacillus* son bacterias que están directamente involucradas con la formación de biopelículas, por lo que se puede ver que el medio de enriquecimiento NBB-B-AM es satisfactorio para realizar el análisis para prevenir que la cerveza se contamine por esta bacteria.

Se pudieron encontrar otras especies en las muestras analizadas. En el inciso 7 del apéndice 3 se pueden observar levaduras cerveceras, conocidas como *Saccharomyces cerevisiae*, se puede observar su morfología en forma ovalada y responden como Gram positivas al analizarlas. En el inciso 8 del apéndice 3 se pueden observar levaduras salvajes, estas se denominan así porque presentan otra morfología, diferente de las primeras y que pueden producir sabores indeseados en la cerveza, estas también dieron Gram positivo en la prueba.

Por lo tanto se tuvo un análisis satisfactorio por el hecho de reconocer los puntos débiles, saber que microorganismos pueden atacar el producto a causa de una contaminación secundaria y cómo atacar estos puntos débiles.

Para seguir mejorando la higiene del salón es necesario enfocarse en la limpieza de lugares húmedos y donde se pueda almacenar residuos de cerveza, ya que estos son focos de contaminación y pueden transportarse fácilmente por medio de fluidos, como el medio acuoso en el que están o el aire del ambiente. Quitar el exceso de cerveza de los transportadores y la llenadora reduce que los microorganismos se puedan esparcir por el salón y reducir la actividad biológica a un nivel controlable. Para que la actividad biológica no aumente se tiene que continuar con las limpiezas diarias y semanales, garantizando que no se amplíen los focos de contaminación durante el transcurso de los días de producción.

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de tubos positivos con el medio de enriquecimiento NBB-B-AM disminuye al realizar la limpieza general en todo el salón de embotellado.
2. El porcentaje de tubos positivos con el medio de enriquecimiento NBB-B-AM aumenta con el tiempo que se aleja de la limpieza general, al pasar los días de la semana, llegando a un máximo en el día 12 antes de la limpieza.
3. Se confirmó la presencia de *Lactobacillus* por medio de pruebas primarias y microscopía.
4. Se confirmó la presencia de levaduras cerveceras *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras salvajes por medio de microscopía y la tinción de Gram.

RECOMENDACIONES

1. Realizar el análisis de superficies para identificar los focos de microorganismos formadores de biopelículas por lo menos una vez a la semana.
2. Utilizar metodologías para identificar los microorganismos *Megasphaera* y *Pectinatus*, los cuales tienen efectos directos sobre las características organolépticas de la cerveza y son indicio de una actividad biológica avanzada.
3. Analizar por medio de ADN a los cultivos de *Lactobacillus* muestreados, identificando la cepa a la que pertenecen y los efectos en la cerveza.

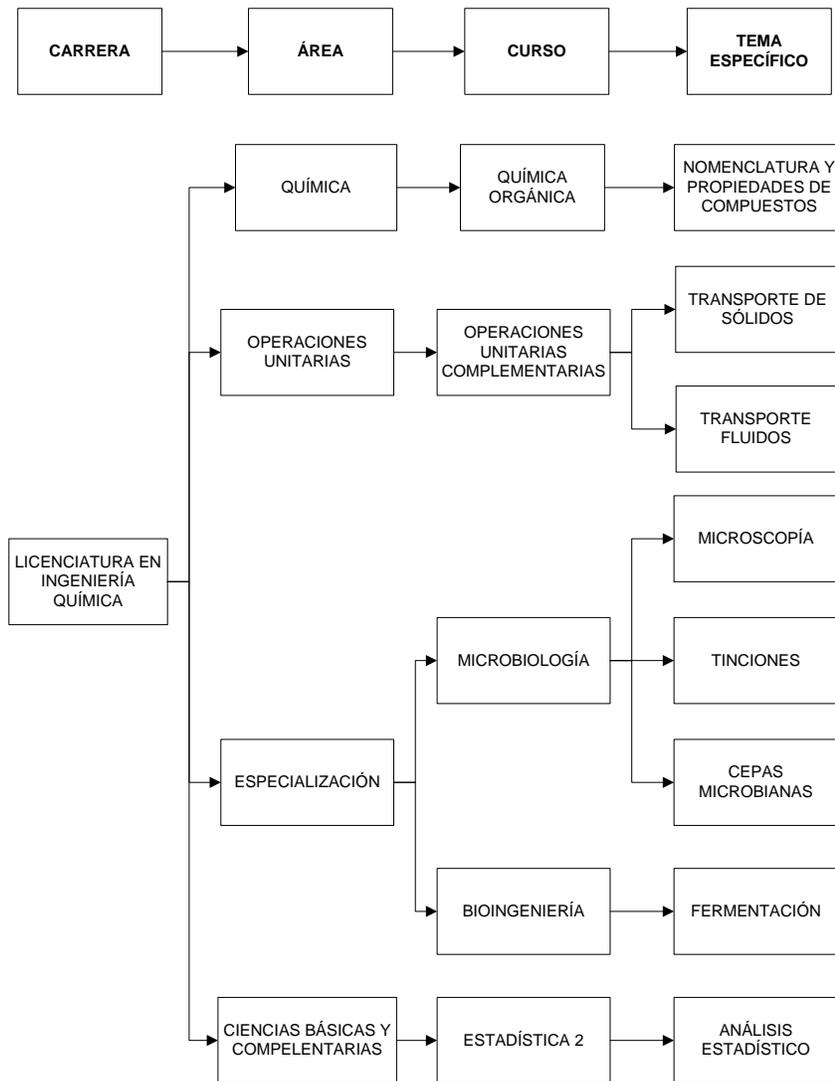
BIBLIOGRAFÍA

1. ALEMAN ARELLANO, José Alejandro. *Elaboración de cerveza a partir de mostos concentrados*. Guatemala: USAC, 1979. 69 p.
2. BACK, Werner. *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Alemania: Fachverlag Hans Carl, 2005. 317 p.
3. BAMFORTH, Charles. *Beer: Tap into the art and science*. 3a ed. New York: Oxford University Press, 2009. 272 p.
4. JUVONEN, Riikka. *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006. No. 56, p. 695-702.
5. LEWIS, Michael. *Brewing*. New York: Springer 2001. 398 p.
6. NAVIA, Diana Paola. *Las biopelículas en la industria de alimentos*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2010. Vol 8 No. 2, p. 118-128.
7. RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, María. *Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora*. España: Universitat Autònoma de Barcelona, 2009. 197 p.

8. TIMKE, Markus. *Analysis of biofilm communities in breweries*. Alemania:
Chemie der Universität Osnabrück, 2004. 154 p.

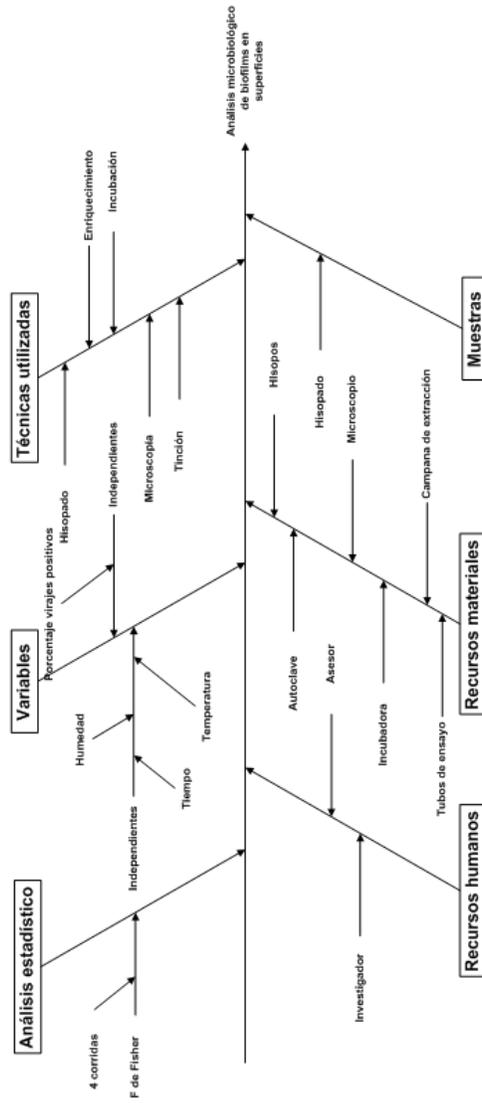
APÉNDICES

Apéndice 1. Requisitos académicos



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. Diagrama Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. Medio de enriquecimiento NBB-B-AM



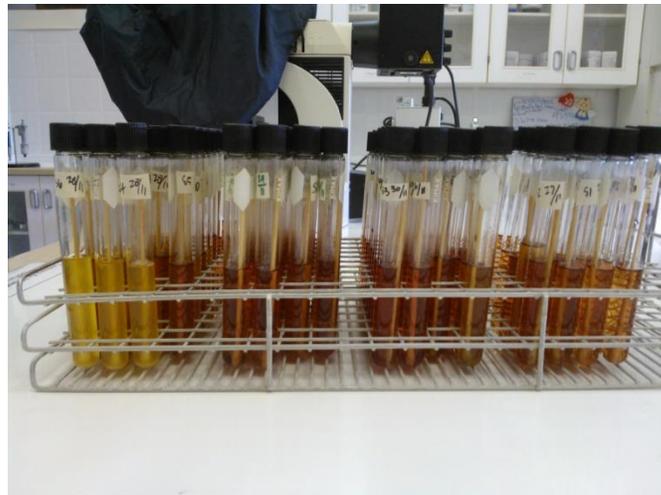
Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.

Apéndice 4. **Incubación de muestras a 27 °C de forma aerobia**



Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.

Apéndice 5. **Viraje positivo de rojo a amarillo en las muestras tomadas de superficies luego de 3 días**



Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.

Apéndice 6. **Microscopio Leica y reactivos Merck para realizar pruebas primarias**

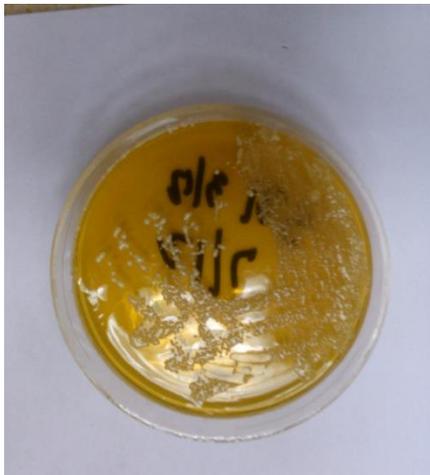


Continuación del apéndice 6.



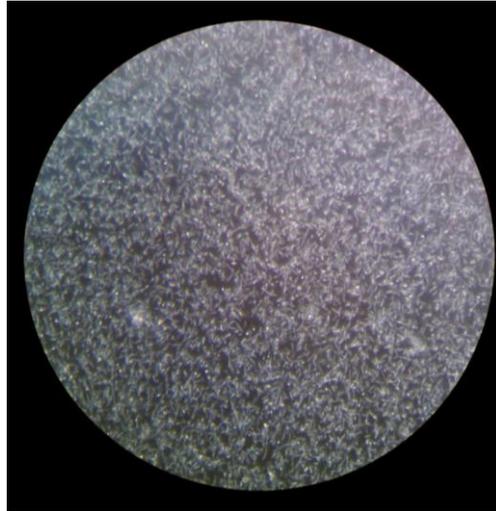
Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.

Apéndice 7. **Estriado en placas de Petri con agar MRS**



Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.

Apéndice 8. ***Lactobacillus*** observados en el microscopio Leica



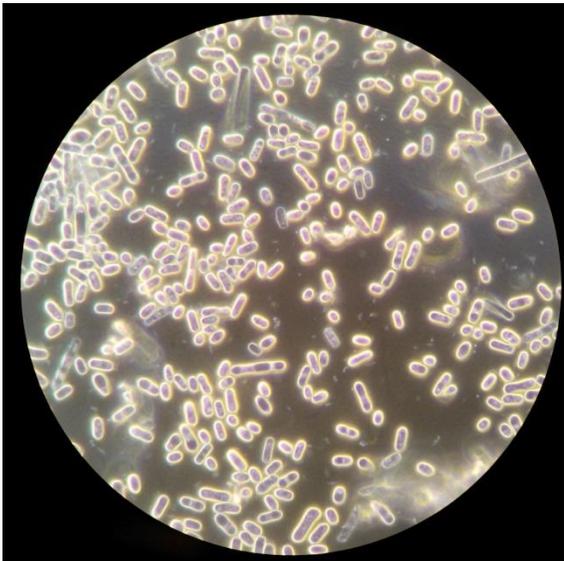
Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.

Apéndice 9. **Levadura cervecera *Saccharomyces cerevisiae***
observada en microscopio Leica



Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.

Apéndice 10. **Levadura salvaje observada en microscopio Leica**



Fuente: Laboratorio de Microbiología de fábrica de bebidas.