

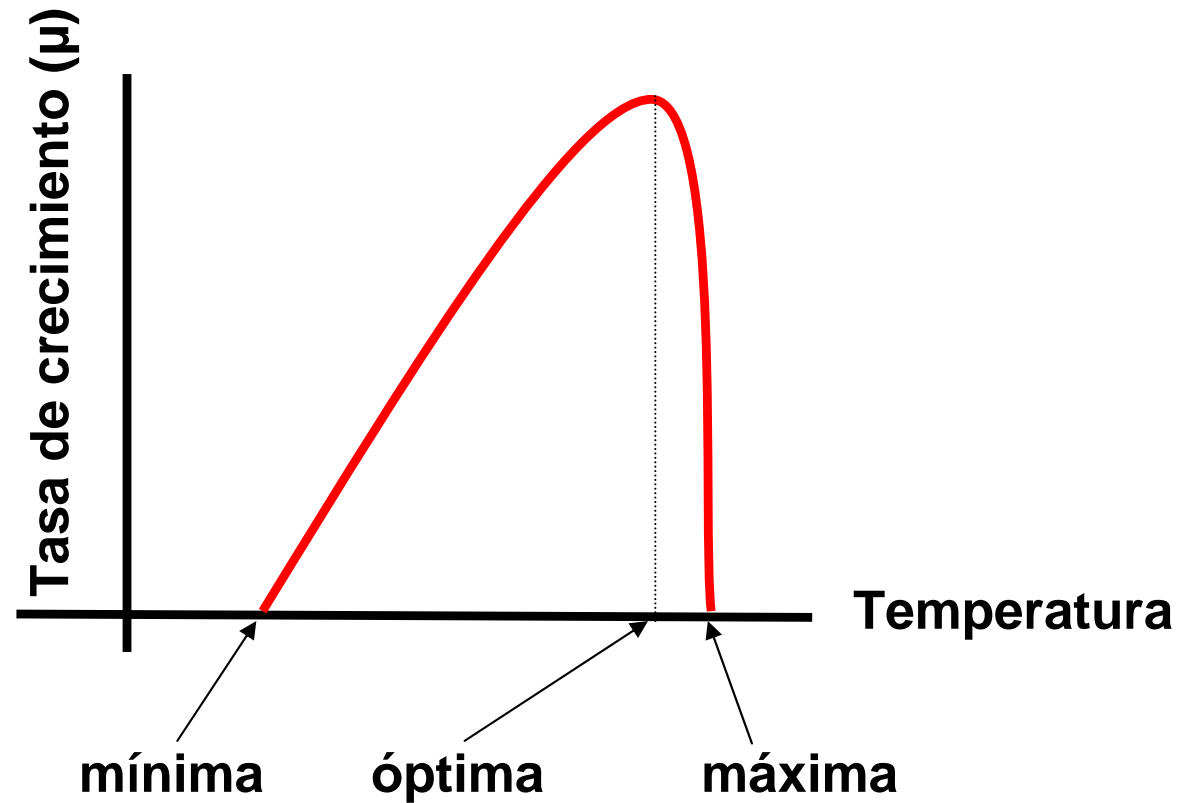
# Microbiología General

## 2008 - 2009

### Eliminación de microorganismos

- Teoría de la esterilización (conceptos de valores  $D$  y  $z$ ).
- Tratamientos industriales de esterilización: la Pasteurización, tratamientos HTST y LTLT, la Tyndallización.
- Esterilización por calor húmedo.
- Esterilización por calor seco.
- Esterilización por radiación.
- Esterilización por tratamiento químico.
- Esterilización por filtración.

# Altas temperaturas



- Los microorganismos mueren rápidamente cuando son sometidos a temperaturas superiores a su óptima de crecimiento. Esto permite utilizar altas temperaturas para eliminar microorganismos por termodestrucción. Los métodos basados en el calor son quizá los más utilizados para controlar el crecimiento microbiano.
- La **sensibilidad de los diferentes tipos de microorganismos** a los tratamientos térmicos es distinta.
  - Las esporas son la formas más termorresistentes y las células vegetativas las más sensibles.
  - Los microorganismos Gram-positivos tienden a ser más resistentes que los Gram-negativos.

Por consiguiente, desde un punto de vista práctico, la esterilización por calor está destinada a matar las esporas bacterianas.

Horno Pasteur: El calor seco se utiliza principalmente para esterilizar material de vidrio y otros materiales sólidos estables al calor. El aparato que se emplea es el horno Pasteur. Para el material de vidrio de laboratorio se consideran suficientes dos horas de exposición a 160° C.



### **Hornos de esterilización y despirogenación**

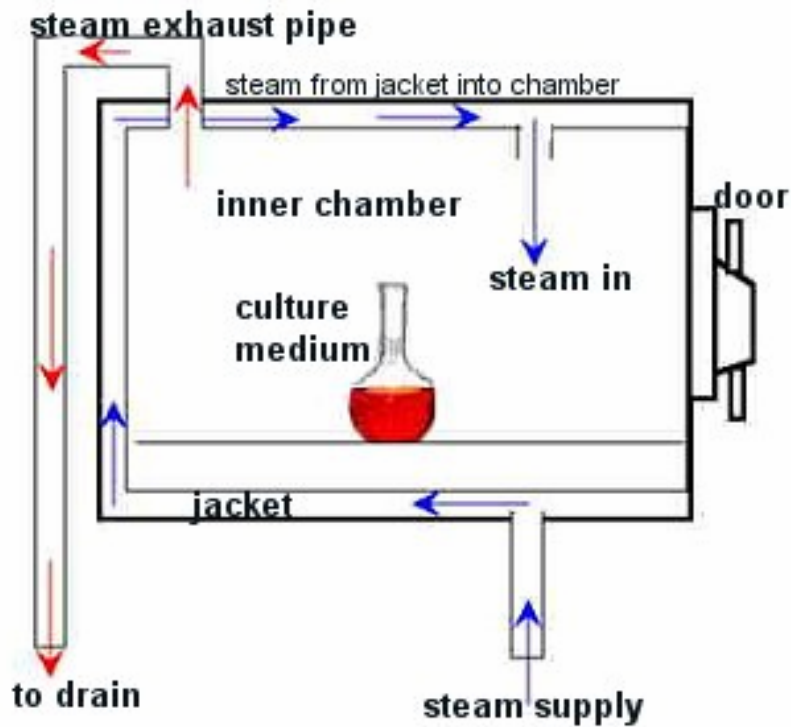
La esterilización por calor seco se utiliza generalmente para materiales que toleran altas temperaturas, generalmente de metal o vidrio. Es el método de elección siempre que sea posible, pues la superficie del material de vidrio, al ser la que está en mayor contacto con el producto, puede ser origen de contaminación pirogénica, siendo el calor seco un buen agente de destrucción de pirógenos. Además tiene la ventaja de que, al finalizar el ciclo, el material sale seco.

**Autoclave:** El calor en la forma de vapor a saturación y a presión es el agente más práctico para esterilizar ya que el vapor a presión proporciona temperaturas superiores a las que se obtienen por ebullición.

El aparato utilizado se llama autoclave (una olla que regula la presión interna y el tiempo). Los autoclaves de laboratorio se emplean generalmente a una presión de vapor de una atmósfera por encima de la presión atmosférica lo cual corresponde a una temperatura de 120° C.

El tiempo de exposición depende del volumen del líquido, de tal manera que para volúmenes pequeños (hasta unos 3 litros) se utilizan 20 minutos a 120° C; si los volúmenes son mayores debe alargarse el tiempo de tratamiento.

# Autoclaves



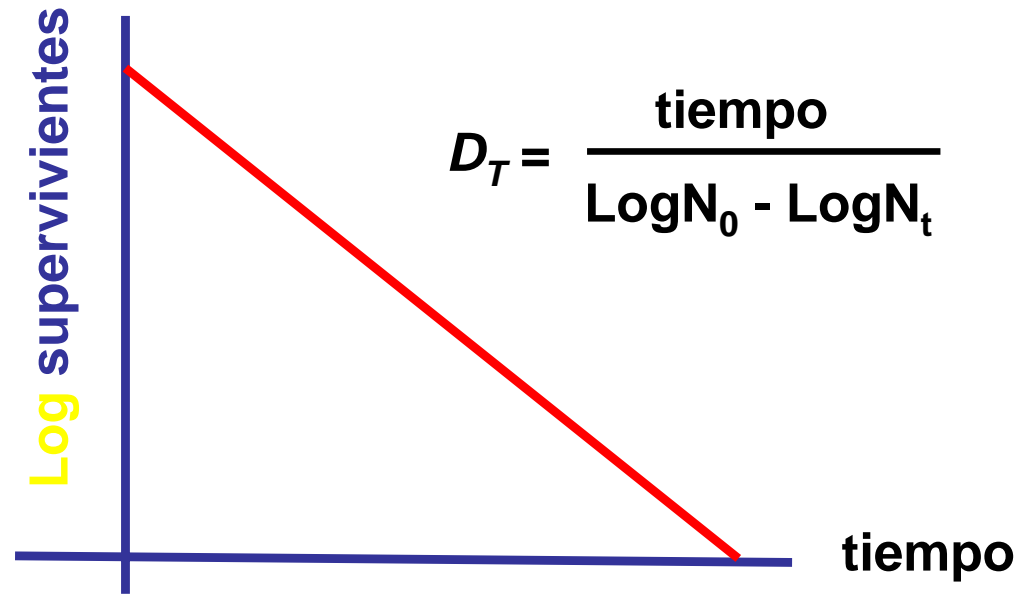
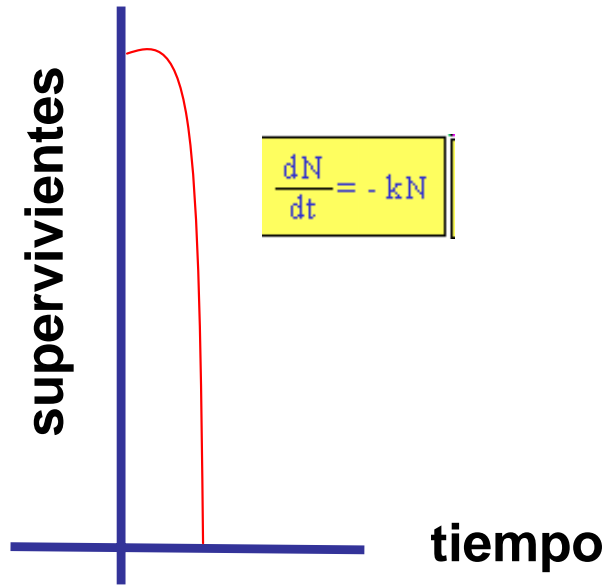
# Autoclaves



**AEROSPACE**  
Composite Products

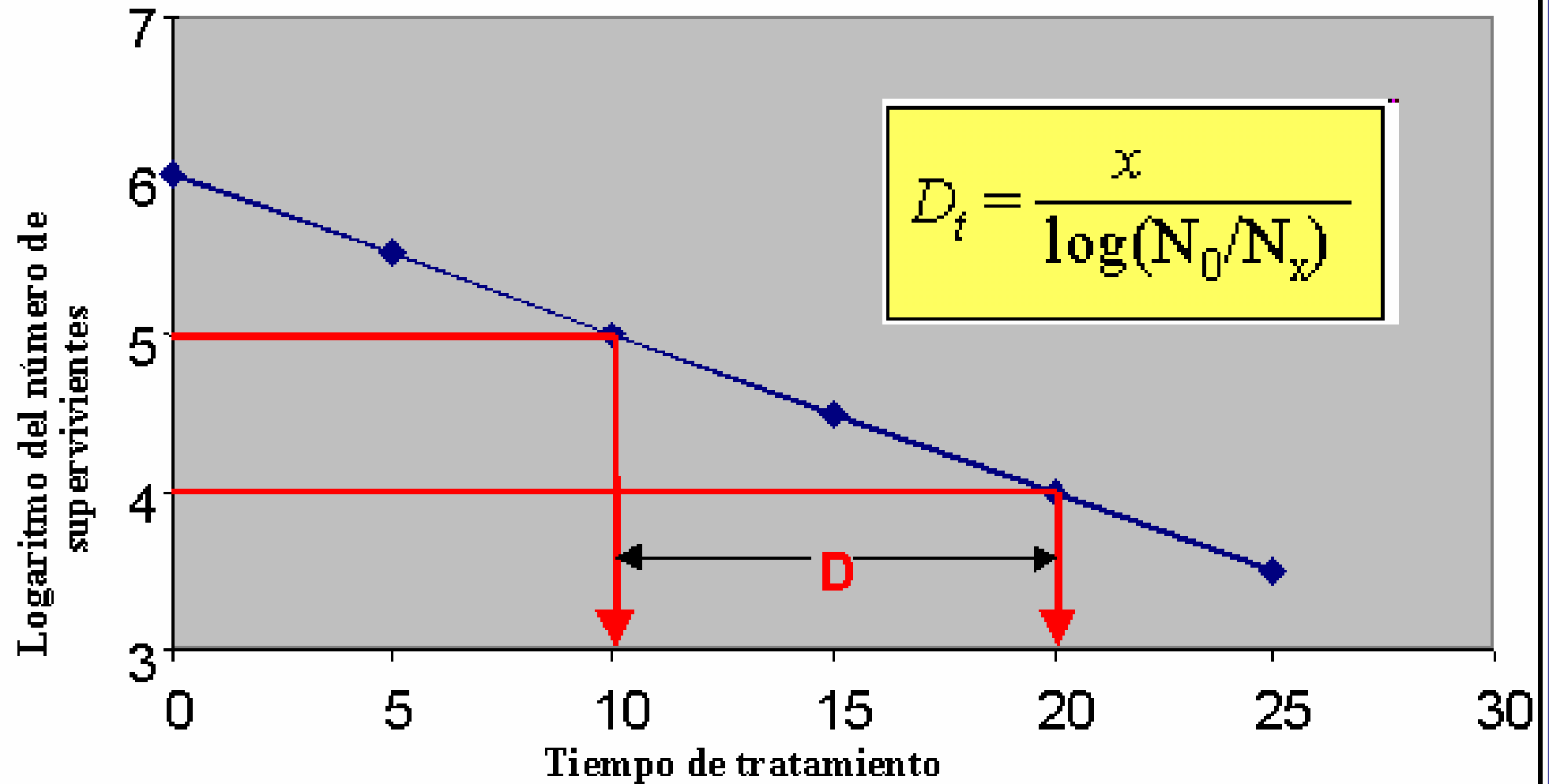


# Altas temperaturas



# Altas temperaturas

Ejemplo de cinética de termodestrucción



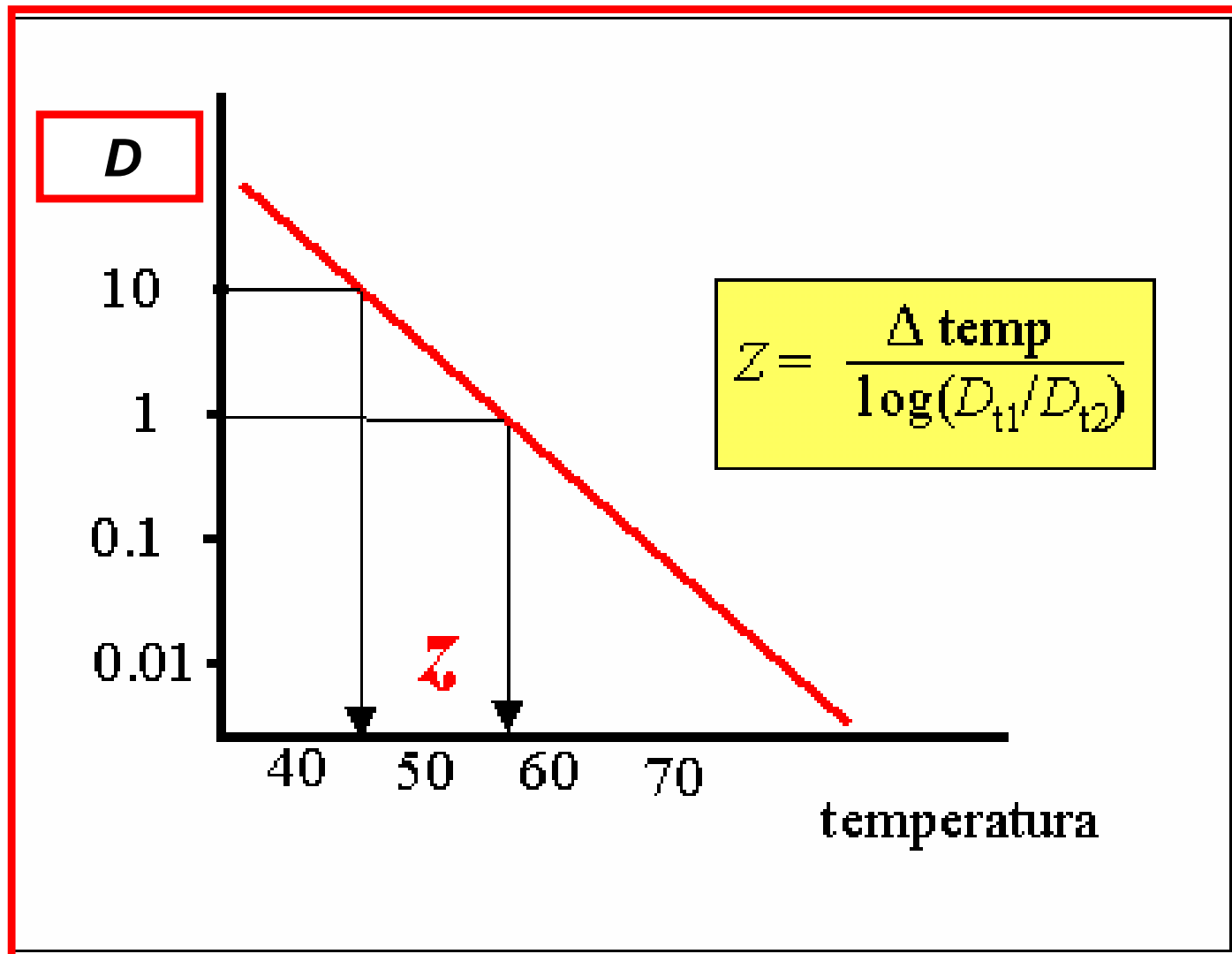
# Altas temperaturas

Se define el valor  $D$  como el tiempo necesario para que el número de supervivientes caiga al 10% del valor inicial (o, lo que es lo mismo, para que el logaritmo del número de supervivientes se reduzca en una unidad)

$$D_t = \frac{x}{\log(N_0/N_x)}$$

Las unidades del  $D$  son minutos. El tiempo de termodestrucción ( $D$ ) varía para cada temperatura (de ahí el subíndice  $t$ ), es diferente para distintos microorganismos, distintos entornos y diferentes condiciones fisiológicas.

# Altas temperaturas



# Altas temperaturas

El valor z indica el incremento en la temperatura (medida en número de grados) necesario para que el valor D se reduzca a la décima parte del inicial.

$$z = \frac{\Delta \text{ temp}}{\log(D_{t1}/D_{t2})}$$

El medio en el que se encuentra un microorganismo influye en su sensibilidad al calor. Por lo general, los microorganismos son más sensibles a las altas temperaturas cuando se encuentran a **pHs ácidos**, mientras que las concentraciones altas de **proteínas** o **azúcares** en el medio disminuyen la efectividad del calor y protegen a las bacterias.

Las altas concentraciones de **sal** tienen efectos variables según el tipo de microorganismo. La esterilización por calor se puede hacer en medio húmedo usando un **autoclave** o en medios secos mediante el **horno Pasteur**.

Valores de  $D$  y  $z$  para diferentes microorganismos <sup>2</sup>

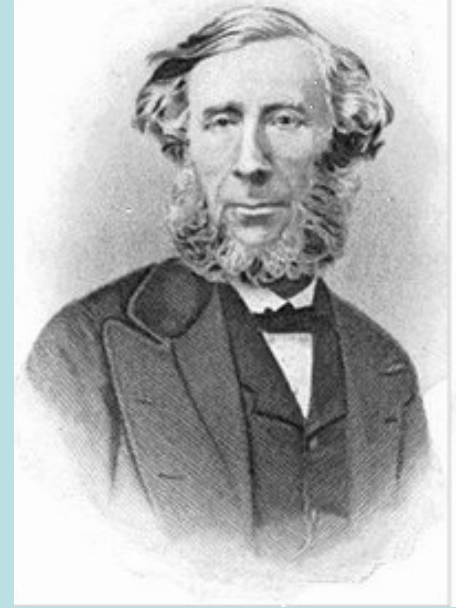
Organismo	Temp. (°C)	$D$ (seg)	$z$ (°C)
➤ <i>Bacillus stercorarius</i>			
TH4 (en agua)	120	1.000	7.3
FS 7954 (en tampón fosfato)	121	6	8.3
NCIB 8919 (en agua)	121	186	7.0
➤ <i>Bacillus subtilis</i>			
5230 (en agua)	121	6.0	8.3
5230 (en tampón fosfato)	121	21.9	8.8
➤ <i>Clostridium botulinum</i>			
Tipo A (en agua)	121	6.0	8.3
A35B (en tampón fosfato)	121	19.2	10.8
213B (en vegetales)	121	6.6	9.8
213B (en tampón fosfato)	110	96	10.3
62A (en puré de guisantes)	121	5.34	8.3
➤ <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>			
S9 (en agua)	132	4.4	6.9
➤ <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>			
ATCC7946	121	1.550	6.7
➤ <i>Escherichia coli</i>			
Agua	55	402	3.6

Los conceptos de valores  $D$  y  $z$  son también aplicables a otros parámetros de calidad de alimentos tales como actividades enzimáticas. Por ejemplo,

- para la actividad de la peroxidasa  $D_{120} = 0.83 \times 10^{-3} \text{ s}$  y  $z = 27.8 \text{ }^\circ\text{C}$
- actividad biológica de vitaminas (vitamina A)  $D_{122} = 2.4 \times 10^{-3} \text{ s}$ ,  $z = 23 \text{ }^\circ\text{C}$ ,
- textura de alimentos (alubias)  $D_{100} = 84.9 \times 10^{-3} \text{ s}$ ,  $z = 21.3 \text{ }^\circ\text{C}$
- color (guisantes)  $D_{121.1} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}$ ,  $z = 39.4 \text{ }^\circ\text{C}$

Desde el punto de vista de la salud alimentaria, se suele requerir un **tratamiento 12D** de los productos susceptibles de ser portadores de gérmenes patógenos (o que puedan dar lugar a intoxicaciones). Este tratamiento reduce en 12 órdenes de magnitud el número de supervivientes o bien, visto de otra forma, reduce en un factor de  $10^{-12}$  la probabilidad de supervivencia de un microorganismo dado. Si consideramos que *un solo microorganismo* contaminaba una unidad (una lata, por ejemplo) del alimento inicial, después de un tratamiento 12D la probabilidad de encontrar una lata contaminada se reduce hasta  $10^{-12}$ .

**Tindalización:** Se utiliza cuando las sustancias químicas no pueden calentarse por encima de  $100^{\circ} C$  sin que resulten dañadas. Consiste en el calentamiento del material de  $80$  a  $100^{\circ} C$  hasta 1 hora durante 3 días con sucesivos períodos de incubación. Las esporas resistentes germinarán durante los períodos de incubación y en la siguiente exposición al calor las células vegetativas son destruidas.



John Tyndall  
(1820 – 1893)

**Pasteurización:** La leche, nata y ciertas bebidas alcohólicas (cerveza y vino) se someten a tratamientos de calor controlado que sólo matan a ciertos tipos de microorganismos pero no a todos.

- La leche pasteurizada no es estéril.
- La temperatura seleccionada para la pasteurización se basa en el tiempo de termodestrucción de microorganismos patógenos (es el tiempo más corto necesario para matar una suspensión de bacterias a una temperatura determinada).

- *Mycobacterium tuberculosis* es de los microorganismos patógenos más resistentes al calor que puede transmitirse por la leche cruda y se destruye en 15 minutos a 60° C. Posteriormente se ha observado que *Coxiella burnetti*, agente causal de la fiebre Q, se encuentra a veces en la leche y es más resistente al calor que *M. tuberculosis* por lo que se utiliza para el diseño de los tratamientos para la leche.
  1. Tratamiento LTLT pasteurización a 62,8 °C durante 30 minutos
  2. Tratamiento HTST pasteurización a 71,7 °C durante 15 segundos.
  3. Tratamiento UHT proceso en flujo en el que el producto alcanza 140-150 °C durante unos pocos segundos y permite una conservación mucho más larga (hasta 8 semanas).

El autoclave esteriliza usando el calor húmido transmitido por vapor de agua sobrecalentado debido al uso de altas presiones. el efecto del vapor de agua es facilitar la transmisión del calor al objeto en esterilización.

El procedimiento usual es usar  $121^{\circ}\text{C}$  para lo que es necesaria una presión de  $1.1 \text{ kg/cm}^2$ . En estas condiciones un tratamiento de 15 min es suficiente para eliminar las esporas de Gram-positivos.

Algunos materiales no se deben esterilizar en el autoclave. Sustancias que no se mezclan con el agua no pueden ser alcanzadas por el vapor sobreviviendo los microorganismos que contengan.

Otras sustancias se alteran o son destruidas por tratamientos prolongados de calor empleándose en estos casos otros métodos de esterilización.

## ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN:

La esterilización por filtración se utiliza para eliminar bacterias de los medios líquidos que sean susceptibles al calor. Por ejemplo, las disoluciones enzimáticas o de vitaminas.

La esterilización se efectúa pasando la muestra líquida a través de un filtro con un tamaño de poro de  $0.42 \mu\text{m}$  (o menor). Las bacterias normales quedan retenidas en el filtro y el líquido se esteriliza.

Hay que tener presente que este sistema no elimina los virus ya que son de menor tamaño que el poro (virus filtrables).

**Filtros de membrana** son discos de ésteres de celulosa con poros tan pequeños que previenen el paso de los microorganismos. Existen distintos tipos de filtro dependiendo del tamaño de poro. Estos filtros son desechables. Además de utilizarse en la esterilización de líquidos se usan en el análisis microbiológico de aguas ya que concentran los microorganismos existentes en grandes volúmenes de agua.

**Filtros HEPA** (High Efficiency Particulate Air) está compuesto por pliegues de acetato de celulosa que retienen las partículas (incluidos los microorganismos) del aire que sale de una campana de flujo laminar.

## AGENTES ESTERILIZANTES QUIMICOS

**Oxido de etileno:** es un líquido que hierve a  $10,7^{\circ} C$ . Se usa en la industria para la esterilización de placas Petri, jeringas y otros **objetos de plástico** que se funden a temperaturas superiores a los  $100^{\circ} C$ . Debido a su alto poder de penetración estos objetos se empaquetan primero y después se esterilizan. El óxido de etileno **actúa inactivando enzimas** y otras proteínas que contienen grupos sulfidrilos (R-SH) mediante una reacción llamada alquilación (R-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-H).

**Glutaraldehido:** Una solución acuosa al 2% presenta una amplia actividad antimicrobiana. Es efectivo frente a virus, células vegetativas y esporas de bacterias y hongos. Se usa en medicina para esterilizar instrumentos urológicos y ópticos.

## RADIACIÓN ULTRAVIOLETA:

La radiación ultravioleta produce una disminución exponencial en el número de células vegetativas o de esporas vivas con el tiempo de irradiación. Por tanto se pueden calcular los valores  $D$  para la irradiación.

Existe una falta de información precisa sobre la susceptibilidad de las diferentes especies microbianas a la radiación U.V.: diferentes cepas pueden tener una resistencia distinta.

El mayor valor del tratamiento con radiaciones U.V. Se encuentra en el saneamiento del aire, aunque también pueden aplicarse para esterilizar superficies de alimentos o para el equipo de los manipuladores de alimentos.

**Luz ultravioleta:** La porción ultravioleta del espectro incluye todas las radiaciones desde 15 a 390 nm.

Las longitudes de onda alrededor de 265 nm son las que tienen mayor eficacia como bactericidas (200 - 295 nm).

Se usan para reducir la población microbiana en quirófanos, cuartos de llenado asépticos en la industria farmacéutica y para tratar superficies contaminadas en la industria de alimentos y leche.

La luz UV tiene poca capacidad para penetrar la materia por lo que sólo los microorganismos que se encuentran en la superficie de los objetos que se exponen directamente a la acción de la luz UV son susceptibles de ser destruídos.

## RADIACIÓN IONIZANTE:

- La radiación ionizante es altamente letal, puede ajustarse su dosis para producir efectos pasteurizantes o esterilizantes y su poder de penetración es uniforme.
- Es letal por destrucción de moléculas vitales de los microorganismos, esto lo consigue sin producción de calor, por lo que los alimentos se conservan frescos. La mayoría de los daños son a nivel ADN.
- La sensibilidad a la radiación de los microorganismos difiere según las especies e incluso según las cepas, aunque las diferencias de resistencia entre cepas de una misma especie son generalmente lo suficientemente pequeñas para no tenerlas en cuenta a efectos prácticos.
- Las bacterias Gram-negativas son generalmente más sensibles a la irradiación que las Gram-positivas y las esporas aún más resistente.
- En general la resistencia a la radiación de los hongos es del mismo orden que la de las formas vegetativas bacterianas.  
Los virus son aún más resistentes que las bacterias a la radiación.

Rayos gamma: Las radiaciones gamma tienen mucha energía y son emitidas por ciertos isótopos radiactivos como es el  $\text{Co}^{60}$  pero son difíciles de controlar ya que este isótopo emite constantemente los rayos gamma en todas direcciones. Estos rayos gamma pueden penetrar los materiales por lo que un producto se puede empaquetar primero y después esterilizar.

Rayos catódicos (Radiación con haz de electrones): Se usan para esterilizar material quirúrgico, medicamentos y otros materiales. Una ventaja es que el material se puede esterilizar después de empaquetado (ya que éstas radiaciones penetran las envolturas) y a la temperatura ambiente.