

## Microbiología General

### Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos

---

*Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos. Conceptos de esterilidad y asepsia. Inhibición del crecimiento: antibióticos y antisépticos. Esterilización por calor. Cinética de muerte: valores D y z. Lesión en los microorganismos. Esterilización por otros tratamientos físicos y químicos. Esterilización por filtración. Métodos de conservación de cultivos.*

Bibliografía recomendada: Cap. 11 de la 8ª edición de *Brock: Biología de los microorganismos*

---

#### **1.- CONCEPTOS DE ESTERILIDAD Y ASEPSIA**

En todos los ambientes abiertos se puede encontrar una gran cantidad de microorganismos (principalmente bacterias y virus). Estos microorganismos, si tienen a su disposición nutrientes y condiciones ambientales adecuadas pueden crecer y multiplicarse como veremos en el próximo capítulo.

En los ambientes naturales hay mezclas complejas de muchos tipos de microorganismos que forman poblaciones que conviven. Con objeto de poder utilizar los microorganismos con fines aplicados y para evitar sus efectos nocivos, es necesario disponer de métodos que permitan eliminarlos de manera que podamos conseguir ambientes limpios sin contaminación microbiana.

Se dice que un ambiente es **estéril** cuando se han eliminado todos los microorganismos del mismo. La esterilidad se puede alcanzar usando procedimientos físicos (calor, radiaciones), químicos o mecánicos (filtración). Sin embargo, los procedimientos de esterilización son costosos y, en ciertas ocasiones, desaconsejables. Por ejemplo, la esterilización completa de ciertos alimentos no es posible sin destruir sus características nutritivas.

Se dice que un ambiente es **aséptico** cuando se han eliminado todos los microorganismos patógenos. Un ambiente aséptico no tiene por qué ser estéril. La asepsia también se puede conseguir por procedimientos físicos y químicos.

#### **2.- INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO: ANTIBIÓTICOS Y ANTISÉPTICOS.**

Es necesario controlar el crecimiento de los microorganismos para poder potenciar sus efectos beneficiosos o productivos y limitar los indeseables, contaminantes o patógenos. Para ello se cuenta con una serie de herramientas químicas y físicas.

Se denominan **antibióticos** aquellas sustancias que interfieren el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos mediante una **interacción específica** con alguno de sus componentes celulares. Debido a esta especificidad, los antibióticos tienen un **espectro de acción** limitado; esto es, en general son activos frente a ciertos microorganismos e inactivos frente a otros, lo que permite usarlos como agentes selectivos.

Se denominan **antisépticos** aquellos compuestos químicos que desarrollan su acción letal inteaccionando de forma **inespecífica** con los componentes celulares de forma que no existe una acción selectiva frente a grupos de microorganismos sino que su acción es más general. Los antisépticos no suelen ser demasiado tóxicos y pueden aplicarse sobre tejidos vivos.

Los diferentes tipos de microorganismos o de sus formas de desarrollo (esporas vs. células vegetativas) tienen diferentes grados de sensibilidad a los tratamientos físicos o químicos. Además, el uso de antibióticos supone una **presión selectiva** sobre las poblaciones bacterianas que puede llevar a la sustitución de las poblaciones del microorganismo sensibles al antibiótico por otras que han desarrollado mecanismos de resistencia frente al mismo.

### ANTIBIÓTICOS

Las sustancias antibióticas pueden clasificarse atendiendo a varios criterios:

- 1) Según su **espectro de acción** (tipo de microorganismos a los que afectan), los antibióticos pueden ser activos frente a
  - a) **Procariontes** en general presentan baja toxicidad frente a los eucariontes (células humanas) aunque hay que considerar que existen en estas ciertos orgánulos celulares de origen procariótico que pueden verse afectados y, por consiguiente, afectada la actividad celular general.
  - b) **Eucariontes** suelen presentar más problemas de toxicidad frente a células humanas ya que estas son eucarióticas.
  - c) **Ambos grupos**. A ellos se aplica también el comentario del grupo anterior.
  - d) **Antivirales** son compuestos que boquean el proceso de replicación y multiplicación vírica. Puesto que los virus son parásitos intracelulares que utilizan los componentes celulares del huésped para su multiplicación, los antivirales son en general tóxicos para las células eucarióticas (o procarióticas).

Los antibióticos pueden usarse de forma preventiva para evitar que en un determinado ambiente puedan desarrollarse bacterias o microorganismos eucarióticos (hongos). Sin embargo, el **uso preventivo** de antivirales no tiene sentido puesto que los virus sólo pueden desarrollarse en el interior de una célula viva y en un ambiente sin células sólo pueden permanecer inactivos.

- 2) Según su **modo de acción** los antibióticos pueden ser
  - a) **Bacteriostáticos** cuando causan una parada del crecimiento microbiano. Los microorganismos no crecen en presencia del antibiótico; pero tampoco mueren de forma inmediata. Si se elimina el antibiótico, los microorganismos pueden recuperarse y volver a crecer. Los microorganismos cuyo crecimiento está detenido por acción de un antibiótico bacteriostático van muriendo con el paso del tiempo en presencia del antibiótico; sin embargo, este proceso de muerte es lento.
  - b) **Bactericidas** cuando la presencia del antibiótico produce la muerte del microorganismo afectado rápidamente. Esta muerte puede ir acompañada de la lisis de las células (y se habla entonces de antibiótico **bacteriolítico**) o no.
- 3) Según su sitio de acción a nivel celular, los antibióticos pueden ser

- a) Antibióticos que actúan sobre la **pared celular**. En general bloquean la síntesis del peptidoglicano de manera que las bacterias pierden su protección osmótica y lisan. Por consiguiente, son antibióticos, en general, bacteriolíticos.
  - i) El mecanismo de acción más común es el de impedir la incorporación de nuevos componentes en el peptidoglicano mediante la inhibición de las enzimas de transporte de los componentes o de síntesis de la pared celular.
  - ii) Estos antibióticos son activos únicamente frente a bacterias en crecimiento e inactivos frente a esporas y a eucariontes.
  - iii) A este grupo pertenecen los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), la vancomicina, etc.
- b) Antibióticos que actúan sobre la **membrana celular**. En general su actividad se debe a que forman poros en la membrana plasmática de forma que se rompe su integridad, se destruyen los gradientes de iones que son necesarios para la obtención de energía y se produce la pérdida de solutos celulares.
  - i) A este grupo pertenece la **Nisina**, antibiótico cuyo uso como aditivo alimentario está autorizado.
  - ii) Hay antibióticos de este grupo que actúan sobre procariontes y otros que lo hacen sobre eucariontes. Debido a que las membranas de los dos tipos de células son ligeramente diferentes, los antibióticos de este grupo no suelen ser activos simultáneamente sobre los dos tipos de células.
- c) Antibióticos que actúan bloqueando la síntesis de proteínas. Son conocidos como **antibióticos ribosomales** ya que actúan sobre estos orgánulos.
  - i) Puesto que los ribosomas procarióticos y eucarióticos son diferentes en ciertos aspectos, existen antibióticos antibacterianos (tipo I), anti-eucarióticos (tipo II) y antibióticos que actúan sobre los elementos comunes a ambos tipos de ribosoma y, por tanto, son activos frente a procariontes y a eucariontes (tipo III).
  - ii) Muchos de estos antibióticos son bacteriostáticos y su efecto es reversible si se eliminan del medio. Otros, sin embargo, son bactericidas porque inducen la formación de proteínas incorrectas o porque inactivan irreversiblemente los ribosomas.
  - iii) A este grupo pertenecen antibióticos tales como el cloranfenicol, los aminoglicósidos, los macrólidos

## DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS

Los **desinfectantes** son productos químicos que matan los microorganismos y se aplican sobre objetos inanimados, mientras que los **antisépticos**, por su menor toxicidad, se emplean sobre tejidos vivos. Puesto que dependiendo de la forma como se realice el tratamiento un mismo agente puede utilizarse como antiséptico o como desinfectante, se suele usar el término **germicida** para englobar ambos conceptos.

Los desinfectantes tienen aplicación en aquellos casos en los que no se puede usar la esterilización por calor (por ejemplo en hospitales con materiales sensibles al calor, en instalaciones en la industria agroalimentaria, en el tratamiento de agua, etc).

En muchos casos, el tratamiento con agentes desinfectantes no elimina completamente los microorganismos presentes, sino que simplemente se reduce mucho su número de forma que la acción indeseable de los microorganismos se retrasa.

Las **esporas bacterianas** son las formas más resistentes a los antisépticos y desinfectantes y sólo mueren al ser tratadas con agentes con alta actividad germicida. En general las **formas vegetativas** de las bacterias son sensibles a todos los agentes desinfectantes, aunque algunos grupos de microorganismos tales como las **micobacterias** pueden presentar especial resistencia a los de baja actividad. Los **hongos** presentan, en general, mayor resistencia que las bacterias y resisten los desinfectantes de baja actividad. Por último, los **virus** presentan una sensibilidad similar a la de las bacterias, aunque es un poco más elevada en el caso de los virus desnudos que no presentan envueltas lipídicas.

La determinación del efecto antiséptico o desinfectante de los diferentes productos es complicada porque este efecto depende de gran número de factores externos (temperatura, humedad, pH, etc.) así como de los diferentes tipos de microorganismos que se desea eliminar o controlar. Existen protocolos que regulan cómo se debe evaluar la eficacia de un compuesto germicida y entre ellas destaca la **prueba del coeficiente del fenol (CF)** en la que se toma como referencia de desinfectante el fenol y como referencia de microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*.

$$CF = \text{dil fenol} / \text{dil desinf} \quad (\text{Ecuación 17})$$

donde **dil fenol** es el inverso de la mayor dilución del fenol que elimina completamente la bacteria de referencia en 10 min de tratamiento, y **dil desinf** es la mayor dilución del desinfectante que elimina el microorganismo de referencia en 10 min de tratamiento realizado el estudio de los supervivientes tras un cultivo de 48h<sup>1</sup>. el valor de CF es simplemente indicativo ya que se trata de una medida realizada sobre cultivos puros y en la realidad, los germicidas se usan sobre poblaciones mixtas.

Para evaluar la acción de un germicida frente a un microorganismo en particular se realizan **test de dilución** similares a los realizados para los antibiogramas cualitativos o cuantitativos.

En función de su CF, los germicidas se clasifican en de **actividad alta, media o baja**. Si se desea realizar una esterilización se deberán escoger germicidas de actividad más alta o a mayores concentraciones. Igual ocurre si en la muestra existen sustancias que protegen a los microorganismos de la acción de los germicidas (como ocurre en el caso de la sangre o en las heces).

#### Principales agentes antisépticos

- **Detergentes catiónicos**, interaccionan con las membranas y se usan como alguicidas en piscinas.
- **Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada)** en disolución del 6 al 30% para esterilización en este caso), es una agente oxidante que se usa sobre la piel.

---

<sup>1</sup> Por ejemplo, si dil fenol es 1/90 y dil desinf es 1/450, el cf será de 5; esto es, el desinfectante es 5 veces más activo que el fenol.

## Microbiología General

### Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos

---

#### *Principales agentes desinfectantes*

- **Sulfato de cobre**, precipita las proteínas y se usa como alguicida y como antifúngico.
- **Gas cloro**, agente oxidante que se usa para desinfectar el agua.
- **Compuestos de cloro** (500-5000 mg/l), agentes oxidantes que se usan en la industria lechera, en equipos de la industria agroalimentaria y en el tratamiento de aguas.
- **Compuestos fenólicos** (0.5-3%), agentes oxidantes que se usan para desinfectar superficies.
- **Detergentes catiónicos**, agentes que alteran las membranas y se usan en la limpieza del material médico y de la industria agroalimentaria
- **Óxido de etileno (OE)**, agente alquilante que se usa en la esterilización del material de laboratorio, material de plástico y para la desinfección de frutas.
  - La esterilización se lleva a cabo en un esterilizador similar a un autoclave que controla la concentración de óxido de etileno, la temperatura y la humedad. Se usa una mezcla de OE al 10 - 20% con CO<sub>2</sub> u otro gas reductor porque el OE es explosivo. El tratamiento dura varias horas.
  - Se usa también en disoluciones de 450-500 mg/l.
  - El OE es muy tóxico; pero se diluye rápidamente en el aire, lo que permite su eliminación fácil después del tratamiento.
- **Ozono**, agente oxidante que se usa en el tratamiento del agua de bebida.

## Microbiología General

### Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos

#### Antisépticos y Desinfectantes usados en aplicaciones relacionadas con la salud

Agente	Uso en campos relacionados con la salud	Modo de acción
<b>Antisépticos</b>		
Mercuriales orgánicos	Piel	Se combina con grupos –SH de las proteínas
Nitrato de plata	Ojos de los recién nacidos para evitar la ceguera	Precipita proteínas
Solución de yodo	Piel	Ioda los residuos de tirosina de las proteínas
	Jabones, desodorantes y lociones corporales	Agente oxidante
Alcohol (etanol al 70% en agua)	Piel	Disolvente de lípidos y desnaturizante de proteínas
Bifenoles (Hexaclorofeno)	Jabones, lociones	Rompe la membrana celular
Peróxido de hidrógeno (solución al 3%)	Piel	Agente oxidante
<b>Desinfectantes</b>		
Dicloruro mercúrico	Mesas, superficie de los bancos, suelo	Se combina con grupos –SH
Solución de Yodo	Instrumental metálico	Ioda los residuos de tirosina
Gas cloro	Depuración de los suministros de agua	Agente oxidante
Compuestos de cloro	Suministros de agua	Agente oxidante
Compuestos fenólicos	Superficies	Desnaturaliza proteínas
Detergentes catiónicos (compuestos de amonio cuaternario)	Instrumental médico	Interacciona con los fosfolípidos de la membrana
Óxido de etileno	Material de laboratorio sensible a la temperatura como los plásticos	Agente alquilante
Ozono	Agua de bebida	Fuerte agente oxidante

#### **3.- ESTERILIZACIÓN POR CALOR.**

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. Por otro lado, 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.

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**.

El autoclave esteriliza usando el calor húmedo 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°C para lo que es necesaria una presión de 1.1 kg/cm<sup>2</sup>. En estas condiciones un tratamiento de 15 min es suficiente para eliminar las esporas de Gram-positivos.

En un horno Pasteur se usa calor seco transmitido por el aire al objeto en esterilización. En este caso, la temperatura más usual suele ser de 180-250°C y el tiempo de esterilización entre 30 min y varias horas. El uso del horno Pasteur está limitado por las características del material a esterilizar.

Puesto que el tratamiento térmico puede alterar las características del producto tratado, en el caso de alimentos o de productos termosensibles, se han desarrollado diferentes tipos de tratamiento industriales entre los que destacan:

1. La **Pasteurización** destinada a reducir las poblaciones bacterianas. Se emplea principalmente en el tratamiento de la leche que se hace pasar por un tubo en contacto con la fuente de calor de forma que se incrementa la temperatura hasta **71°C durante 15 s** (tratamiento HTST) y a continuación se enfría rápidamente.
  - Un procedimiento alternativo consiste en calentar a **63-66°C durante 30 min** (tratamiento LTLT) sin embargo, este tratamiento produce mayores alteraciones organolépticas en el producto.
2. Por último, el **tratamiento UHT** consiste en un proceso en flujo en el que el producto alcanza 140-150°C durante unos pocos segundos. Este tratamiento permite un tiempo de conservación del producto mucho más largo (hasta 8 semanas).



## Microbiología General

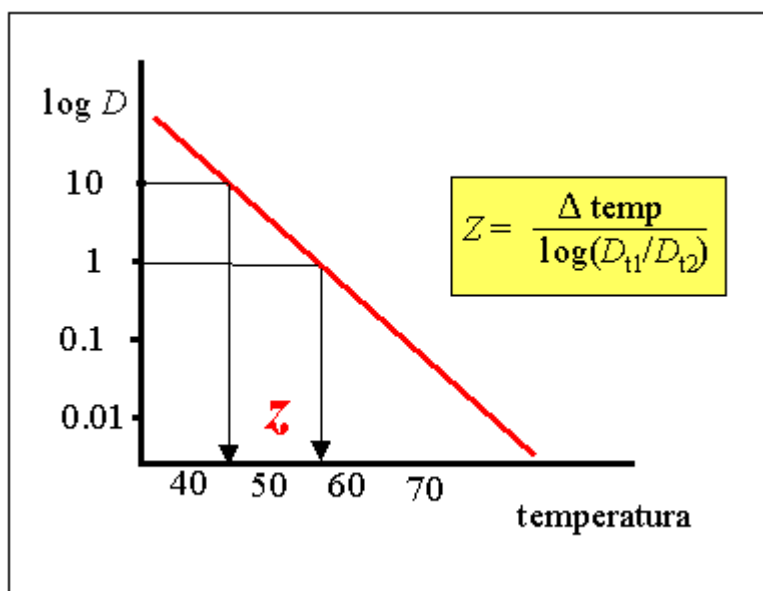
### Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos

El tiempo de termodestrucción ( $D$ ) varía para cada temperatura (de ahí el subíndice  $t$ ) de forma que a mayores temperaturas el valor de  $D$  es menor, es diferente para distintos microorganismos, distintos entornos y diferentes condiciones fisiológicas.

Si aumentamos la temperatura de tratamiento, el valor de  $D$  disminuye de forma logarítmica. De manera análoga a como el valor  $D$  indicaba el tiempo necesario para lograr que el número de supervivientes se redujera al 10% de la población inicial, 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.

$$z = \Delta T / [\log (D_{t1} / D_{t2})] \quad (\text{Ecuación 19})$$

donde  $\Delta T$  es el incremento de temperatura, y  $D_{T1}$  y  $D_{T2}$  los valores de  $D$  a las dos temperaturas estudiadas.-



Los valores  $D$  y  $z$  varían para cada microorganismo y para cada condición. Las esporas, por ejemplo, tienen valores  $D$  mucho más altos que las células vegetativas de los mismos microorganismos. Los microorganismos presentes en los alimentos, por otra parte, suelen tener valores  $D$  más altos que cuando se cultivan en condiciones de laboratorio. Para poder determinar las condiciones en las que hacer un tratamiento térmico para destruir microorganismos es necesario dominar los conceptos de los valores  $D$  y  $z$ .

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>			

<sup>2</sup> Datos tomados de A. Casp y J. Abril (1998) *Procesos de conservación de alimentos*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

## Microbiología General

### Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos

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 peroxidasa  $D_{120} = 0.83 \times 10^{-3}$  seg y  $z = 27.8$  °C), actividad biológica de vitaminas (para vitamina A  $D_{122} = 2.4 \times 10^{-3}$  seg,  $z = 23$  °C), textura de alimentos (alubias  $D_{100} = 84.9 \times 10^{-3}$  seg,  $z = 21.3$  °C) o color (guisantes  $D_{121.1} = 1.5 \times 10^{-3}$  seg,  $z = 39.4$  °C).<sup>3</sup>

Cuando el valor tratamiento se realiza a 121.1°C (250°F) al valor  $D$  se le denomina  $D_r$  y, por tanto, representa el tiempo necesario para lograr la destrucción del 90% de las células del microorganismo tratado a esa temperatura. Para conseguir un nivel de reducción de la viabilidad determinado, es necesario realizar un tratamiento térmico cuya duración depende del valor  $D$  según la siguiente ecuación

$$F = D \times (\log N_i - \log N_f) \quad (\text{ecuación 20})$$

donde  $N_i$  y  $N_f$  representan los números de viables al inicio y al final del tratamiento, respectivamente.

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  $10^{-12}$ .

El **parámetro  $F$**  permite comparar el tratamiento realizado a una temperatura y durante un tiempo determinado con un tratamiento de referencia que usemos para poder efectuar comparaciones. Para poder **comparar la eficiencia** de diferentes tipos de tratamiento térmico, se elige un sistema de referencia de eficiencia conocida. En el caso de microbiología de alimentos, el sistema de referencia suele ser *Clostridium botulinum* por ser este un microorganismo productor de intoxicaciones alimentarias graves y de gran termorresistencia por su capacidad para formar esporas. En este caso la temperatu

<sup>3</sup> Ver nota 1

ra de tratamiento es 121.1 °C (correspondiente a 250 °F) y el valor  $z$  para *C. botulinum* es 10.

Cuando el tratamiento de referencia es el indicado, el parámetro  $F$  se denomina  $F_0$  ( $= F_{121.1}^{10}$ ).

$$F_0 = D_{121.1} (\log N_0 - \log N_f)$$

Otros tratamientos tecnológicos para destruir microorganismos (radiación, por ejemplo) son susceptibles de tratamientos matemáticos similares a los descritos en esta sección.

#### **5.- LESIÓN EN LOS MICROORGANISMOS**

En cualquier tratamiento antimicrobiano puede ocurrir que algunas células sean dañadas pero no mueran. La presencia de microorganismos dañados (**lesionados**) plantea un problema debido a que los métodos de detección se basan en cultivos selectivos que en muchas ocasiones son letales para dichos microorganismos lesionados. En consecuencia, los microorganismos dañados no son detectados y la muestra se da por no contaminada; sin embargo, una vez que los microorganismos lesionados han reparado sus heridas pueden volver a crecer y a producir las toxinas o causar el deterioro indeseable en los alimentos.

Cuando puedan producirse daños en los microorganismos como consecuencia de tratamientos es necesario considerar esta posibilidad a la hora de hacer el control de calidad del producto haciendo un cultivo inicial en condiciones suaves en un medio no selectivo (agua de peptona u otro medio de cultivo rico) que permita la recuperación de las células dañadas y su posterior detección con medios selectivos.

#### **6.- ESTERILIZACIÓN POR OTROS TRATAMIENTOS FÍSICOS**

##### **RADIACION 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 de una misma especie 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.

#### **RADIACION 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 los 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 resistentes.

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 resistente que las bacterias a la radiación.

#### **7.- 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 estos son de menor tamaño que el poro (virus filtrables).

#### **8.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE CULTIVOS.**

Existen varios métodos para la conservación de cepas interesantes de microorganismos. Entre los más frecuentes figuran la **congelación** de muestras de cultivos creciendo exponencialmente a los que se ha añadido un agente estabilizante (glicerol al 30%) y se mantienen a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; la **liofilización** y la conservación en medios **sólidos herméticos**.

La liofilización y la congelación son los métodos de conservación más efectivos a largo plazo; pero ambos causan una gran mortandad entre las bacterias (es decir, probablemente en torno al 80-90% de las cfu que se congelan o liofilizan mueren en el proceso). Estos métodos son muy aplicados para conservar bacterias; sin embargo, presentan

## **Microbiología General**

### **Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos**

---

más problemas en el caso de eucariontes ya que muchos de ellos no se recuperan después del tratamiento.

Los cultivos herméticos se realizan en tubos conteniendo medio sólido que se siembran por picadura y se cierran de forma hermética para evitar su desecación. Los cultivos se mantienen a temperatura ambiente o en refrigeración (4°C) y en esas condiciones las muestras pueden sobrevivir más de un año sin que sea necesario repicar el cultivo. Este sistema de almacenamiento sirve tanto para procariontes como para eucariontes.

Por último, el método más usado a corto plazo es el mantenimiento de cultivos sólidos realizados en medios generales que se conservan sellados en condiciones de refrigeración (4°C). En este caso, suele ser necesario realizar un repicado del material cada cierto tiempo (entre 2 y 6 meses dependiendo del tipo de material).

Microbiología General

Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos

Organismo	Temp. (°C)	D (seg)	z (°C)
➤ <i>Bacillus stercatorum</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

## Efecto de la Temperatura sobre características de los alimentos

<b>Característica</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b><i>D</i> (mseg )</b>	<b><i>z</i> (°C)</b>
Actividad peroxidasa	120	0.83	27.8
Vitamina A	122	2.4	23
Textura alubias	100	84.9	21.3
Color de guisantes	121.1	1.5	39.4