

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Ciencias Químicas

CONTROL DE PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS EN BEBIDAS PRODUCIDAS POR EMBOL



Gloria Marisabel Mamani Patty

Asesora: Dra. María Eugenia García

La Paz-Bolivia

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a la prestigiosa Planta de EMBOL (Embotelladoras Bolivianas) por abrirme las puertas de su Institución en la realización de las prácticas Industriales.

Al departamento de Aseguramiento de Calidad, al Licenciado Rubén Vargas, las licenciadas Flores y Maldonado, por su colaboración, paciencia al transmitir su conocimiento y experiencia.

DEDICATORIA

A mis padres por todo su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, a mis hermanos por su aliento en cada tropiezo.

INDICE

Resumen

1. Introducción.....	(8)
1.1 Área de trabajo.....	(8)
1.2 Normas de calidad.....	(8)
1.3 Proceso productivo.....	(11)
2. Antecedentes.....	(13)
2.1. Calidad.....	(13)
2.2. Embotellado y enviado de bebidas.....	(13)
2.3. Toma de muestras.....	(15)
2.4 Comportamiento bacteriológico.....	(16)
2.4.1. Las eucariotas.....	(16)
2.4.2. Las Procariotas.....	(16)
2.4.3. Morfología Bacteriana.....	(17)
2.4.4. Crecimiento Microbiano.....	(19)
2.4.5. Medios de cultivo.....	(21)
2.4.5.1. Sintéticos o definidos.....	(21)
2.4.5.2. Complejos o Indefinidos.....	(21)
2.4.5.3. Enriquecidos.....	(22)
2.4.5.4. Selectivos.....	(22)
2.4.5.5.	(22)
2.4.5.6. Selectivos diferenciales.....	(22)
2.4.5.7. Electivos.....	(22).
2.4.6. Recuento de colonias.	(28)
2.4.6.1 Recuento en Medio Sólido.....	(28)
2.4.6.2. Turbimetría.....	(28)
2.4.7 Microorganismos presentes en aguas.....	(28)
2.4.7.1. Algas.....	(33)
2.4.7.2. Protozoarios.....	(33)
2.4.7.3 Virus.....	(34)

2.4.7.4. Bacterias.....	(34)
2.4.8. Bacterias Indicadoras de contaminación.....	(37)
2.5. Calidad Microbiológica de bebidas.....	(40)
2.5.1 Agua embotellada y su calidad bacteriológica.....	(40)
2.5.2. Determinación de coliformes totales.....	(41)
3. Justificación.....	(42)
3.1. Saneamiento de Equipos.....	(42)
3.2. Contaminación de envases.....	(43)
3.3. Contaminación en manos de los operadores.....	(44)
3.4. Tratamiento de aguas.....	(44)
3.4.1. Dureza.....	(45)
3.4.2. Alcalinidad.....	(45)
3.4.3. Turbidez.....	(45)
3.4.4. pH.....	(45)
3.4.5. Cloro.....	(46)
3.4.6. Cloruros.....	(46)
3.4.7. Hierro.....	(47)
3.4.8. Sólidos Totales disueltos.....	(47)
3.4.9. Apariencia, color y sabor.....	(47)
4. Metodología.....	(47)
4.1. Análisis en tratamiento de aguas.....	(47)
4.2. Análisis Microbiológico.....	(49)
4.2.1. Pruebas de detección de ATP.....	(50)
4.2.2 Detección de bacterias precursoras de biofilm.....	(52)
4.2.3 Análisis bacteriológico de coliformes en agua.....	(55)
4.2.3.1. Método filtro de Membrana.....	(55)
4.2.3.2. Método de presencia/ausencia.....	(57)
4.2.3.3 Recuento total en Placa.....	(59)
4.3. Determinación de enterobacterias.....	(60)
4.4. Determinación de Mohos Levaduras.....	(61)
4.5 Limpieza y desinfección.....	(63)

5. Resultados y discusiones.....(65)
6. Conclusiones.....(66)
7. Referencias.....(67)

ANEXOS

CONTROL DE PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS EN BEBIDAS PRODUCIDAS POR EMBOL

RESUMEN

El presente trabajo refleja parcialmente la organización estructural de una planta de embotellado de bebidas (Embotelladoras Bolivianas Unidas S.A.), donde el área específica de estudio es el Laboratorio de Microbiología que forma parte del sistema de Aseguramiento de la calidad de planta. Se pudo ver que parámetros microbiológicos se toman en cuenta para el aseguramiento de calidad de las bebidas, tanto de las aguas tratadas como el jarabe concentrado sin dejar de lado la verificación de limpieza de los equipos y el personal con posibles contaminantes microbianos.

Se tiene como indicador de contaminación reciente de aguas y en superficies en contacto con productos a los Coliformes Totales y Fecales.

Indicadores de efectividad de procesos de esterilización, pasteurización y sanitización a *Pseudomonas sp.*, Enterococos, Bacterias Lácticas.

También se realiza el recuento total en placa. Mohos y levaduras especialmente en bebidas carbonatadas, bacterias lácticas y otros. Para cada una de las verificaciones se utilizan distintos métodos entre ellos Pour Plate, el método de filtración en membrana, estriado, Identificación por microscopio en el caso de bacterias Gram positivas (+) y negativas (-), Método de presencia/ausencia y otros.

Es importante hacer notar que el método de toma de muestras es sumamente importante ya que los errores que pudieran cometerse podrían llevarnos a un resultado erróneo, y en este caso la toma de muestras se realiza siempre en envases estériles, con un tiempo adecuado en el purgado de las válvulas. ,

CONTROL DE PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS EN BEBIDAS PRODUCIDAS POR EMBOL

1. INTRODUCCION:

En su mayoría los procesos realizados por las diferentes organizaciones mantienen dichos procesos bajo sistemas de alto control, para evitar los problemas en la producción o mal servicio al cliente, dependiendo del objetivo de la organización. Un proceso se define como la manera en que se hacen una serie de actividades para realizar una tarea. Estos procesos deben contar con políticas y procedimientos con las que se consigue la calidad total en las organizaciones.

1.1. AREA DE TRABAJO

El área de trabajo es EMBOL (Embotelladoras Bolivianas Unidas S.A.) una empresa dedicada a la elaboración y comercialización de bebidas refrescantes con y sin gas de franquicia de **The Coca-Cola Company**, cada uno de los componentes de la planta trabajan dedicados a agregar valor a la empresa entregando productos y servicios de alta calidad satisfaciendo requerimientos de los clientes y consumidores tratando de mejorar continuamente cada uno de los procesos, buscando prevenir y minimizar tanto los impactos ambientales causados por la mala administración de desechos orgánicos e inorgánicos de poder nocivo e la naturaleza, como los riesgos ocupacionales dentro la organización, basándose en su política Integrada:

- ✓ Calidad
- ✓ Seguridad alimentaria
- ✓ Medio Ambiente
- ✓ Seguridad y Salud Ocupacional

1.2. NORMAS DE CALIDAD

ISO 9001 (Sistema de Gestión de Calidad):

Es la estructura necesaria para lograr que la totalidad de las características de una entidad le confieran la aptitud para satisfacer las necesidades establecidas e implícitas y entre sus requisitos se puede mencionar: identificación secuencia e interacción de los procesos, definir métodos de control, seguimiento y medición de los procesos, fijar acciones para alcanzar los objetivos planificados.

ISO 14000 (Sistema de Gestión Ambiental):

Son las actividades encaminadas a proteger y controlar el medio ambiente, a establecer un modelo de desarrollo sustentable mediante el principio de reciclaje de desechos basado en la selección, el ahorro de energía, agua, emanación de todo tipo de gases y el control de los efluentes, estableciendo herramientas y sistemas enfocados a los procesos de producción al interior de una empresa u organización.

OHSA 1800 (Sistema de Gestión de Seguridad y salud Ocupacional)

Tiene como fin proteger la seguridad y salud de los trabajadores además de la integridad de las instalaciones en las cuales los trabajadores desarrollan sus actividades. La Norma OHSAD 18000 (Occupational Health and Safety Assessment Series) establece un modelo para la gestión de la prevención de los riesgos laborales.

El fin de esta norma consiste en proporcionar a las organizaciones un sistema de Gestión de la Seguridad y la Salud Ocupacional, que permita identificar y evaluar riesgos laborales desde el punto de vista de requisitos legales y definir la estructura organizativa, las responsabilidades, las funciones, la planificación de las actividades, los procesos, recursos necesarios, registros, etc. Que permitan desarrollar una Política de Seguridad y salud ocupacional.

ISO 22000 (Sistema de Gestión de Seguridad alimentaria):

Tiene como objetivo asegurar la calidad de los alimentos asegurando que pueda ser consumido sin ningún tipo de riesgo a la salud.

Esta norma sirve también para desarrollar e implantar Sistemas de Gestión de Seguridad Alimentaria, cuya intención final es conseguir una armonización internacional en las muchas normas existentes y ser una herramienta para lograr mejora continua de la seguridad alimentaria a lo largo de la cadena del suministro de los productos alimenticios. Entre los objetivos que persigue esta norma podemos destacar:

- ✓ Reforzar la seguridad alimentaria.
- ✓ Fomentar la cooperación entre industrias.
- ✓ Asegurar la protección del consumidor y fortalecer su confianza.
- ✓ Establecer requisitos de referencia para los sistemas de seguridad alimentaria.
- ✓ Mejorar el rendimiento de los costos a lo largo de la cadena de suministro.

Además se tiene en alta consideración el sistema de análisis de peligros y puntos Críticos de Control (HACCP) haciendo un seguimiento continuo para así de ese modo poder prevenir el riesgo en la seguridad e inocuidad alimentaria.

El sistema HACCP, permite identificar peligros específicos y medidas para su control con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos. Es un instrumento para evaluar los peligros y establecer sistemas de control que se centran en la prevención en lugar de basarse principalmente en el ensayo del producto final. Todo sistema de HACCP es susceptible de cambios que pueden derivar de los avances en el diseño del equipo, los procedimientos de elaboración o el sector tecnológico.

El sistema de HACCP puede aplicarse a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor final, y su aplicación deberá basarse en pruebas científicas para la salud humana además de mejorar la inocuidad de los alimentos.

ISO 17025 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración)

ISO 17025 se desarrolló para guiar a los laboratorios en la administración de calidad y requerimientos técnicos para un adecuado funcionamiento. La norma cumple con los requerimientos técnicos de la ISO 9000. Por lo tanto, toda organización que cumple con los requerimientos de ISO 17025 también cumple con los requerimientos de ISO 9000, pero no del modo inverso.

La norma trata temas tales como: la competencia técnica del personal, la conducta ética del personal, la utilización de ensayos bien definidos y procedimientos de calibración, participación en ensayos de pericia y contenidos de informes de ensayos y certificados.

1.3. Proceso productivo

A manera de ilustración, a continuación presentamos una breve descripción del proceso productivo de las bebidas.

- ✓ **Tratamiento del agua:** El agua, principal componente en la elaboración de las bebidas, se obtiene principalmente de pozos subterráneos (Zona Brasil). Esta se somete a procesos de purificación y esterilización mediante un tratamiento químico y diversas etapas de filtraciones.

- ✓ **Elaboración de jarabes:** En esta etapa se mezcla el azúcar y el agua, obteniendo el “jarabe simple”. Luego, este es filtrado a baja presión para eliminar impurezas (Carbón activado).

- ✓ **Mezcla, carbonatación y llenado:** Al jarabe terminado se le agrega más agua y se le deriva hacia tanques herméticos en donde se enfría y satura con gas carbónico. De esta forma la mezcla queda lista para su transporte hacia la máquina llenadora, en donde se procede al embotellado. El producto que llega a la llenadora es bombeado hacia las botellas, las cuales son selladas con tapas herméticas.
- ✓ **Elaboración de botellas:** La planta de EMBOL al igual que otras industrias de gaseosas utiliza dos tipos de envases, retornables y no retornables. La inversión en maquinaria es más elevada en el caso del embotellado en envases retornables, ya que se necesitan líneas de producción adicionales para controlar la calidad de los mismos. Se estima que el costo de instalación de una línea de producción de envases retornables es entre 4 y 5 veces mayor que el correspondiente a una línea de envases no retornables. Sin embargo, a pesar de que la inversión inicial es mayor, estos envases son más rentables en el mediano plazo, dependiendo de la rotación que se le termine dando a los mismos de envases retornables.
- ✓ **Soplado de Botella:** como ya se mencionó las industrias gaseosas utilizan dos tipos de envases, y en este caso no es la excepción, la planta de Embol Dentro de su estructura cuenta con una planta de soplado que es quien se encarga de proporcionar a la empresa los diferentes formatos de envases. Es importante indicar, además, que en esta etapa productiva existen elevados controles de calidad en el cumplimiento de cada una de las especificaciones que exige cada formato de botella.
- ✓ **Inspección, encajonado y paletizado:** Las botellas llenas y tapadas son inspeccionadas de dos formas: i) con inspectores electrónicos que separan las botellas defectuosas automáticamente con pantallas iluminadas que

permiten la inspección visual y separación manual de las botellas defectuosas. Las botellas unidades que aprueban la inspección ingresan a una máquina que las coloca en sus respectivas cajas para finalmente volverlas a ordenar sobre las plataformas.

- ✓ **Almacenaje y transporte:** Las mencionadas plataformas son apiladas ordenadamente para luego ser cargadas por los camiones. Finalmente, los camiones distribuyen las plataformas con las bebidas gaseosas a los distintos puntos de comercialización.

El agua como principal componente en la elaboración de bebidas, no debe presentar ningún tipo de riesgo personal que pueda causar irritación química, intoxicación o infección microbiológica que sea perjudicial a la salud humana.

2. ANTECEDENTES

2.1. CALIDAD

El control de calidad es la herramienta que existe para realizar el monitoreo de los procesos, este consiste en evaluar el comportamiento del proceso y se compara con sus objetivos para lograr la calidad total (*Carbellido 2006*).

Los productos alimentarios tienen que seguir una serie de procedimientos cuidadosamente establecidos para que sean de calidad y de esta manera asegurar el bienestar a las personas (*López 1999*).

El producto adquirido por el cliente deberá satisfacer sobradamente sus expectativas, es decir, que aquel servicio o producto funcione tal y como se lo requiera (*Altozano 2008*).

2.2 EMBOTELLADO Y ENVASADO DE BEBIDAS

En la mayoría de los mercados establecidos en todo el mundo, las bebidas refrescantes ocupan el primer lugar entre las bebidas fabricadas, superando incluso a la leche y el café en términos de consumo “per capita”.

Entre productos envasados listos para beber y mezclas a granel para dispensar a chorro, se dispone de bebidas refrescantes en casi todos los tamaños y sabores imaginables y en prácticamente todos los canales de distribución a minoristas.

Además de esta disponibilidad universal, el crecimiento de la categoría de bebidas refrescantes se puede atribuir, en buena medida, a un envasado conveniente. Dado que los consumidores cada vez tienen más movilidad, han optado por artículos envasados fáciles de transportar. Con la llegada de los botes de aluminio y, más recientemente, de las botellas de plástico con tapón de rosca, los envases de bebidas refrescantes se han hecho más ligeros y manejables. Las rigurosas normas de control de calidad aplicadas a los procesos de tratamiento del agua y los avances tecnológicos en la materia también han aportado a la industria de bebidas refrescantes un alto grado de confianza sobre la pureza del producto.

Además, las plantas de fabricación y embotellado que producen bebidas refrescantes se han transformado en instalaciones manipuladoras de alimentos altamente mecanizados, eficientes y perfectamente limpias.

A comienzos del decenio de 1960, la mayoría de los embotelladores producían bebidas con maquinaria que procesaba 150 botellas por minuto. Dado que la demanda del producto ha aumentado vertiginosamente, los fabricantes de bebidas refrescantes han introducido maquinaria más rápida. Gracias a los avances en la tecnología de producción, las líneas de llenado son capaces de procesar ahora más de 1.200 recipientes por minuto, con una pérdida de tiempo mínima, salvo para realizar los cambios de producto o de sabor. La fabricación de bebidas refrescantes empieza por el agua, que se trata y depura para cumplir rigurosamente las normas de control de calidad, que suelen estar por encima de la calidad del suministro local de agua. Este proceso es crítico para conseguir un producto de alta calidad y con características adecuadas de sabor.

A medida que los ingredientes se van combinando, el agua tratada se conduce a través de tuberías a grandes tanques de acero inoxidable. Esta es la etapa en que se añaden y mezclan varios ingredientes. Las bebidas dietéticas se mezclan con edulcorantes artificiales, no nutritivos, como aspartamo o sacarina, mientras que en las bebidas edulcoradas suelen utilizarse azúcares líquidos, como fructosa o

sacarosa. Durante esta etapa del proceso de producción es cuando se añaden los colorantes alimentarios. Las aguas aromatizadas efervescentes reciben el aromatizante deseado y las aguas naturales se almacenan en los tanques de mezclado hasta que sean necesarias en las líneas de llenado. Una práctica común entre las empresas embotelladoras es adquirir el concentrado a otras compañías. Para que se produzca la carbonatación [absorción de dióxido de carbono (CO₂)], las bebidas refrescantes se enfrían en grandes sistemas de refrigeración. Esto es lo que confiere a los productos carbonatados su efervescencia y textura. El CO₂ se almacena en estado líquido y se transfiere a través de tuberías a las unidades de carbonatación a medida que se necesita. El proceso se puede manipular para controlar la velocidad de absorción exigida por cada tipo de bebida. Dependiendo del producto, las bebidas refrescantes pueden contener desde 15 a 75 psi de CO₂. Las bebidas refrescantes con sabor a frutas tienden a tener menos carbonatación que las colas o el agua con gas. Una vez carbonatados, los productos están listos para ser envasados en botellas o botes.

La sala de llenado se encuentra normalmente separada del resto de la instalación, para proteger al producto abierto de cualquier posible contaminante (*Ver -Figura 1 Y Figura 2 EN ANEXO A*)).

A lo largo del proceso de producción se aplican estrictos procedimientos de control de calidad. Los analistas miden numerosas variables, entre ellas el CO₂, el contenido de azúcar y el sabor, para garantizar que los productos terminados cumplan las normas de calidad exigidas.

El envasado es la última etapa antes del almacenamiento y transporte. Este proceso también se ha automatizado en gran medida. En cumplimiento de ciertos requisitos de los mercados, las botellas o botes entran en la maquinaria de envasado y pueden ser envueltas con cartón para formar cajas o ser colocadas en bandejas o armazones de plástico recuperable. Los productos envasados entran entonces en la máquina apiladora, que los coloca automáticamente en los palés

2.3 TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras es muy importante ya que más de un cincuenta por ciento de errores en los resultados son a causa de una inadecuada toma de muestras de muestras, dependiendo de lo que se quiere determinar el envase debe ser siempre estéril que no pueda reaccionar con í posibles trazas presentes en la muestra. En nuestro caso en particular la toma de muestras se realiza en válvulas Por lo que es muy importante el purgado y flameado de estas.

2.4 COMPORTAMIENTO BACTERIOLOGICO

Para estudiar la relación que existe entre calidad de agua y salud humana, es necesario introducir el concepto de *microbiología*, y a partir de ello valorar la presencia de organismos microscópicos en agua potable, los efectos de competencia y/o sinérgicos de las distintas especies y la posibilidad de aplicar tecnologías de desinfección.

La *microbiología* es una rama de la biología que estudia seres vivientes de tamaño microscópico que existen como células aisladas o asociadas y también incluye el estudio de virus (microscópicos no celulares). En general, los microorganismos a diferencia de los macro organismos, son capaces de llevar a cabo procesos de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células sean del mismo tipo o diferentes.

Las células estudiadas en microbiología pueden pertenecer a dos grandes grupos, *eucariotas* y *procariotas*.

2.4.1. Las eucariotas constituyen la unidad estructural de protozoarios, hongos y algas cuyo tamaño las incluye en esta especialidad. Son organismos unicelulares o multicelulares que poseen en su interior estructuras limitadas por membranas llamadas organelas (núcleo, mitocondrias y cloroplastos presentes sólo en células capaces de realizar fotosíntesis).

2.4.2. Las células procariotas son las bacterias, cuya estructura interna es sencilla.

Etimológicamente el término procariota significa ausencia de membrana nuclear. En la tabla 1 se indican algunas diferencias y similitudes entre ambas células.

		Procariotas	Eucariotas
Núcleo		No verdadero	Verdadero
	Cromosomas	Único y circular	Varios y lineales
	Membrana	No	Sí
División celular		Fisión binaria ¹	Mitosis ² / Meiosis ³
Organización del citoplasma	Mitocondrias	No	Sí
	Nucleolos	No	Sí
	Retículo Endoplasmático	No	Sí
	Aparato de Golgi	No	Sí
	Ribosomas	Tipo 70S	Tipo 80S
Pared celular		Sí (peptidoglucano y lipopolisacáridos)	Sí (celulosa o quitina en hongos)
Órganos de movilidad		Flagelos	Cilias y flagelos

¹Replicación del ADN y división de la célula en dos células idénticas. ²división el núcleo: duplicación y distribución del ADN en las dos células hijas. ³división celular que origina células con la mitad del número de cromosomas

2.4.3. Morfología bacteriana

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, conocida también como bipartición. Su tamaño, por lo general es menor que el de una célula eucariota típica (por ej. *Escherichia coli* 0,5 × 2 um). Sin embargo, existe un amplio rango de tamaños según las especies que puede variar desde 0,2 um de diámetro como en el caso de los micoplasmas hasta 40 um como en la *Beggiatoa gigantea*.

La rigidez de la pared celular determina la morfología de una célula bacteriana.

Los principales tipos de formas que presentan las bacterias son: esférica, bastón alargado o espiral. Las bacterias de forma esférica se denominan *cocos* (redondeados, ovoides o elípticos); las de forma de bastón alargado se denominan *bacilos* (cilíndricos, fusiformes, etc.) y las de forma de bastón curvado se denominan *espirilos*. Aquellas bacterias cuya imagen proyectada sobre el plano tienen forma de coma, se llaman *vibrios*. Otras formas que pueden presentar las

bacterias son filamentosas (ramificada o no), anillos y también estructuras con prolongaciones (Ver Figura 3 en ANEXOS)

Si bien la mayoría de las bacterias mantienen su forma, algunas pueden presentar modificaciones y se las denomina *pleomórficas*. El pleomorfismo está relacionado a veces a la edad del cultivo y se manifiesta en bacterias sin pared celular (micoplasmas). Las *formas L* son bacterias que perdieron la pared celular por una situación de estrés (temperatura, presión osmótica, etc.) pero que son capaces de resintetizarla cuando el estrés cesa. Siendo la morfología una característica taxonómica, es importante determinar el fenómeno de pleomorfismo originado por las condiciones del cultivo, para evitar falsas identificaciones. Las células bacterianas, observadas al microscopio, pueden aparecer como células aisladas o agrupadas. Las agrupaciones de dos células de formas cocoides se denominan *diplococos*. El o los planos en los cuales tiene lugar la división celular, determina la disposición característica de especie.

Así, si existe un solo plano de división se originan cadenas, por ej. *Streptococcus* (cocos en cadena). Cuando la bipartición tiene lugar en dos planos perpendiculares, se originan *tétradas*, por ej. *Pediococcus*. La división en tres o más planos ortogonales origina paquetes de 8 células o más, por ej. *Sarcina*. Finalmente si ocurre fisión binaria en planos no perpendiculares se observa disposición de *racimos irregulares*, por ejemplo *Staphylococcus*. Los bacilos pueden presentar otras disposiciones: *en empalizada* (por giros de 180°), en forma de *letra V* o *L* (dos bacilos en posición angular) y varios bacilos que forman *letras chinas*.

El flagelo, una estructura celular procariota no constante, está involucrada en la motilidad bacteriana; es de naturaleza proteica (flagelina) y su composición química es diferente a la del flagelo de una célula eucariota (estructura microtubular). La disposición de los flagelos puede ser polar (localización en uno o ambos extremos de la bacteria) o peritrica (distribución alrededor de la superficie celular). Algunos géneros de bacterias, entre ellos *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, etc., tienen la capacidad de

formar endosporas, que a diferencia de las esporas fúngicas, no son formas de reproducción sino estructuras de resistencia frente a agentes físicos y químicos. El fenómeno de esporulación bacteriana está codificado a nivel genético, y en presencia de glucosa los genes responsables se encuentran reprimidos.

Una técnica de coloración con valor taxonómico, es la *tinción diferencial de Gram* que permite dividir las bacterias en dos grandes grupos. La respuesta a los reactivos usados, que guarda estrecha relación con la estructura de la pared celular (principalmente con el peptidoglicano o mureína) logra clasificarlas en Gram(+) (Gruesa capa de peptidoglicano) y Gram(-) (fina capa de peptidoglicano con membrana externa de lipopolisacáridos).

2.4.4. Crecimiento microbiano

El *crecimiento celular* se define como el aumento ordenado de todos los componentes químicos que llevan a un incremento de los constituyentes y estructuras celulares.

Los *nutrientes*, a partir de los cuales los microorganismos sintetizan sus principales biomoléculas y obtienen su energía, están disueltos en agua, razón por la cual el crecimiento celular depende de la disponibilidad de agua.

Las distintas especies bacterianas tienen diferentes requerimientos nutricionales (a veces específicos) y condiciones fisicoquímicas que les permiten permanecer viables.

Los nutrientes requeridos en grandes cantidades son denominados *macro nutrientes* mientras que los *micronutrientes* son necesarios en cantidades trazas. Entre los primeros se encuentran C, H, O, N (los más abundantes), P, S, K, Ca, Fe y Na, y entre los segundos podemos citar Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, W, V, Zn. Algunos organismos, además de los minerales, necesitan muy pequeñas cantidades de nutrientes de naturaleza orgánica llamados *factores de crecimiento*. Éstos son vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Los organismos que tienen tales requerimientos se denominan *auxótrofos* para diferenciarse de los *protótrofos* que son independientes de tales factores. Estos dos conceptos no son suficientes para caracterizar los distintos tipos de nutrición existentes en los microorganismos.

Dijimos que la nutrición es el proceso por el cual los seres vivos toman, del medio donde habitan, los nutrientes que necesitan para crecer. Estos nutrientes se requieren para dos fines: energéticos (reacciones de *mantenimiento*) y biosintéticos (reacciones plásticas o *anabolismo*).

Puesto que, como mencionamos, la nutrición presenta un aspecto de aprovisionamiento de energía y otro de suministro de materiales para la síntesis celular, podemos considerar dos “clasificaciones”. Desde el punto de vista de los fines del aprovisionamiento de energía, las bacterias se pueden dividir en *fitótrofas* cuando utilizan la luz como fuente de energía (algas y cianobacterias) y *quimiótrofas* si utilizan compuestos químicos como fuente de energía. Dentro de éstas, se encuentran las *quimiofitótrofas* que sólo requieren sustancias inorgánicas sencillas como H₂S, S, NH₃, NO²⁻, Fe²⁺, etc. (*Nitrosomona*, *Nitrobacter*, *Gallionella*) y *quimiorganótrofas* que requieren compuestos orgánicos como hidratos de carbono, hidrocarburos, lípidos, proteínas, alcoholes, etc. (*Enterobacter*, la mayoría de las cultivadas en laboratorios).

Desde el punto de vista biosintético, las bacterias se pueden dividir en *autótrofas* que crecen sintetizando sus materiales a partir de sustancias inorgánicas sencillas. Usualmente el concepto de autotrofia se limita a la capacidad de utilizar el CO₂ como fuente de carbono (*clorofitas*, *cianofitas*, *Thiobacillus denitrificans*, *Nitrobacter*, *Nitrosomona*). En el extremo opuesto se encuentran las *heterótrofas* cuya fuente de carbono es orgánica (*Lactobacillus*, *Serratia*, etc.). Existe una gama de situaciones intermedias con respecto a la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno. Por ejemplo, las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* utilizan compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de C, y NH₃, N₂, NO²⁻ y NO³⁻ como fuente de nitrógeno.

Como se mencionó en párrafos anteriores, el oxígeno es un macronutriente y los microorganismos se pueden dividir en cuatro grupos sobre la base del papel que juega el O₂ en su nutrición. Las bacterias *aerobias* necesitan O₂ para crecer; algunas de ellas requieren presiones de oxígeno inferiores a la atmosférica (2 a 10% de O₂, en lugar de 20%) y se conocen como *microaerófilas*. Las *anaerobias facultativas* pueden realizar metabolismo energético aerobio (respiración aerobia)

o anaerobio (respiración anaerobia y fermentación), dependiendo del ambiente, la disponibilidad de oxígeno y la concentración de nutrientes (por ej. Las enterobacterias como *E. coli*).

Las bacterias *anaerobias estrictas* son aquellas para las cuales el oxígeno resulta tóxico (por ejemplo *Clostridium*). Las bacterias *anaerobias aerotolerantes* al igual que las anteriores, presentan un metabolismo energético anaerobio (fermentación), pero soportan el oxígeno debido a que poseen enzimas detoxificantes (por ej. *Streptococcus*).

El conocimiento de la nutrición microbiana permite el cultivo de los microorganismos en el laboratorio. En general, como se ha mencionado, todos los microorganismos tienen requerimientos de macro y micronutrientes semejantes, aunque la forma en que cada uno de ellos es captado y su cantidad relativa pueden variar mucho entre los diferentes géneros. En el laboratorio, el desarrollo de los microorganismos se realiza en *medios de cultivos* que son ambientes artificiales diseñados por el hombre para proporcionar todas las sustancias necesarias para el crecimiento microbiano.

2.4.5. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo se clasifican en:

2.4.5.1. Sintéticos o definidos: Contienen concentraciones conocidas de sustancias químicas puras, de naturaleza orgánica y/o inorgánica. La composición de un medio sintético depende del microorganismo que se quiera cultivar; así un medio definido para una bacteria con gran capacidad biosintética será más simple que el de otra bacteria con menor posibilidad de biosíntesis.

2.4.5.2. Complejos o indefinidos: Están constituidos por ingredientes de alta calidad nutricional, pero de composición química desconocida ya que son el producto resultante de infusiones y extractos de sustancias naturales complejas. Se usan digeridos crudos de caseína (proteína de leche), hígado, levadura, carne, soja, sangre, etc. Sin embargo, con ellos no se tiene un control nutricional preciso. Según la finalidad para la cual fueron formulados, los medios de cultivo se pueden clasificar en:

2.4.5.3. Enriquecidos: Son medios complejos o sintéticos con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Se adicionan al medio de cultivo sustancias nutritivas tales como azúcares, sangre, suero, extractos de tejidos de animales y plantas.

2.4.5.4. Selectivos: Son aquellos que permiten por su diseño el crecimiento específico de un determinado microorganismo o grupo de microorganismos e impiden mayoritariamente el desarrollo de los demás. Estos medios son de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de poblaciones microbianas mixtas. Se incorporan ciertas sustancias que otorgan la selectividad buscada al medio. Por ejemplo el agregado de lactosa, bilis, NaCl, azida, taurocolato, antibióticos, permite el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos impidiendo el desarrollo de otros.

2.4.5.5.: Son aquellos que permiten distinguir a simple vista dos o más tipos de bacterias en función de su distinto comportamiento respecto de algún nutriente del medio. Ese comportamiento diferencial se traduce normalmente en un viraje de color de una sustancia indicadora presente en el medio. Poseen en su composición un reactivo o sustancia química que al combinarse con algún producto del metabolismo origina una coloración característica. Por ejemplo, el desarrollo de *E. coli* en medio Endo da colonias rojas ya que la fucsina decolorada con bisulfito de sodio al combinarse con los aldehídos provenientes del metabolismo bacteriano de lactosa, imprime coloración roja a la colonia.

2.4.5.6. Selectivos-Diferenciales: Representan una combinación de los dos últimos medios. Permiten el desarrollo de una bacteria o un tipo bacteriano y al mismo tiempo producen una coloración característica del organismo en estudio.

2.4.5.7. Electivos: Favorecen el desarrollo de una especie bacteriana y las restantes crecen poco y lentamente.

Cualquiera sea el tipo de medio, se pueden preparar para ser usados en estado líquido, sólido o semisólido.

Los medios de cultivo líquidos se conocen como *caldos* y a partir de ellos, por el agregado de un agente solidificante estable (agar), se preparan medios de

consistencia sólida o semisólida, que se denominan medios *sólidos* o *agarizados*. El gelificante más usado es el agar-agar en una concentración de 1,5-2% y 0,7% para el *sólido* y *semisólido* respectivamente. Presenta la gran ventaja que una vez gelificado, no funde hasta cerca de los 100°C, lo que permite su uso para la mayoría de las bacterias y además son muy pocos los microorganismos que lo hidrolizan (agarolíticos) como ocurre con la gelatina.

Un medio de cultivo líquido generalmente se fracciona en tubos tapa rosca o en matraces cónicos con tapón de algodón y el desarrollo de los microorganismos se observa macroscópicamente por enturbiamiento del medio. Los medios sólidos se disponen en cajas de Petri de vidrio o plástico con tapa, donde cada célula microbiana por divisiones sucesivas da origen a masas visibles denominadas *colonias*. Este hecho es el que permite cuantificar los microorganismos presentes en muestras, a partir de las cuales se realizan diluciones, siembras e incubaciones, basándose en la premisa que cada colonia se origina de una célula. El medio de cultivo requiere una *esterilización*, inmediatamente después de su preparación, para eliminar los microorganismos contaminantes; esto se hace normalmente por calor húmedo a menos que en su composición, el medio contenga sustancias termolábiles. Su manipulación posterior, para mantener las condiciones de asepsia, requiere ciertas precauciones, por ejemplo trabajar en flujos laminares o cerca de llama demecheros. La transferencia de un cultivo desde un recipiente a otro se lleva a cabo con pipeta estéril o con ansa o aguja previamente esterilizadas por incineración a la llama.

Los medios de cultivos agarizados son utilizados para el aislamiento microbiano a partir de muestras donde coexisten diferentes poblaciones, las que posteriormente se siembran en medios de cultivos líquidos adecuados para obtener un crecimiento máximo.

Tanto en los medios artificiales de laboratorio como en el ambiente natural, la nutrición de la célula lleva inicialmente a un aumento de tamaño y peso que precede a la división celular. En la mayoría de los microorganismos, el crecimiento continúa hasta que la célula se divide en dos células hijas mediante el proceso de fisión binaria, el cual conduce al crecimiento de las poblaciones. Es difícil estudiar

el crecimiento de la célula individual, especialmente en los microorganismos, debido a que los métodos analíticos no son los suficientemente sensibles como para ser aplicados a estructuras tan pequeñas. Es por esto que habitualmente para evaluar el crecimiento se analiza el aumento de la población microbiana.

El crecimiento de una población tiene lugar en forma exponencial. Una célula se divide en dos células hijas y luego éstas se dividen a su vez en dos nuevas células, o sea que en cada período de división, la población se duplica por lo que la multiplicación corresponde a una progresión geométrica:

$$2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n.$$

El intervalo de tiempo requerido para que una población se duplique se define como *tiempo de generación o tiempo de duplicación* y se representa con la letra *g*. No todas las bacterias tienen el mismo tiempo de generación. Para algunas, como *E. coli*, *g* es ~ 20 min y para otras, como *Nitrosomona* y *Nitrobacter*, *g* es mucho mayor (5-10 h). El tiempo de generación depende de los nutrientes y de las condiciones fisicoquímicas del medio. A pesar que las bacterias son capaces de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales y utilizar diversos nutrientes, el crecimiento máximo, para una dada especie, se lleva a cabo bajo condiciones óptimas de pH y temperatura.

El método más usado para determinar el tiempo de generación consiste en inocular el medio de cultivo apropiado con las células bajo estudio. Al cabo de determinados intervalos de tiempo, bajo condiciones óptimas, se toman muestras para el recuento de microorganismos.

Si se define a *g* como el cociente entre el tiempo transcurrido (*t*) y el número de divisiones (*n*) que ocurrieron en ese tiempo:

$$g = \frac{t}{n} \dots \dots \dots (1)$$

Teniendo en cuenta que luego de *n* divisiones, el número de células será:

$$x = 2^n x_o \dots \dots \dots (2)$$

Donde x es el número de células obtenidas en el tiempo t y x_0 es el número de células iniciales.

De las ecuaciones (1) y (2), se puede calcular el tiempo de generación:

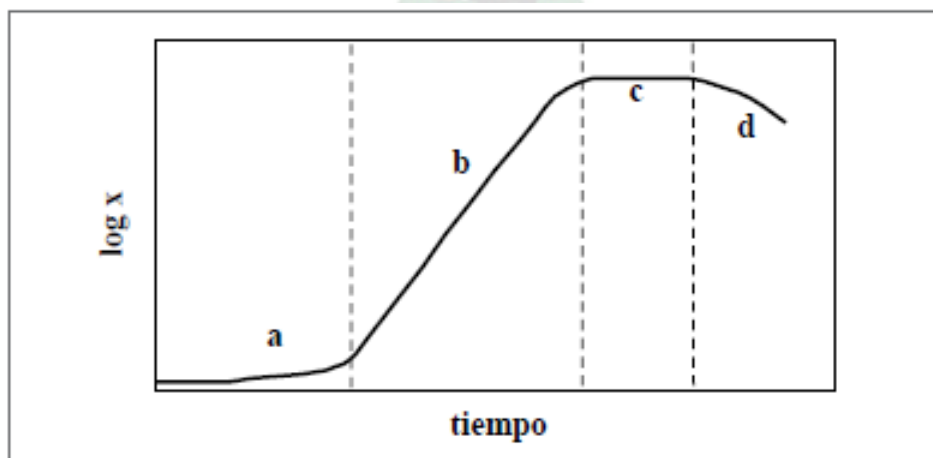
$$g = \log 2 \frac{t}{\log \frac{x}{x_0}} \dots\dots\dots(3)$$

Otro parámetro que permite analizar el crecimiento exponencial es la *velocidad de crecimiento* que se representa con la letra k y se define como el número de generaciones que ocurren en un tiempo t .

$$k = \frac{n}{t} = g^{-1} = \frac{\left[3.3 \log \frac{x}{x_0} \right]}{t} \dots\dots\dots(4)$$

La velocidad de crecimiento k varía con la naturaleza y concentración de los nutrientes, pH, temperatura, fuerza iónica del medio, etc., además de factores genéticos.

El crecimiento de una población bacteriana durante un dado período de tiempo se representa gráficamente como el log del número de células en función del tiempo .



En la figura 2 se distinguen cuatro fases:

- ✓ fase de latencia o fase lag (a);
- ✓ fase Exponencial o fase logarítmica (b);
- ✓ fase estacionaria (c)
- ✓ fase de muerte (d).

Entre cada una de estas fases existe un período de transición que representa el tiempo requerido para que todas las células entren en una nueva fase.

Al inicio del crecimiento, los microorganismos requieren un período de adaptación al nuevo ambiente. Esta es la *fase de latencia o fase lag*. En ella, las células sintetizan enzimas involucradas en el metabolismo de los nutrientes disponibles, se incrementa la síntesis de macromoléculas como RNA y proteínas. Sin embargo, la síntesis de DNA permanece constante y las células no se dividen ($k = 0$). La longitud de la fase lag depende del estado fisiológico y genético del microorganismo al ser introducido en el medio de crecimiento. Si las células provienen de un medio de cultivo diferente, o de un cultivo agotado (viejo) con acumulación de metabolitos tóxicos para las células, éstas requerirán mayor tiempo para reiniciar el crecimiento activo y presentarán una fase lag larga. En contraposición, si las células provienen de un medio idéntico y han sido obtenidas de un cultivo joven, la fase de latencia será corta o inexistente. Existen otros factores que pueden influir sobre la fase de latencia: cantidad de microorganismos sembrados (inóculo), daño que pudieron sufrir las células por la acción de radiaciones, calor, sustancias antimicrobianas, etc.

En la *fase logarítmica o fase exponencial*, las células se dividen regularmente según el tiempo de generación de cada especie. Por ejemplo, *E. coli* en un determinado medio de cultivo puede dividirse cada 20 min durante la fase exponencial, mientras que si el crecimiento se produce en un medio más pobre, la división puede suceder cada 30 min o más. En esta fase, y en condiciones apropiadas, la velocidad de crecimiento es constante y máxima, y de esta manera el valor de k para esta fase es el adecuado para estudiar el efecto de los factores ambientales, la utilización de distintos sustratos, etc. Durante esta fase, la

población total es casi uniforme en lo que se refiere a composición química de las células, actividad metabólica y otros caracteres fisiológicos. Las células son viables y su tamaño constante. Como consecuencia del agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, disminuye la velocidad de crecimiento hasta que llega a detenerse ($k = 0$). En este punto, se dice que el cultivo está en *fase estacionaria*. La transición entre la fase log y estacionaria, implica una etapa de crecimiento desequilibrado (crecimiento no balanceado) durante el cual los componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. En consecuencia, las células en fase estacionaria tienen una composición química diferente a la de las células en fase exponencial. El número de células viables permanece constante, porque mientras algunas de ellas se dividen, otras mueren. Las células viables continúan produciendo ácidos y productos tóxicos. Algunas células muertas se lisan y liberan enzimas (proteasas, nucleasas y lipasas) que degradan las macromoléculas a moléculas más pequeñas, las que a su vez serán usadas por las células vivas. Esta fase puede extenderse desde horas hasta varios días dependiendo de la especie bacteriana. Si la incubación del cultivo se prolonga varias horas después que la población ha alcanzado la fase estacionaria, las células alcanzarán la *fase de muerte* que se caracteriza porque k es constante, indicando que el número de células vivas decrece con el tiempo en progresión geométrica. La velocidad de muerte y la duración de esta fase varían en las distintas especies bacterianas. En ciertos casos, la muerte se acompaña de lisis celular que se manifiesta por una disminución del número de células viables y masa celular. Cuando no hay lisis, decrece el número de células viables mientras que la masa celular permanece constante.

2.4.6. Recuento de Colonias

2.4.6.1. Recuento en medio sólido: El recuento de colonias es la forma más práctica para distinguir células viables y no viables en una suspensión bacteriana. Cada bacteria viable da lugar a la formación de una colonia después de la incubación en un medio agarizado apropiado. Se diluye la muestra, se toma un volumen determinado y se siembra en un medio agarizado contenido en cajas de Petri. Se incuba y una vez desarrollado el cultivo, se cuenta el número de colonias expresándose el resultado como UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colonia por mL).

2.4.6.2. Turbidimetría: Las bacterias poseen un elevado índice de refracción que permite la dispersión de la luz que incide sobre ellas y el crecimiento queda determinado por el enturbiamiento originado en un medio líquido. Debido a los colores de los medios de cultivo, generalmente se usan longitudes de onda entre 490 y 660 nm. Esta técnica es de fácil ejecución y da resultados inmediatos, y se la conoce vulgarmente como método DO (densidad óptica).

El desarrollo de un microorganismo en un ambiente, sea éste su ambiente natural o un medio de cultivo de laboratorio, está determinado por los nutrientes disponibles y las condiciones fisicoquímicas. Son muchos los factores fisicoquímicos que pueden afectar el crecimiento microbiano, entre los cuales los más importantes son: temperatura, pH, bio disponibilidad de agua, presión osmótica, disponibilidad de O₂, tensión superficial y radiaciones. Ellos modifican la velocidad de crecimiento de los microorganismos, provocando cambios que, a determinados valores de dichos factores de los factores ambientales actúa independientemente y un cambio en uno de ellos puede afectar la acción del otro. Así como los requerimientos nutricionales son diferentes para los distintos microorganismos, también lo son las condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo, así se explica la variada distribución de los mismos en la naturaleza. Conocer la respuesta de los microorganismos a su medio ambiente es importante para darles condiciones óptimas de desarrollo o, por el contrario, para inhibir su crecimiento. Es decir, permite ejercer un control del crecimiento microbiano.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes por su amplia aplicación. Temperaturas extremadamente bajas y extremadamente elevadas, se utilizan de manera corriente para la conservación de microorganismos o para provocar su muerte respectivamente. La razón para ello es que a temperaturas extremadamente bajas, tanto la membrana plasmática como el citoplasma microbiano pierden fluidez disminuyendo o deteniendo completamente el transporte de nutrientes desde el medio externo y las reacciones enzimáticas propias del metabolismo que permitirían la utilización de estos nutrientes. Por el contrario, temperaturas demasiado elevadas, inactivan sistemas enzimáticos, desnaturalizan proteínas y dañan las envolturas celulares llevando a la lisis térmica. Existe, entre ambos extremos, un intervalo de temperatura de crecimiento en el cual un dado microorganismo es capaz de incorporar nutrientes del medio ambiente, conducirlos por los caminos catabólicos y anabólicos necesarios para el crecimiento y división celular, que da como resultado el crecimiento de una población. Dentro de este intervalo, se distingue una *temperatura óptima* en la que tanto el transporte como el metabolismo alcanzan la máxima velocidad en el ambiente en el que se encuentra el microorganismo. Los tres valores de temperatura, mínima, óptima y máxima, se conocen como temperaturas cardinales. En base a ellas podemos clasificar los microorganismos en grupos compuestos por organismos muy diferentes entre sí pero que presentan gran similitud en su comportamiento frente a la temperatura.

Temperatura / °C				
Grupo	Mínima	Óptima	Máxima	Ejemplos
PSICRÓFILOS				
<i>Obligados</i>	< 0	10-15	< 20	<i>Flavobacterium</i>
<i>Facultativos</i>	0 15-20	15-30 30-40	> 25 < 45	Bacterias de deterioro de alimentos refrigerados
MESÓFILOS				Mayoría de las bacterias
TERMÓFILOS				
<i>Facultativos</i>	35	42-45	> 50	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Estrictos</i>	45	50-75	> 80	<i>Thermoproteus</i>
<i>Extremos</i>	65	80-105	> 100	<i>Pyrolobus fumarii</i>

Temperaturas para el desarrollo de las bacterias

El efecto letal, de temperaturas superiores al *máximo* tolerado para el crecimiento, se determina calculando la *tasa de muerte térmica* o *punto de muerte térmica* que se define como la menor temperatura que mata a toda la población en 10 minutos. Otro factor importante para el crecimiento microbiano es la concentración de iones hidrógeno. En general, los ambientes naturales tienen un pH comprendido entre 5 y 9, y la mayoría de los microorganismos crecen dentro de esos valores. Sin embargo, algunos pueden desarrollar a valores de pH inferiores o superiores a los indicados.

De acuerdo al rango de pH en el que es posible su desarrollo, se los clasifica en tres grupos, como muestra la tabla.

Tipos de microorganismos	Rango de pH	Ejemplos
ACIDÓFILOS	1-5,0	<i>Thiobacillus</i> (eubacterias) <i>Sulfolobus</i> (Archeas)
NEUTRÓFILOS	5,5-8,0	Mayoría de las bacterias
BASÓFILOS	8,5-11,5	<i>Bacillus alcalophilus</i>

Clasificación de los microorganismos según el rango de pH de desarrollo

Los valores de pH superiores e inferiores al rango que corresponde a un dado microorganismo son nocivos, ya que afectan la estabilidad de la membrana plasmática, inhiben enzimas, y alteran el transporte de solutos y la nutrición. Muchos nutrientes ingresan a las células atravesando la membrana plasmática por *transporte pasivo*, el que sólo puede llevarse a cabo si los nutrientes están en su forma *no ionizada*. El pH del ambiente puede tener un *efecto nocivo indirecto* sobre los microorganismos, produciendo ionización de algunos nutrientes e impidiendo su utilización.

Todos los microorganismos poseen mecanismos de regulación del pH citoplasmático que les permite mantener su valor constante. El mantenimiento de un pH constante en el citoplasma es muy importante para la supervivencia de los microorganismos ya que la acidificación o alcalinización del mismo lleva a la desnaturalización de componentes vitales de la célula (proteínas a pH bajo y

ácidos nucleicos a pH elevado). Éste es el *efecto nocivo directo* del pH del ambiente.

Todos los microorganismos requieren agua para vivir; y la disponibilidad de agua se expresa como *actividad de agua* (a_w). La actividad está dada por la presión de vapor de agua en el aire que se encuentra en equilibrio con una solución o sustancia, con relación a la presión de vapor del agua pura. Su valor varía de 0 a 1, siendo más alto cuánto más agua libre tiene el ambiente. En el ambiente en el que desarrollan los microorganismos, no toda el agua está disponible. La actividad de agua es alterada por dos efectos: el *osmótico* (interacción con solutos) y el *mátrico* (adsorción a superficies).

Por ambos efectos, la disponibilidad de agua puede ser baja, y en ese caso, los microorganismos tienen dificultades para incorporar nutrientes, limitando esto su desarrollo. Según el rango de a_w al que crecen, los microorganismos se clasifican en: *normales* ($a_w=1-0,95$) como *Streptococcus*, *osmotolerantes* ($a_w=0,95-0,80$) como *Staphylococcus*, *osmófilos* ($a_w=0,80-0,75$) y *osmófilos extremos* ($a_w=0,75-0,63$).

Los ambientes de alta osmolaridad contienen principalmente altas concentraciones de cloruro de sodio o azúcares. Los microorganismos que toleran o requieren NaCl se pueden clasificar en *halotolerantes* (toleran elevadas concentraciones de ClNa pero no lo requieren, por ej. *Staphylococcus aureus*), *halófilos moderados* (suelen ser bacterias marinas que viven en concentraciones NaCl igual a 0,5 M y tienen requerimientos concretos de a_w equivalente a la de agua de mar, así como concentraciones determinadas de iones Na^+), *halófilos extremos* o *hiperhalófilos* (por ej. *Halobacterium* y *Halococcus* que requieren concentraciones saturantes de sales, 4 a 7 M de NaCl).

La naturaleza de las paredes celulares favorece la ubicación de las bacterias en la superficie del líquido, para optimizar la energía superficial. En esas condiciones, la depleción local de nutrientes puede ocurrir rápidamente; se establecen gradientes pronunciados de nutrientes y de oxígeno, en direcciones opuestas. Para evitar estos efectos se utiliza, en los medios de cultivo, *tensoactivos* o *surfactantes* que reducen la tensión superficial y permiten el desarrollo de los microorganismos de

manera uniforme en todo el medio. Al reducir la tensión superficial, el O₂ difunde más fácilmente llegando hasta el fondo de los tubos con medio líquido. Los grumos o agregados que forman algunos microorganismos durante el crecimiento, también desaparecen con el uso de estos agentes, favoreciendo la nutrición. El surfactante más comúnmente usado es un detergente no-iónico, el Tween 80. En su molécula tiene un cuerpo carbonado (hidrofóbico) y una cabeza polar (hidrofílica) que recuerda a los fosfolípidos de membrana. Usados en concentración adecuada favorecen el desarrollo de los microorganismos, pero en exceso, producen daños en la membrana celular intercalándose entre los fosfolípidos.

Las radiaciones UV y las radiaciones de menor longitud de onda (ionizantes) tienen fuertes efectos sobre los sistemas biológicos, tanto mutacionales como letales.

El efecto letal de estas radiaciones es dosis dependiente, relacionada con el tiempo de exposición y con las condiciones experimentales; además depende del estado del organismo (siendo más efectivas en fase exponencial que en fase lag o estacionaria) y de las condiciones ambientales durante la exposición.

2.4.7. Microorganismos Presentes en Aguas Naturales

La variabilidad microbiológica de las aguas naturales abarca numerosos organismos e incluye células eucariotas (algas, protozoarios y hongos), células procariotas (bacterias) y virus (microorganismos con capacidad de síntesis nula).

2.4.7.1. Algas

Estos microorganismos contienen necesariamente clorofila para la actividad fotosintética, sin embargo el color verde puede estar enmascarado por otros pigmentos (carotenoides) presentes. Son aerobias, y en ambientes con poco

oxígeno, mueren, flotan y se descomponen produciendo mal olor. Podemos encontrar las siguientes familias de algas:

- ✓ *Chlorophyta* o algas verdes que huelen a pescado o hierba.
- ✓ *Cyanophyta* o algas verdes azuladas con olores desagradables que pueden
- ✓ *Chrysophyta* son de color amarillo verdoso y a menudo generan olores Aromáticos (geranios) o huelen a pescado, por ej. *Aulococeira* y *Cyclotella*.

2.4.7.2. Protozoarios

Frecuentemente en el agua contaminada con heces se encuentran dos protozoarios parásitos con incidencia en salud humana, responsables de epidemias:

****Giardia lamblia*:**

Es flagelado con un tamaño de 15 μm y se transmite a hombre a través de agua contaminada con materia fecal. Las células del protozooario producen un estado de reposo denominado *quiste*. Los quistes al ser ingeridos germinan y causan *giardiasis*, enfermedad caracterizada por diarreas, calambres intestinales, flatulencia, náuseas, síntomas que pueden ser agudos o crónicos. La giardiasis es una de las enfermedades parasitarias de origen hídrico más comunes.

****Cryptosporidium parvum*:**

Es un parásito del hombre y animales de tamaño muy pequeño (2-5 μm), redondeado que crece en el interior de las células del epitelio mucoso de intestino y estómago. Los quistes infecciosos producidos por este protozooario poseen una pared muy gruesa. Los quistes de *Cryptosporidium* son mucho más resistentes a la cloración que los de *Giardia*. La *criptosporidiosis* es una infección que se caracteriza por dolores estomacales, náuseas, diarrea y deshidratación.

2.4.7.3. Virus

El 87% de las enfermedades virales transmitidas por el agua son causadas por el virus de la hepatitis (adenovirus y rotavirus).

2.4.7.4. Bacterias

Más del 80% de las bacterias pueden aislarse del agua. Teniendo en cuenta la respuesta a la tinción de Gram, a continuación se mencionan y describen algunas de las más importantes.

***Bacterias Gram negativas:**

Entre las especies que se han aislado de aguas, podemos mencionar a las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*.

Las pseudomonas son las más comunes en napas freáticas debido a su versatilidad respecto a fuentes de carbono, y a sus bajos requerimientos nutricionales. Ellas son bacilos psicrófilos, presentan flagelos peritricos, producen pigmentos (verde, azul verdoso, rojo, marrón) y no forman esporas. La morfología y el hábitat de muchas pseudomonas coincide con el de bacterias entéricas como *Escherichia coli* pero se diferencian en que no fermentan azúcares. Según el Manual de Bergey este grupo admite 7 especies, siendo *Pseudomonas aeruginosa* la de mayor relevancia sanitaria, es un patógeno oportunista por excelencia y el agente etiológico principal de infecciones en vías urinaria, intestino, oído y heridas. Por su relativa resistencia al cloro es considerada un indicador de eficiencia de la cloración. Su presencia en sistemas de almacenamiento, tanque, y cisternas, responde a un estado deficiente de dichas instalaciones. El control de pseudomonas, al igual que el de bacterias aeróbicas, debe intensificarse en redes expuestas a contaminación o cuando se comprueba cloración deficiente.

Flavobacterium es un género ampliamente distribuido en aguas y suelos. No ha sido encontrado en sedimentos de acuíferos profundos pero si en las aguas que se extraen de ellos. Por esta razón, se duda si las flavobacterias se encuentran naturalmente en un acuífero o simplemente colonizan el pozo luego de su perforación. Son bacilos que se caracterizan por falta de movilidad y producción de pigmentos de color amarillo.

Los bacilos del género *Gallionella* se caracterizan por ser quimiolitótrofos, obtienen energía por oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y la precipitación usualmente de hidróxidos de (III), en o sobre las colonias, les otorga una coloración marrón característica.

Ellas crecen en lugares donde existen mezclas de aguas aerobias y anaerobias, y donde abunda el ion Fe^{2+} . Así, en pozos donde existe una interfaz aero-anaeróbica, su desarrollo causa obstrucción por la precipitación de oxihidróxidos de hierro (III).

Las enterobacterias o *Enterobacteriaceae* son las más importantes dentro de los *anaeróbicos facultativos* y su presencia en agua está asociada a contaminación fecal. Este grupo de bacterias habita naturalmente el intestino de los animales. Son bacilos no esporulados, no móviles y si lo son es por flagelos de inserción peritrica, con requerimientos nutricionales relativamente simples. Generalmente se identifican por su capacidad para fermentar glucosa por vía glucolítica dando ácidos como producto final. *Escherichia coli*, habitante normal del intestino humano, es utilizada como indicador de contaminación fecal de aguas. Las cepas patógenas de *E. coli* causan infecciones del tracto intestinal (generalmente agudas y no presentan mayores complicaciones, excepto en niños y adultos con deficiencias nutricionales). Otros ejemplos de patógenos humanos de este grupo son *Shigella*, *Salmonella* y *Klebsiella*. *Shigella dysenteriae* es causante de la disentería bacilar, *Salmonella typhimurium* y *typhi* producen gastroenteritis y fiebre tifoidea respectivamente.

El grupo *Vibrio* está integrado por bacilos curvados, anaerobios facultativos, poseen flagelos polares aunque algunos son peritricos. Se diferencian de las *Pseudomonas* en su metabolismo no fermentativo. Están presentes en aguas dulces o marinas. *Vibrio cholerae*, especie más representativa de este género, es patógeno para humanos y responsable del cólera. Su transmisión es casi exclusivamente por vía hídrica. Otras especies patógenas importantes para el hombre que se pueden encontrar en muestras de agua pertenecen a los géneros *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*.

Los cocos del género *Neisseria*, aislados de sedimentos de acuíferos aeróbicos, son causantes de gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*) y meningitis (*Neisseria*

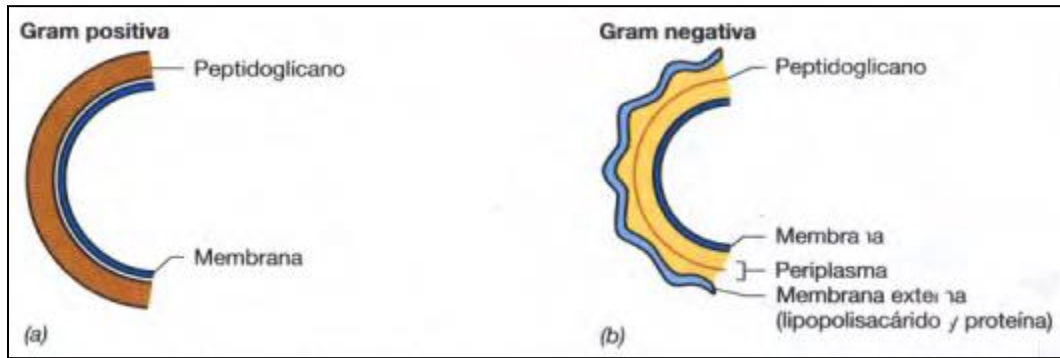
meningitidis). Las especies de *Moraxella* y *Acinetobacter* son bacilos y se transforman en cocos solamente en la senectud, y por ello se las propone como cocobacilos. Algunas especies de *Moraxella* han sido aisladas de aguas profundas originadas de acuíferos aeróbicos y representantes del género *Acinetobacter* se encuentran frecuentemente también en aguas subterráneas aeróbicas.

***Bacterias Gram positivas**

No representan un grupo muy difundido en agua, sin embargo incluye algunos patógenos humanos aislados especialmente de aguas subterráneas.

Los cocos más comunes pertenecen a los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Los micrococcos y estafilococos son aerobios y tolerantes a altas concentraciones salinas que permite diferenciarlos de los estreptococos. Varias especies de los dos primeros son importantes patógenos humanos; aunque no existe certeza acerca de su habitat original, la bibliografía las considera procedentes de aguas subterráneas. El género *Streptococcus* incluye a *Enterococcus faecalis*, patógeno humano que habita normalmente en el intestino de hombres y animales por lo que es un indicador de contaminación fecal de aguas.

Las bacterias esporulantes, pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Clostridium* presentan metabolismo aeróbico y anaeróbico respectivamente. A partir de suelos y acuíferos aeróbicos se aíslan especies incluidas en el género *Bacillus*; y a partir de suelos, sedimentos, aguas subterráneas anaerobias y última porción del tracto intestinal de animales se pueden encontrar especies de *Clostridium*. Algunas especies son patógenos para animales, generalmente debido a la producción de poderosas exotoxinas: la del *Bacillus anthracis*, conduce al desarrollo de *antrax*, enfermedad de animales que puede transmitirse a humanos (*zoonosis*) y la del *Clostridium tetani* que ocasiona una enfermedad en humanos caracterizada por tetanización de músculos, razón por la cual recibe el nombre de *tétano*.



2.4.8. Bacterias Indicadoras de Contaminación

Las condiciones bacteriológicas del agua son fundamentales desde el punto de vista sanitario. La *norma bacteriológica de calidad* establece que el agua debe estar exenta de patógenos de origen entérico y parasitario intestinal que son los responsables de transmitir enfermedades como *salmonelosis*, *shigelosis*, *amebiasis*, etc.

Los microorganismos indicadores de contaminación deben cumplir los siguientes requisitos: fáciles de aislar y crecer en el laboratorio; ser relativamente inocuos para el hombre y animales; y presencia en agua relacionada, cuali y cuantitativamente con la de otros microorganismos patógenos de aislamiento más difícil. Tres tipos de bacterias califican a tal fin:

- ✓ Coliformes fecales: indican contaminación fecal.
- ✓ Aerobias mesófilas: determinan efectividad del tratamiento de aguas.
- ✓ Pseudomonas: señalan deterioro en la calidad del agua o una recontaminación.

Desde el punto de vista bacteriológico, para definir la potabilidad del agua, es preciso investigar bacterias aerobias mesófilas y, coliformes totales y fecales.

La gran sensibilidad de las bacterias aerobias mesófilas a los agentes de los agentes de cloración, las ubica como indicadoras de la eficacia del tratamiento de potabilización del agua.

Las bacterias coliformes habitan el tracto intestinal de mamíferos y aves, y se

aracterizan por su capacidad de fermentar lactosa a 35°C. Los géneros que componen este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Todas pueden existir como saprofitas independientemente, o como microorganismos intestinales, excepto el género *Escherichia* cuyo origen es sólo fecal.

Esto ha llevado a distinguir entre coliformes totales (grupo que incluye a todos los coliformes de cualquier origen) y coliformes fecales (término que designa a los coliformes de origen exclusivamente intestinal) con capacidad de fermentar lactosa también a 44,5°C. La existencia de una contaminación microbiológica de origen fecal se restringe a la presencia de coliformes fecales, mientras que la presencia de coliformes totales que desarrollan a 35°C, sólo indica existencia de contaminación, sin asegurar su origen. Los enterococos fecales cuyo desarrollo ocurre a 35°C se usan como indicadores complementarios de contaminación fecal. La validez de todo examen bacteriológico se apoya en una apropiada toma de muestra (recipiente estéril de boca ancha y metodología precisa), y en las adecuadas condiciones de transporte desde el lugar de la fuente de agua hacia el laboratorio (refrigeración, tiempo).

El sistema de conservación de la muestra debe ser confiable, y la misma analizada inmediatamente o al cabo de un corto período entre extracción y análisis.

El análisis cuantitativo de bacterias indicadoras de contaminación en una muestra de agua puede realizarse por dos metodologías diferentes:

- ✓ Recuento directo de microorganismos cultivables por siembra de la muestra sobre o en un medio de cultivo agarizado.

- ✓ Recuento indirecto (basado en cálculos estadísticos) después de sembrar diluciones seriadas de la muestra en medios de cultivos líquidos específicos. Se considera, al cabo de una incubación adecuada, los números de cultivos «positivos» y negativos». Esta metodología se denomina «*Técnica de los Tubos Múltiples*» y los

resultados se expresan como número más probable (NMP) de microorganismos.

En nuestro caso el método más usado es por filtración sobre membrana, denominada «*Técnica de la Membrana Filtrante*».

En ella, se procede a filtrar un volumen determinado de muestra (normalmente 100 mL) a través de membranas de ésteres de celulosa generalmente con diámetro de poros de 0,45 mm para recuento total de bacterias, y para mohos levaduras una membrana de 0,88.

Posteriormente, la membrana se deposita sobre un medio de cultivo selectivo y bajo condiciones favorables (temperatura y tiempo de incubación) y sobre la membrana desarrollan colonias aisladas con aspectos característicos que permiten la identificación y el recuento.

Conociendo el volumen de muestra filtrada es posible determinar el número de UFC por unidad de volumen. La obtención de resultados confiables requiere un intercambio de nutrientes a través de los poros de la membrana, por ello se debe evitar la filtración de aguas con alto contenido de material en suspensión que pueden obstruir las membranas. Además, el número de colonias desarrolladas sobre la membrana debe ser inferior a un determinado valor (variable según los microorganismos y la composición del medio que condiciona el tamaño de las colonias) generalmente comprendido entre 80 y 100. A valores superiores, la proximidad de las colonias, puede conducir a resultados inexactos. Los medios de cultivos usados, las temperaturas y tiempos de incubación, y el color de las colonias típicas de bacterias indicadoras de contaminación se detallan en la tabla.

Microorganismos	Medio de cultivo	Temperatura y tiempo de incubación	Color de las colonias
COLIFORMES TOTALES	Endo	35°C; 24 h	Rojo con brillo metálico en superficie
COLIFORMES FECALES	FC	44,5°C; 24 h	Matices de azul
<i>Enterococcus faecalis</i>	KF	41°C; 48 h	Marrón
<i>Escherichia coli</i>	EC	44,5°C; 24 h	Blanco crema
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimida	37°C; 72 h	Verde

Medios de cultivo, temperatura, tiempos de incubación y color de las colonias de algunas bacterias indicadoras de contaminación.

La importancia de conocer las especies presentes en los sistemas acuosos naturales y el comportamiento en su ambiente, radica en la posibilidad de desarrollar nuevas tecnologías que logren su eliminación y de esta manera controlar enfermedades de origen hídrico.

2.5. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE BEBIDAS

Las bebidas por su contenido en azúcares, sales minerales y otros, pueden representar un sustrato óptimo para la colonización de diversos microorganismos si su producción no se realiza bajo las normas de calidad establecidas.

2.5.1. Agua embotellada y su calidad Bacteriológica

El agua embotellada puede ser cualquier fuente de agua potable que recibe tratamientos físicos y químicos, y que está libre de agentes infecciosos. Las fuentes pueden ser pozos profundos, deshielos de las montañas o bien el suministro municipal de agua. Como cualquier otro producto alimenticio, debe ser procesada, empacada y almacenada de manera sanitaria y libre de contaminación. Además de su uso general, ésta puede ser utilizada para la Como casi todos los productos alimenticios, el agua embotellada no es un producto libre

de microorganismos, específicamente de bacterias que se encuentra en forma natural en los suministros de agua. Si no se toman las precauciones sanitarias adecuadas, el agua embotellada puede contener bacterias, las cuales originan antes del envasado, y que después de haberse envasado, éstas se reproducen a concentraciones que podrían representar un riesgo a la salud. Se ha demostrado que las fuentes de agua pueden contener niveles de hasta 10^5 a 10^7 UFC/ml. Algunas empresas utilizan agua potable como fuente principal, y las bacterias que residen en el agua pueden aparecer en el producto final una vez que el agua es procesada.

Además, las prácticas higiénicas deficientes del personal que participa en el procesamiento del agua, aun al manejo inadecuado de los envases, dan como resultado un aumento de la población bacteriana en el producto final.

2.5.2 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES

El grupo de bacterias coliformes está conformado por dos subgrupos: los coliformes totales y los termotolerantes. A estos últimos antes se los denominaba *coliformes fecales*. El cambio de nombre se debe a que se demostró que en el grupo de coliformes que se detectaban en siembras incubadas a temperaturas de $44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en medios de cultivo específicos, sólo una parte del grupo eran bacterias de origen fecal; el resto eran bacterias ambientales. Se les puso entonces el nombre de *bacterias coliformes termotolerantes* debido a la alta temperatura de incubación ($44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) en la cual se obtenía un óptimo desarrollo.

En el grupo de bacterias termotolerantes está incluida la *Escherichia coli*, considerada como un organismo indicador de contaminación fecal. Se ha demostrado que esta bacteria siempre está presente en un número elevado en las heces de humanos y animales de sangre caliente y comprende casi 95% de los coliformes en las heces.

Por esta razón, la contaminación de origen fecal puede ser evaluada mediante la determinación de coliformes termotolerantes o mediante la presencia de *E. coli*. En los valores guía para la calidad bacteriológica del agua de bebida (OMS, 1995),

ambas determinaciones se consideran como alternativas aceptables y su presencia indica contaminación de origen fecal. Por esta razón, en los métodos descritos en el presente manual se encontrará que algunos están dirigidos a la investigación de coliformes. Se ha desarrollado una serie de métodos para la enumeración de microorganismos en muestras de agua. Los métodos usados con mayor frecuencia son los tradicionales de filtración con membrana y de Número Más Probable con tubos múltiples.

En algunos programas de vigilancia se proponen alternativas para ahorrar en material y horas de trabajo, como la prueba cualitativa de presencia-ausencia. Una vez detectada la presencia de coliformes, se efectúa un segundo muestreo con el objetivo de cuantificar el nivel de contaminación del agua.

A fines de los años ochenta se difundió el uso de medios con sustrato definido o sustrato enzimático, con los cuales se pueden detectar o enumerar selectivamente coliformes totales, termotolerantes y *E. coli*, según el método y medio de cultivo utilizado.

3. JUSTIFICACION

Tomando en cuenta las posibles fuentes de contaminación en la elaboración de bebidas se debe realizar un seguimiento para y durante la elaboración de estos.

Los posibles problemas de contaminación en las bebidas pueden ser generados por los siguientes factores:

- 1) Inadecuado saneamiento en los equipos.
- 2) Contaminación de envases.
- 3) Falta de higiene en manos de los operadores.
- 4) Tratamiento de Aguas.

3.1. SANEAMIENTO DE LOS EQUIPOS

La empresa como tal cuenta con diferentes tipos de saneamiento dependiendo de los cambios de producción que se hacen. Entre estos podemos mencionar:

- ✓ *Saneamiento Cinco pasos*: que consiste en hacer re circular por el sistema agua, Soda, agua, Cloro, agua por un lapso de 20 a 30 min cada uno y verificando la ausencia de cada uno de los pasos para pasar al siguiente.
- ✓ *Saneamiento Tres pasos*: funciona bajo el mismo criterio de cinco pasos, solo que en este caso la re circulación en el sistema se realiza con agua, soda, agua.

Cabe mencionar que cada uno de los saneamientos también se lo realizan en frío y en caliente, Y esto dependerá del tratamiento que se requiera

3.2. CONTAMINACION DE ENVASES

Las normas de calidad exigen que los productos alimenticios que salgan al mercado cumplan con todas las normas de salubridad, que los parámetros de contaminación no atenten contra la salud del consumidor. Es por esta razón que al igual que se monitorea las aguas y los jarabes para la preparación de las bebidas se deben verificar la ausencia de contaminantes en los envases.

- ✓ *Envases REPET*, son todos aquellos que una vez que salen al mercado retornan a la planta para volver a ser llenados con el producto, pero antes estos deben pasar por tres tanques en la lavadora, cada una con una cierta concentración de soda y una temperatura adecuada. Al pasar por la línea también son monitoreados por un equipo que detecta la mínima impureza en las botellas de ser así las rechaza mandándolas otra vez a la lavadora.
- ✓ *Envases PET-NR*, son aquellos que luego de ser elaborados en la planta de soplado pasan a ser enjuagados en la llenadora misma poco antes de ser llenadas, de igual manera se realiza un análisis para verificar que estos envases no estén contaminados, este análisis consiste principalmente en pruebas microbiológicas.

3.3. CONTAMINACION EN MANOS DE LOS OPERADORES

Dos veces al mes se toman muestras al azar de las manos del personal para asegurarse que estos cumplan con las normas de higiene que exige la empresa, en caso de detectarse contaminación que sobre pase los límites se tomara las medidas correspondientes.

3.4. TRATAMIENTO DE AGUAS

Aun satisfecha sus condiciones higiénicas, la necesidad de entregar al consumo aguas con características físicas inobjtables, radica en que anomalías muy acusadas de las mismas, pueden provocar desconfianza y rechazo de los usuarios, induciéndolos a recurrir a fuentes de provisión de calidad incierta, con el consiguiente riesgo para la salud, A continuación, se dan los cuadros donde se consignan los Límites Tolerables para componentes tóxicos de acción directa sobre la salud. Se han dividido para su ordenamiento en parámetros de naturaleza inorgánica y parámetros de naturaleza orgánica.

Parámetros	Unidades	Limite Tolerable
Arsénico (As)	mg/L	< 0.10 (p ₁)
Cadmio (Cd)	mg/L	< 0.005
Cromo (Cr)	mg/L	< 0.05
Cianuro (CN ⁻)	mg/L	< 0.1
Fluoruro (F)	mg/L	(ver tabla pag. 46)
Mercurio (Hg)	mg/L	< 0.001
Nitrato + Nitrito (NO ₃ ⁻)	mg/L	< 45
Nitrito (NO ₂ ⁻)	mg/L	< 0.10
Plata (Ag)	mg/L	< 0.05
Plomo (Pb)	mg/L	< 0.050 (p ₂)
Selenio (Se)	mg/L	< 0.01
Vanadio (V)	mg/L	(ver fundamentos)

Para realizar los respectivos análisis al agua se debe tener muy en cuenta el modo correcto de la toma de muestras para el análisis de aguas, además de saber la frecuencia con la que se debe realizar el muestreo. En el caso de EMBOL se

toman las muestras cada cuatro horas para tener un control efectivo sobre el tratamiento además de muestrear siempre al inicio de cada producción.

3.4.1 DUREZA

Representa la cantidad, en su mayoría de iones Ca y Mg expresados en forma de carbonatos, es necesario conocer la cantidad de estos iones en solución pues son causantes de obturaciones en las tuberías por incrustación.

- ✓ Capacidad del agua para sustituir los cationes Na^+ y K^+ de los jabones por cationes de carga múltiple, formando precipitados.
- ✓ La dureza se debe principalmente a la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} , pero también se encuentran Sr^{2+} , Fe^{3+} y Mn^{2+} .

Cabe mencionar que este control se realiza en el agua de pozo, filtros de arena, filtros de carbono y ablandador.

Para poder ejercer sobre este parámetro se cuenta con un filtro ablandador el cual contiene en su interior resinas de intercambio iónico que retienen los iones causantes de la dureza.

3.4.2 ALCALINIDAD

La alcalinidad representa de algún modo la basicidad (expresada como OH^- , HCO_3^- , CO_3^{2-}) del agua que va a ser tratada estos iones provocan la formación de precipitados.

3.4.3 TURBIDEZ

Es la falta de transparencia en el agua, debido a la presencia de partículas en suspensión, y uno de los indicadores más importantes de la calidad del agua, junto con el olor y el sabor. La turbidez es un indicador y no ofrecerá resultados sobre un contaminante concreto, pero sin embargo, puede informarnos del grado total de contaminación del agua.

3.4.4 pH

Los valores de pH miden la intensidad de la acidez y alcalinidad del agua. La escala del pH de las aguas naturales está entre 6,0 y 8,5. Si un agua tiene pH 7, está en el punto medio de la escala y se considera que es un agua con pH neutro. El valor del pH tiene importancia en los procesos de tratamiento como la cloración, la coagulación, el ablandamiento y el control de corrosión.

3.4.5 CLORO

El cloro residual libre es la cantidad de cloro que existe en el agua en forma de ácido hipocloroso o El cloro residual libre es la cantidad de cloro que existe en el agua en forma de ácido hipocloroso o en forma de ion hipoclorito, y el cloro residual combinado es el que se produce en la combinación con amonio, es decir, las cloraminas. El cloro residual combinado solo se puede formar cuando el agua tiene amoniaco y productos orgánicos. Hay que añadir que el cloro de esta forma es un agente oxidante más débil y su acción bactericida es más lenta.

En resumen, el cloro residual, tanto libre como combinado, se puede presentar de varias formas dependiendo de las características químicas del agua, cada una de ellas con mayor o menor eficacia. El cloro residual libre es la cantidad de cloro que existe en el agua en forma de ácido hipocloroso o en forma de ion hipoclorito, y el cloro residual combinado es el que se produce en la combinación con amonio, es decir, las cloraminas. El cloro residual combinado solo se puede formar cuando el agua tiene amoniaco y productos orgánicos. Hay que añadir que el cloro de esta forma es un agente oxidante más débil y su acción bactericida es más lenta.

3.4.6 CLORUROS

Se encuentran disociados en las aguas a causa de las sales que estas puedan contener

El TDS y pH no determinan las proporciones de minerales principales encontrados en las fuentes de agua potable, pero la composición mineral puede afectar su sabor. Otras causas de sabor salado o amargo pueden incluir cloruro, pH elevado (sensación resbaladiza, sabor a soda), manganeso o la presencia de sulfatos.

3.4.7 HIERRO

La presencia de metales como el hierro el cobre pueden lixiviar de las tuberías puede ser causado por la oxidación de tuberías de acero. Esta acción corrosiva disuelve el hierro en el agua mientras está reposando en las tuberías durante la noche o sin usarse durante el día. Y la presencia de este metal en las bebidas afectaría indudablemente en el sabor de las mismas.

3.4.8. SÓLIDOS TOTALES DISUELTOS

La determinación de sólidos disueltos totales mide específicamente el total de residuos sólidos filtrables (sales y residuos orgánicos) a través de una membrana con poros de 2.0 μm (o más pequeños). Los sólidos disueltos pueden afectar adversamente la calidad de un cuerpo de agua o un efluente de varias formas. Aguas para el consumo humano, con un alto contenido de sólidos disueltos, son por lo general de mal agrado para el paladar y pueden inducir una reacción fisiológica adversa en el consumidor.

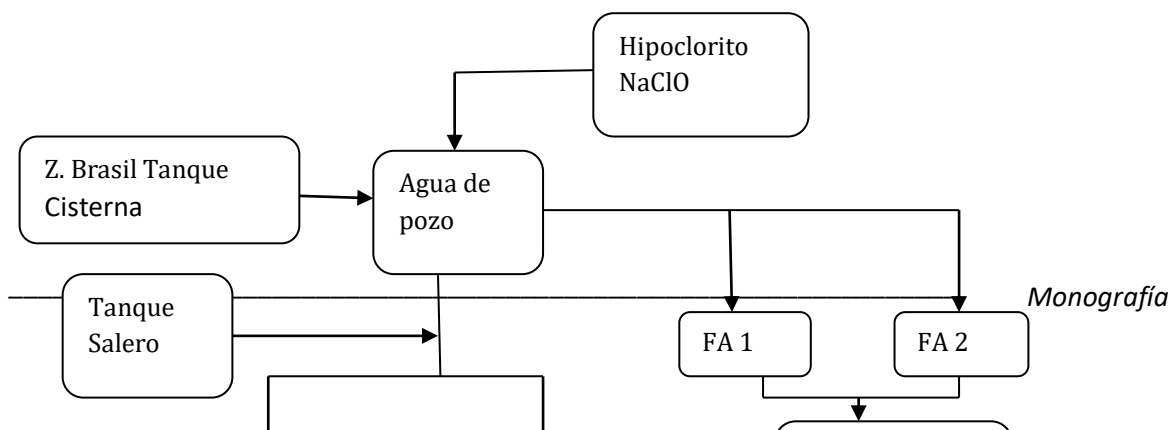
3.4.9. APARIENCIA, OLOR COLOR Y SABOR

A simple vista la apariencia del agua debe ser agradable sin ningún tipo de olor ni sabor

4. METODOLOGIA

4.1. ANALISIS EN TRATAMIENTOS DE AGUAS

Para tener un panorama de cómo está estructurado la planta de tratamiento de aguas obsérvese el siguiente Diagrama:



- **Tanque Cisterna:** que corresponde al agua de pozo, es tratada con NaClO , actúa como un desinfectante de microorganismos patógenos, su concentración debe estar entre 1-10 ppm.
- **Filtro Ablandador:** Contiene resinas de intercambio iónico, el calcio y magnesio en solución son desplazados por un ión del material sólido insoluble que constituye la resina.
- **Tanque Salero:** Contiene NaCl sobresaturado actúa como un re forzante al filtro ablandador.
- **Filtro de C4:** en este punto se realiza la Recepción el agua del filtro ablandador, hacia los lavadores calderos y compresoras.
- **Filtros de Arena:** contiene arena de diferente granulometría, su función es retener las partículas en suspensión actuando como floculante. En este punto interviene el cloruro férrico que tiene la misma función.

- **Tanque Semitratado:** mediante una presión se manda agua a los filtros de carbón 2 y 3.
- **Filtros de Carbón** contienen en su interior carbón activado que por poseer grupos funcionales en su estructura retienen los contaminantes que pudiera tener el agua donde posteriormente son pasados a los pulidores y finalmente a las líneas.

De cada uno de estos puntos se toma una muestra y se realiza los respectivos ensayos mencionado en el punto 3.4.

4.2 ANALISIS MICROBIOLÓGICO

La planta de EMBOL como tal cuenta con cuatro líneas de producción, cada una de estas con un tipo específico de formato.

LÍNEA	Nº Válvulas	Tipo de producción
L-1	90	REPET, Vidrio, NR
L-2	108	REPET, Vidrio, NR
L-3	32	Bebidas Sencibles
L-4	140	PET - NR

- **Línea L-1.-** Esta línea cuenta con noventa válvulas de llenado, quiere decir que en un cierto tiempo que depende del formato que se está produciendo esta línea llena noventa botellas.

- **Línea L-2.-** Su función de trabajo es la misma que la de L-1, con la diferencia de que un cierto tiempo ésta llena 108 botellas. En esta línea solo se llenan envases de vidrio motivo por el que la lavadora funciona todo el tiempo.
- **Línea L-3.-** Esta línea se caracteriza específicamente para llenar productos sensibles el enjuague cambia según la producción para las bebidas POWER ADE se usa ácido peracético y para las aguas se usa agua blanda.
- **Línea L-4.-** Esta es la última línea con la que cuenta la planta de EMBOL, es la más sofisticada ya que tiene incorporada su línea de soplado de envases y la producción de ambos es paralela, además de contar con 140 válvulas y una mayor velocidad de llenado.

A cada una de las líneas de producción se le realiza un seguimiento, en este caso microbiológico, en los diferentes puntos de recorrido tanto del agua tratada como del jarabe para en caso de haber contaminación tomar medidas en el punto correspondiente.

4.2.1 PRUEBA DE DETECCIÓN DE ATP

*** *Bioluminiscencia-BIO TRACE***

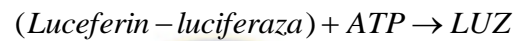
La bioluminiscencia es una técnica basada en la detección del ATP, molécula energética de todos los organismos vivos. Es un fenómeno natural que ocurre en muchas algas y bacterias acuáticas así como en la luz producida en las luciérnagas.

La prueba de detección de ATP, es un dispositivo de un solo uso donde se utiliza un hisopo para obtener muestras de superficies, el hisopo está prehumedecido con una sustancia catiónica para facilitar la obtención de residuos de suciedad y de trifosfato de adenosina (ATP) procedente de células intactas. Como el ATP es un compuesto presente en todos los organismos vivos, animal, plantas incluyendo gran número de alimentos, bacterias, hongos y otros microorganismos la cantidad de ATP puede ser usada como indicador de la cantidad de tales sustancias sobre las superficies de contacto

proporcionando así una medida de su estado de limpieza y de la eficiencia de los procesos de limpieza.

- **Reacción del Hisopo (Clean Trace)**

El hisopo contiene una enzima *Luceferin-luciferaza* en forma de píldora dentro de un compartimiento sellado y al entrar en contacto esta enzima con el ATP emite luz que es detectada con un mini espectrofotómetro.



La intensidad de la luz es proporcional a la cantidad de ATP y por tanto al grado de contaminación existente.

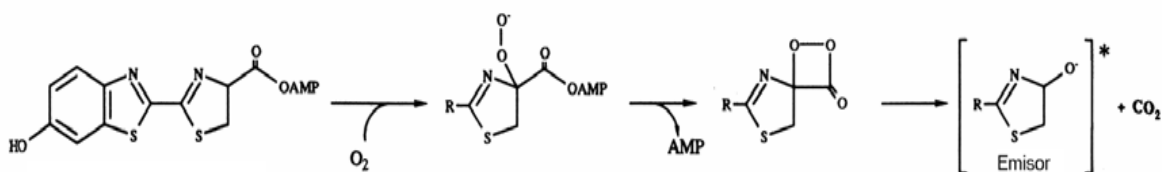
La forma de toma de muestras se puede ver (ANEXO A Figura 4)



Mecanismo de Reacción

Es una reacción química en la cual es necesaria la presencia de una proteína denominada luceferina, la enzima catalizadora luciferasa, oxígeno molecular y ATP (Adenosin trifosfato, sustancia capaz de generar energía necesaria para que se de la reacción y que se encuentra presente en los organismos vivos.

El proceso es llevado a cabo cuando una enzima denominada genéricamente **Luciferasa** que en presencia de O_2 transforma un sustrato orgánico con numerosos dobles enlaces denominado genéricamente **Luceferina** en un producto excitado que emite luz al volver a su estado básico.

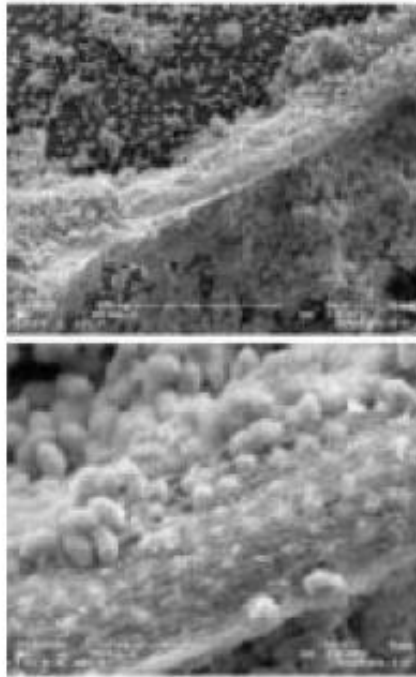


En este caso la luceferina es un compuesto Benzotiazol que reacciona enzimáticamente con ATP para dar un derivado luceferil-adenilato que es el que reacciona con el oxígeno dando lugar a AMP y a un compuesto cíclico que al liberar CO_2 se transforma en el producto emisor de luz

4.2.2. PRUEBA DE DETECCIÓN DE BACTERIAS PRECURSORAS DE BIOFILM

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. (Ver figura 5 en Anexo A)

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias

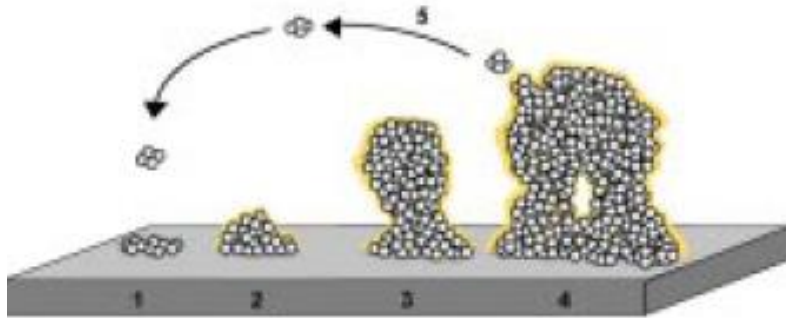


1. Fotografía de microscopia de barrido de un biofilm de *Salmonella enteritidis*.

ETAPAS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DEL BIOFILM

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie. En bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que los flagelos, son importantes para la etapa de adherencia primaria⁶. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilm. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie en esta primera etapa de adherencia primaria. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas (*mushrooms*) entre las cuales se observa la presencia de canales.



Esquema mostrando las etapas en el proceso de formación de biofilm

La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio aire al que se ha denominado "Pellican".

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. La liberación de las bacterias desde el biofilm es el proceso que menos se conoce. Otra alternativa descrita en *S. aureus* consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para el proceso de formación del biofilm¹⁰. En *Actinobacillus actinomicetecomitans* se ha descrito una actividad

enzimática, denominada dispersina que degradan de forma específica el exopolisacárido de la matriz del biofilm.

La presencia en distintos genomas de hipotéticas proteínas (endoglucanasas), que podrían ser responsables de una función similar, sugiere que la degradación controlada del exopolisacárido puede representar un mecanismo controlado de liberación de bacterias del biofilm.

4.2.3. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES EN AGUAS

4.2.3.1 Método de filtro de membrana

La técnica de filtro de membrana se fundamenta en la filtración de un volumen determinado de muestra (100 mililitros o volúmenes menores según la densidad bacteriana esperada) a través de un filtro de membrana de 0,45 micrómetros de diámetro de poro, el cual es colocado sobre un medio de cultivo específico y luego incubado a la temperatura adecuada. Con 2 mililitros de medio m-Endo ó agar m-Endo o agar Endo (para coliformes totales) y 2 ml de medio PYR para coliformes termo tolerantes.

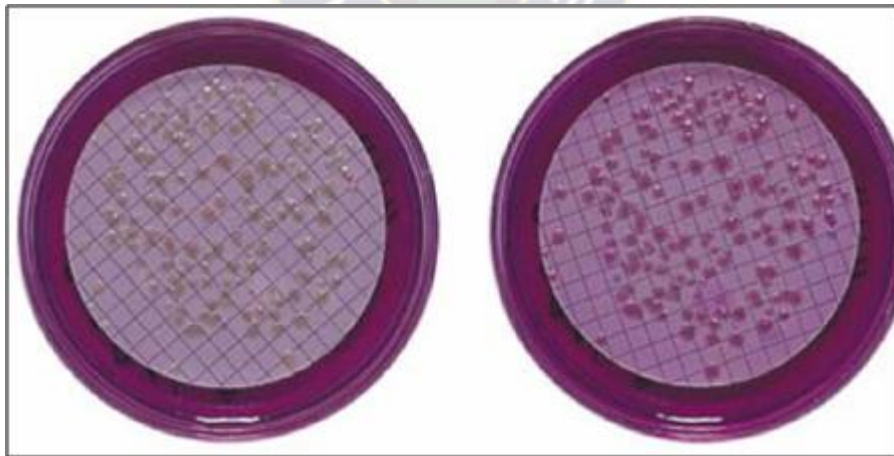
Procedimiento

- 1) Preparar el mesón de trabajo y colocar sobre la mesa de trabajo el material necesario para ejecutar el análisis. Preparar el sistema de filtración Colocar un matraz de seguridad entre la bomba de vacío y el matraz que sostiene el porta filtros. (El porta filtros debe estar estéril y frío.)
- 2) Preparar las placas. Identificar las placas con lápiz de vidrio o tinta indeleble en el área externa de la base. Si se trabaja con caldo selectivo estéril, abrir la placa de petri estéril con una pinza esterilizada al fuego y colocar una almohadilla o *pad*.
- 3) Con una pipeta estéril, agregar 2 mililitros de caldo selectivo: medio m-Endo para coliformes totales y medio PYR para coliformes termo tolerantes. Si se decide trabajar con agar, distribuir con una pipeta estéril entre 3 y 5 mililitros

del agar licuado (a 45 °C aproximadamente) a la placa de petri estéril. Taparla y dejar solidificar el medio antes de proceder al análisis.

- 4) Retirar la parte superior del porta filtros y, con una pinza previamente flameada al mechero y fría, colocar un filtro de membrana estéril, con la cara cuadrículada hacia arriba y en el centro de la parte superior del porta filtros.
- 5) Acoplar la parte superior del porta filtros, teniendo cuidado de no dañar la membrana.
- 6) Para comprobar la esterilidad del filtro, verter cuidadosamente en el porta filtros 100 mililitros de agua de dilución estéril. El volumen de agua destilada se medirá en el mismo embudo si este es graduado. También se puede medir en una probeta estéril. Conectar a la bomba de vacío y proceder a la filtración.
- 7) Retirar la envoltura de papel del frasco con la muestra.
- 8) Homogeneizar la muestra, agitar un número no menor de 25 veces, inclinando el frasco y formando un ángulo de 45° entre el brazo y el antebrazo.
- 9) Verter 30 mililitros de agua destilada estéril con el fin de humedecer la membrana. Verter 100 mililitros de la muestra de agua. Filtrar. Después de la filtración de la muestra, enjuagar el portafiltros tres veces con porciones de 20-30 mililitros de agua de dilución estéril, para evitar la retención de alguna bacteria en las paredes internas. Evitar que se seque la membrana. Apagar la bomba de vacío al finalizar la operación.
- 10) Separar la parte superior del portafiltros y, con una pinza previamente flameada y fría, retirar la membrana cuidando de que la pinza toque apenas la parte periférica, fuera del área de filtración. Acoplar nuevamente la parte superior del porta filtros a la parte inferior.
- 11) Teniendo cuidado de no contaminar el filtro de membrana, colocarlo cuidadosamente con la superficie cuadrículada hacia arriba, sobre la almohadilla embebida en el medio de cultivo o directamente sobre el agar, si fuera el caso.

- 12) Verificar que no se formen bolsas de aire entre la membrana y la almohadilla con el medio de cultivo o la superficie del agar. Si esto ocurre, levantar uno de los bordes del filtro de membrana con una pinza estéril y, haciendo movimientos circulares, deslizarlo con la finalidad de eliminar las bolsas, pues ellas impiden el contacto de las bacterias con el medio de cultivo, y así se dificulta o evita su crecimiento.
- 13) Tapar la placa de petri, verificar la identificación de la placa con el número de la muestra, dilución y fecha de siembra. Colocarla en forma invertida; es decir, con la tapa hacia abajo.
- 14) Lavar nuevamente el filtro con agua de dilución estéril y proceder a la siguiente filtración. Los portafiltros deben estar estériles en el inicio de cada serie de filtraciones. Si hubo un intervalo de 30 minutos entre una filtración y otra, los portafiltros deben ser esterilizados nuevamente, para evitar la contaminación accidental.
- 15) Incubar las placas de petri colocándolas en posición invertida; para el caso de los coliformes totales (placas con medio m-Endo, agar m-Endo o agar Endo), La incubación será a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 horas.



4.2.3.2 Método de presencia-ausencia con sustrato enzimático

Esta prueba es un procedimiento simplificado para la determinación simultánea de enzimas de coliformes totales y *E. coli* en agua destinada al consumo humano. La *E. coli* es un organismo indicador de contaminación fecal y su determinación

reemplaza a la de coliformes termotolerantes. La inclusión de un sustrato hidrolizable cromogénico (productor de color en presencia de enzimas de coliformes) y otro fluorogénico (productor de fluorescencia en presencia de enzimas de *E. coli*) permite la detección de bacterias coliformes totales y de *E. coli*.

El método de presencia-ausencia con sustrato enzimático es una alternativa para la determinación cualitativa de coliformes totales y *E. coli*. No requiere previo enriquecimiento ni posterior confirmación y es más simple y económico que las técnicas tradicionales de tubos múltiples y filtración con membrana, que son pruebas cuantitativas.

Este método está aceptado por el Standard Methods (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999) como una alternativa para el análisis cualitativo de los coliformes totales y *E. coli* en muestras de agua potable y agua de origen subterráneo.

Para una muestra:

- ✓ Sustratos enzimáticos para coliformes totales (orto-nitrofenil-B-D galactopiranosido (ONPG) (rojo de clorofenol-B-D-galactopiranosido (CPRG).

- ✓ El sustrato enzimático para *E. coli*: (4-metilumbeliferil-B-D-glucoronido (MUG).

Para la detección simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* se puede utilizar la prueba de sustrato enzimático. En este caso el grupo de coliformes totales se define incluyendo todas las bacterias que presentan la enzima beta-D-galactosidasa, que hidroliza el sustrato cromogénico (por ejemplo, ONPG) liberando el cromógeno. Como *E. coli* se incluyen todas las bacterias que dan positiva la reacción de coliformes totales y que tienen actividad beta-glucuronidasa, que rompe el sustrato fluorogénico (por ejemplo, MUG) que se revela al UV.

Este método permite llevar a cabo tanto recuentos como ensayos de ausencia/presencia.

Principio

Se basan en la capacidad de los coliformes para producir la enzima b – galactosidasa y *E. coli* para producir la enzima b - glucuronidasa.

El sustrato para b - galactosidasa con Colilert es O - nitrofenil - b - D galactopiranosido (ONPG) y con Colisure es clorofenol rojo b - D - galactopiranosido (CPRG). Cuando ONPG (Colilert) es hidrolizado por b - galactosidasa se produce un color amarillo (O - nitrofenil). Cuando el CPRG (Colisure) es hidrolizado por b - galactosidasa, se produce un color rojo o magenta (clorofenol rojo). El desarrollo del color amarillo con Colilert y rojo o magenta con Colisure, indica la presencia de coliformes totales.

Y en este, para la determinación cualitativa de la presencia de coliformes se utiliza colilert, que nos indica la presencia o ausencia de las bacterias por la producción de un color amarillo.

Procedimiento analítico

- 1) Homogeneizar la muestra vigorosamente.
- 2) Desinfectar o limpiar la boquilla que contiene la muestra
- 3) Adicionar el reactivo con sustrato enzimático.
- 4) Cerrar otra vez el frasco y mezclar hasta que la mezcla se vuelva uniforme. Agitar en forma horizontal y evitar
- 5) Incubar las botellas en $35 \pm 0,5$ °C por 24 horas. Para el control de esterilidad del medio, incubar un frasco de medio estéril y continuar el procedimiento como si se tratara de una muestra. El resultado debe ser negativo.
- 6) Proceder a la lectura. Para el caso de coliformes totales, observar el cambio en el color del medio. Si la botella es positiva para coliformes totales, verificar la presencia de *E. coli* con una lámpara de luz ultravioleta de 366 nanómetros de longitud de onda en un ambiente oscuro.

4.2.3.3 RECUENTO TOTAL DE BACTERIAS

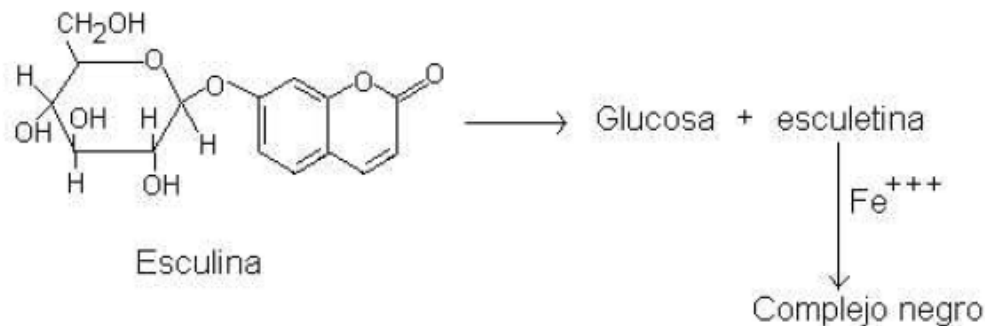
Para realizar un recuento total de bacterias en una muestra se utiliza un medio tal que pueda servir como base para que cualquier tipo de bacteria se desarrolle y forme su colonia. Y en este caso los medios de cultivo más utilizados son Caldo m-TGE TROTH que se usa principalmente cuando se trabaja por el método de filtración en membrana, por otro lado si se desea trabajar por el método de siembra en profundidad se usa PLATE COUNT AGAR , en este caso las bacterias sustraerán los nutrientes del medio para formar las colonias, es común encontrar variedad de colores de colonias luego de la incubación.

Siembra en Profundidad

Con una pipeta estéril se toma un ml de la muestra y se lo coloca en una caja petri a esta se le añade medio agar, se deja enfriar a temperaturas menores a 45 grados para posteriormente incubar a temperaturas de 35 grados.

4.2.4 DETERMINACION DE ENTEROCOCOS POR PRUEBA CON BILIS ESCULINA

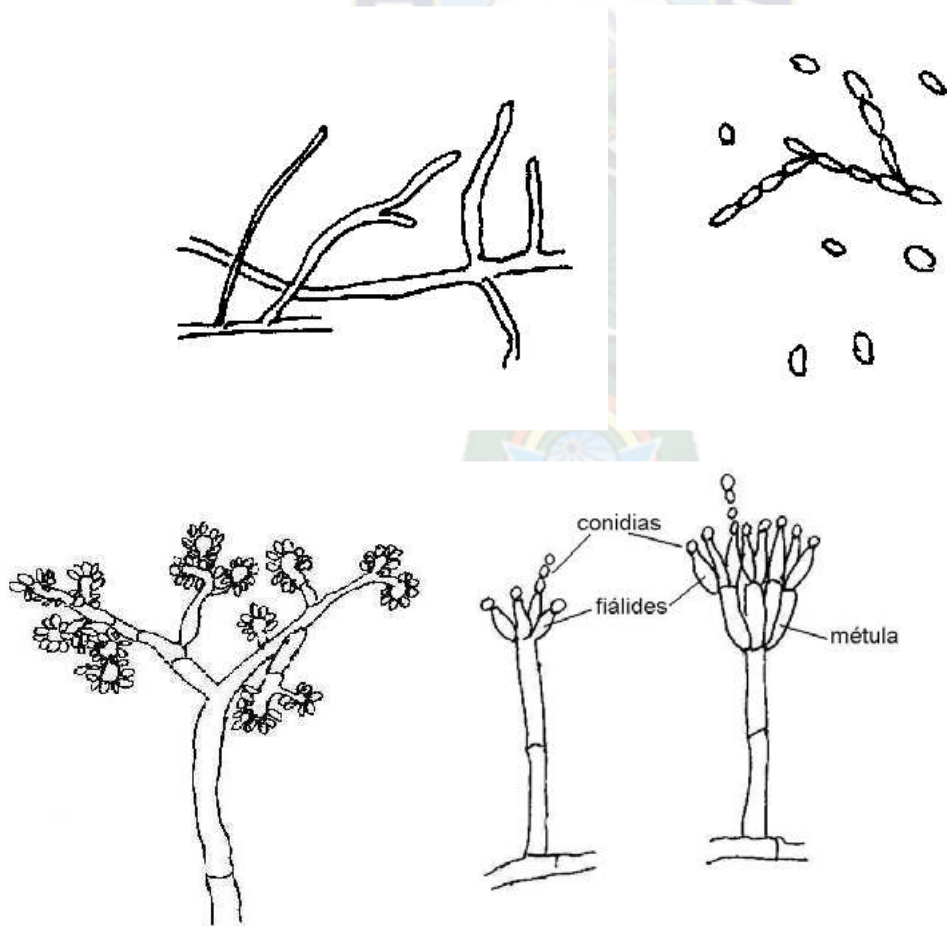
La prueba de la bilis-esculina está basada en la capacidad de ciertas bacterias, particularmente los enterococos, de hidrolizar la esculina en presencia de bilis al 4%. La esculina es, químicamente, un derivado de la cumarina (6-b-glucósido-7-hidroxycumarina), que por su estructura pertenece a los glucósidos. Por definición, éstos están constituidos por dos restos unidos por un puente de oxígeno. En el caso de la esculina, uno de los restos es una glucosa y el otro la 7-hidroxycumarina (que no es un hidrato de carbono, y es denominado aglucona).

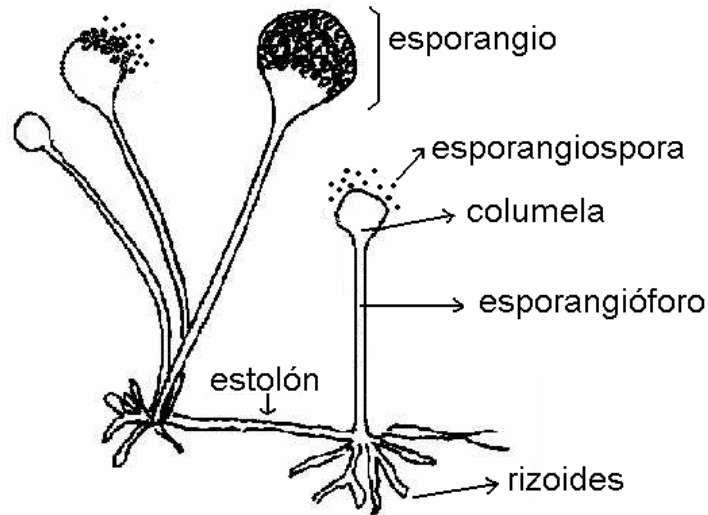


Las bacterias capaces de crecer en presencia de bilis a esa concentración y también de hidrolizar esculina, producen glucosa y esculetina (7,7 dihidroxicumarina) y ésta puede visualizarse en un medio con una sal de hierro, por formación de un complejo marrón oscuro o negro. Algunos medios bilis-esculina incluyen también azida sódica para inhibir el desarrollo de organismos Gram negativos.

4.2.5 VERIFICACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS

Los hongos constituyen un grupo muy heterogéneo de organismos eucariotas, heterótrofos no fotosintéticos y con pared celular. Basándose en la apariencia macroscópica de la colonia se pueden diferenciar dos tipos de hongos: si producen colonias opacas, cremosas o pastosas se denominan levaduras; si producen crecimientos aéreos, velludos, algodonosos o pulverulentos se llaman hongos filamentosos o mohos.





La verificación de la ausencia de Mohos y Levaduras se realiza a todas las muestras de agua, también a las bebidas gaseosas e hidratantes y como medios de cultivo se pueden utilizar m-GREEN AND HOLD BROTH DEHYDRATED cuando se realiza el método de filtración en membrana y SABOROD GLUCOSADO AGAR cuando se trabaja por el método de siembra en profundidad.

Especificaciones microbiológicas para la muestra

- ✓ Recuento de mesófilos aerobios viables
- ✓ Recuento de hongos y levaduras
- ✓ Recuento de Enterobacterias
- ✓ Ausencia de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp*

Al hacer el análisis de las aguas no buscamos tal o cual microorganismo patógeno, es decir, no aislamos o identificamos los microorganismos patógenos del agua, sino que averiguamos si esta tiene o no contaminación de origen fecal.

1.2. LIMPIEZA Y DESINFECCION

La higiene y sanitización es muy importante en todas las industrias procesadoras de alimentos porque garantiza que los procesos de elaboración y el producto final posean una alta calidad microbiológica.

Los sistemas de limpieza más comúnmente utilizados en la industria son: la limpieza manual y el sistema de circuito cerrado en el sitio que en sus siglas en inglés se la conoce como CIP (Clean In Place).

La operación de limpieza en las envasadoras de bebidas gaseosas es realizada para eliminar sustancias residuales y microorganismos que pueden estar presentes al finalizar la producción de un lote.

Sistemas de limpieza y sanitización

Actualmente las envasadoras utilizan los siguientes métodos de limpieza y desinfección:

Limpieza Manual: Se desarmen las tuberías de las líneas de producción y se las cepilla interiormente. Un trabajador entra en los tanques de almacenamiento de producto y las limpia con un cepillo, soluciones de detergente y agua tratada. Por lo general, se lo realiza en envasadoras muy antiguas y se demora aproximadamente tres horas.

Limpieza por Inundación: Se llenan las tuberías, las llenadoras y tanques con soluciones detergentes y desinfectantes altamente concentrado superior al 5 %, durante 5 a 8 horas, para garantizar una buena desinfección. Luego, se realiza un enjuague con agua a temperatura ambiente por una hora más.

Limpieza en circuito cerrado CIP: Esta limpieza consta de varias etapas.

1. **Pre-Enjuague:** Remueve gran cantidad de residuos de poca adherencia (espuma, levadura, etc.) y se utiliza agua a temperatura ambiente (20 – 25 °C). durante unos 5 a 10 minutos.
2. **Limpieza Alcalina:** El objetivo de este proceso es remover el residuo de mayor adhesión (espuma seca, taninos, resinas de lúpulo, etc.); se usan soluciones de

hidróxido de sodio al 2.5 % para trabajar a temperaturas de 60-80 ° C. Si no alcanza esta temperatura se usan concentraciones mayores al 5 %. El tiempo de limpieza es de 45 a 60 min.

3. Enjuague Intermedio: Remueve el residuo detergente con agua potable caliente mayor a 80 °C, Dura de 30 a 40 minutos.

4. Limpieza Ácida: Este paso se realiza cada mes para remover residuos inorgánicos, como piedra de cerveza e incrustaciones dadas por la dureza del agua. Generalmente se usan soluciones de ácido nítrico y/o ácido fosfórico en concentraciones 1 – 2 %. El tiempo de limpieza es de 30 min. a temperatura ambiente.

5. Post-Enjuague: Remueve los residuos del detergente ácido, con agua a temperatura ambiente y dura de 5 – 10 min.

6. Desinfección: Elimina la población microbiana al nivel aceptable o a las especificaciones de calidad e higiene de la industria de bebidas gaseosas y generalmente también se la realiza antes de iniciar la producción. Se puede utilizar agua caliente o un sanitizante químico que puede ser cloro, amonio cuaternario o compuestos yodados. En ambos casos, el tiempo de desinfección es de 15 min.

7. Enjuague Final: Es la eliminación total del residuo desinfectante y se debe utilizar agua fresca de muy buena calidad microbiológica.

Parámetros microbiológicos (1)	Valor paramétrico
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC/100 ml
Enterococos	0 UFC/100 ml
<i>Clostridium perfringens</i> (incluidas las esporas)	0 UFC/100 ml
Parámetros indicadores (2)	Valor paramétrico
Recuento de colonias a 22°C	100 UFC/ml
Coliformes	0 UFC/100 ml

(1) Parámetros de obligado cumplimiento.

(2) En el caso de incumplimiento de estos parámetros, la autoridad sanitaria valorará la calificación del agua como "apta o no apta para el consumo humano" en función del riesgo para la salud.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo que se viene realizando en EMBOL en el aseguramiento de calidad prueba que la empresa va cumpliendo con los requerimientos exigidos por las Normas de salubridad dando una certeza de que los productos que ofrecen al mercado no causan daño ni atentan contra la salud. En cuanto a los ensayos que se realizan Normalmente estos muestran resultados favorables dando como negativo en casi todas las ocasiones.

Se realiza un seguimiento constante a las bebidas hidratantes ya que por el mismo hecho de que estas no contienen CO₂, su tendencia a contaminación es mayor a las bebidas carbonatadas.

pH.- Se pudo Verificar experimentalmente que el pH del medio es un factor importante que afecta el crecimiento de los microorganismos. Teniendo todas las especies un rango de pH optimo en el cual se produce un crecimiento acelerado. Un pH fuera de rango puede dañar la membrana celular, OH⁻ / H⁺ penetran en el citoplasma desnaturalizando enzimas y ácidos nucleicos provocando la muerte celular.

Por lo tanto el pH es muy útil para controlar algunas bacterias pero no sirven para controlar a los mohos y las levaduras ya que estas crecen en medios más ácidos.

MICROORGANISMO	MINIMO	OPTIMO	MAXIMO
Bacterias	4,5	7	9
Levaduras	3	4,25	8,5
Hongos	2	3,25	9

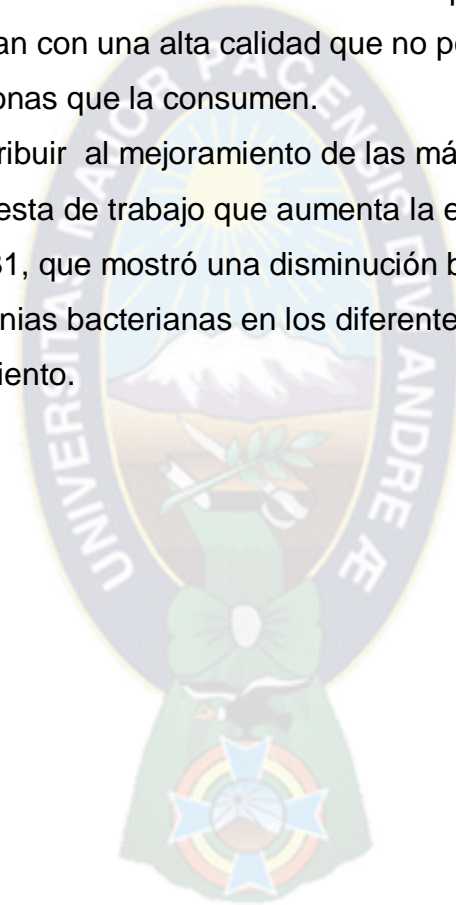
Carbonatación.- por efecto del CO₂ en la inhibición del crecimiento, se disminuye el pH del citoplasma, se inhibe la actividad de la membrana celular, inhibe las síntesis de enzimas y las reacciones enzimáticas en el citoplasma.

6. CONCLUSIONES

Cada uno de los ensayos para la verificación de las especificaciones exigidas por las Normas de salubridad, contribuye al aseguramiento de la calidad con que un producto sale al mercado.

Específicamente el área de microbiología juega un papel muy importante ya que gracias a las pruebas que se realizan pueden detectarse hasta las mínimas falencias en cuanto a la ineficiencia de la limpieza y saneamiento en la producción. Se tiene la certeza máxima de que los productos elaborados cuentan con una alta calidad que no pone en riesgo alguno a la salud de las personas que la consumen.

Con el fin de contribuir al mejoramiento de las máquinas dispenser se realizó una propuesta de trabajo que aumenta la eficacia bactericida del Sanitizante SU 331, que mostró una disminución bastante considerable de formación de colonias bacterianas en los diferentes puntos en donde se realiza el saneamiento.



7. REFERENCIAS

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 1992. FAO Year Book. Vol 46. Roma: FAO.
- Reed, G, TW Nagodawithana. 1991. Yeast Technology, 2ª edición. Nueva York: Van Nostrand Reinhold.
- Sobolov, M, DM Booth, RG Aldi. 1985. Whisky. En Comprehensive Biotechnology, dirigido por M Moo- Young. Oxford: Pergamon Press.
- Tomoda, S. 1993. Evolución reciente de las industrias de la alimentación y de la bebida. Sectoral Activities Programme Working Paper. Ginebra: OIT.
- Larrañaga Idelfonso, Carvallo Julio, Rodríguez Ma Del Mar y Fernández José; Control e higiene de los alimentos, Editorial Mc Graw Hill, España, 1999
- El proceso de limpieza propuesto trabaja con temperatura externa menor a 25°C lo cual evita el crecimiento descontrolado de microorganismos en el exterior de la envasadora
- Senser Friedrich y Scherz Heimo; Tablas de composición de alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España, 1999
- El compuesto de limpieza propuesto es totalmente biodegradable ya que los ácidos se enjuagan y neutralizan fácilmente en el efluente, debido a que la mayoría de los desechos de las empresas embotelladoras son de carácter alcalino.
- Singh R. Paul y Heldman Dennis; Introducción a la Ingeniería de los Alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España, 1998

- Wildbrett Gerhard; Limpieza y Desinfección En La Industria Alimentaria, Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España, 2000
- El sistema propuesto presenta acción biostática protectora porque permite que no se sature la solución y dando mayor ahorro con el re-uso de las soluciones, que son almacenadas en los tanques CIP (interna), manteniendo una pureza y no disminuye su función.
- Yousef Ahmed E. y Carlstrom Carolyn; Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio, Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España, 2006
- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, New York, (1992).
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, (1994).
- F.H. Chapelle, Ground-Water Microbiology and Geochemistry, John Wiley, New York, (1993).
- H.L. Ehrlich, Geomicrobiology, Marcel Dekker, New York, (1996).
- H.J. Glynn y G.W. Heinke, Ingeniería Ambiental, Prentice Hall, México, (1999).
- Guías para la Calidad del Agua Potable, Vol. 3, Publicación Científica N° 58, Organización
- Panamericana de la Salud, Washington, (1988).
- M.T. Madigan, J.M. Martinko y Parker J. Broca, Biología de los Microorganismos, Prentice Hall, Madrid, (2004).

- J. Rodier, Análisis de las aguas, Omega, Barcelona, (1989).
- H.G. Schlege, General Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, (1987).
- F.A. Skinner y J.M. Shewan, Aquatic Microbiology, Academic Press, New York, (1977).
- BRANDA SS, VIK S, FRIEDMAN L, KOLTER R. Biofilms: the matrix revisited.
- Trends Microbiol 2005; 13: 20-26.



8. ANEXOS



Figura 1. Sala de paletizado

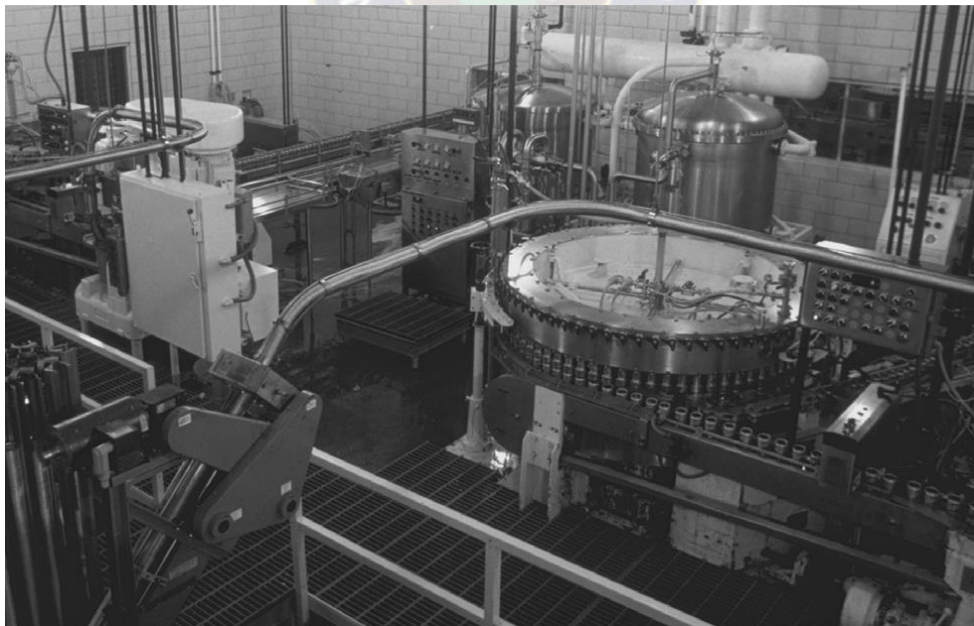


Figura 2. Sala de llenado

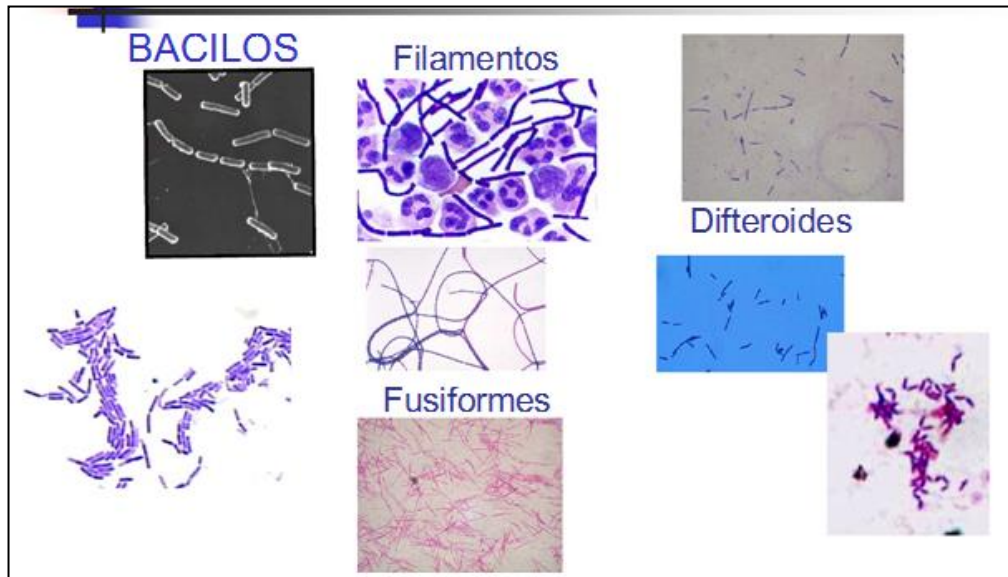


Figura 3a: Morfología de Bacterias

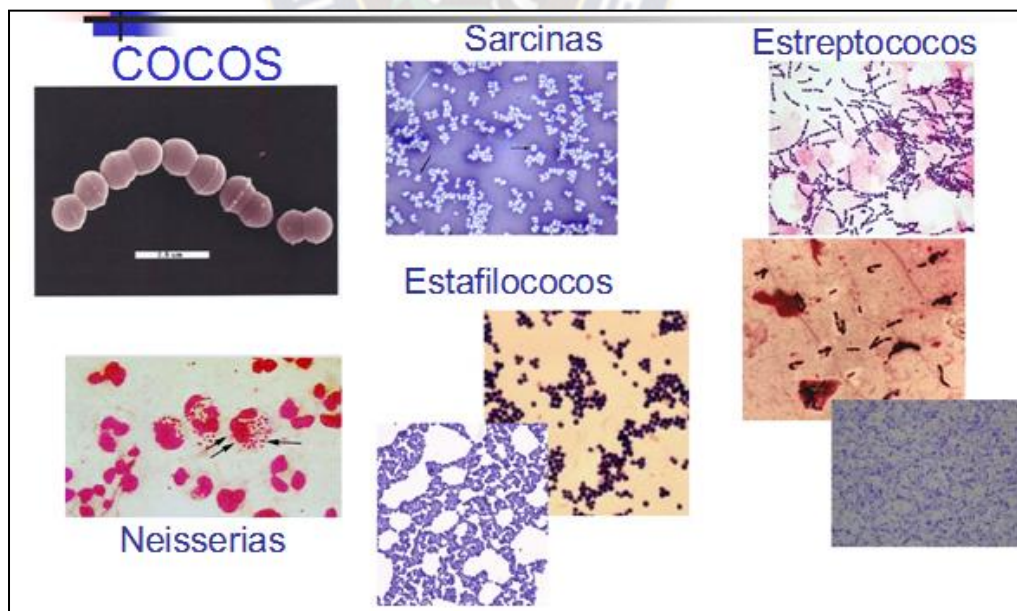


Figura 3b: Morfología de Bacterias

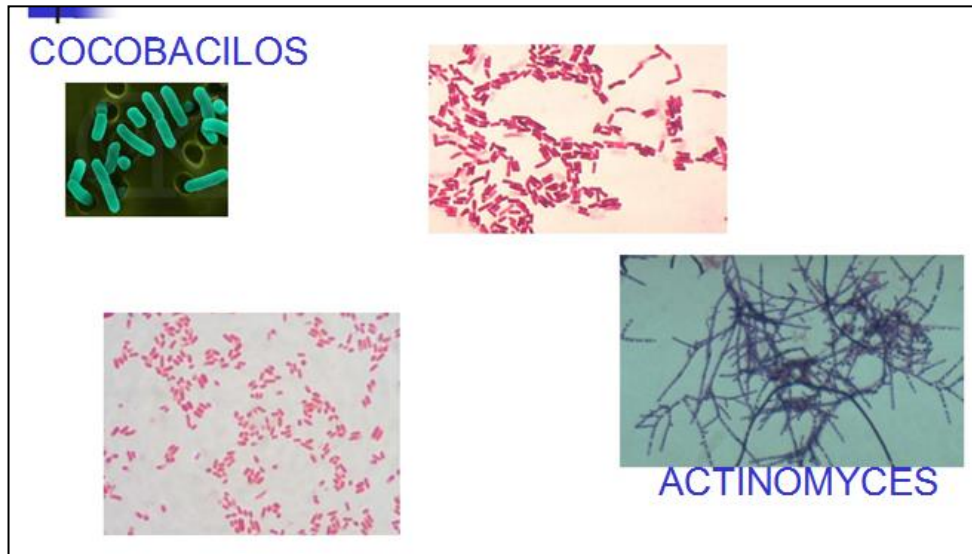


Figura 3c: Morfología de Bacterias



Figura 4. Toma de muestras para la prueba de ATP

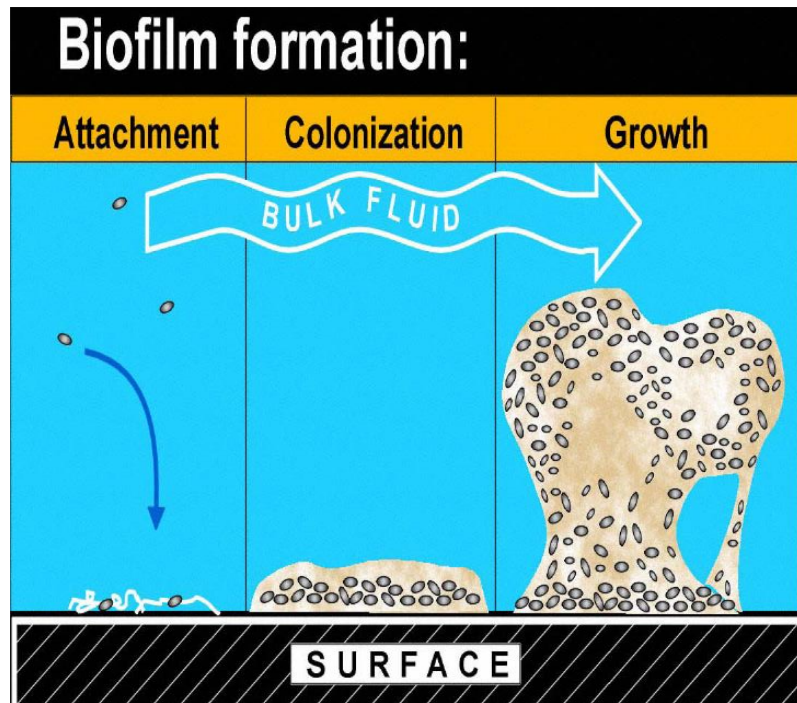
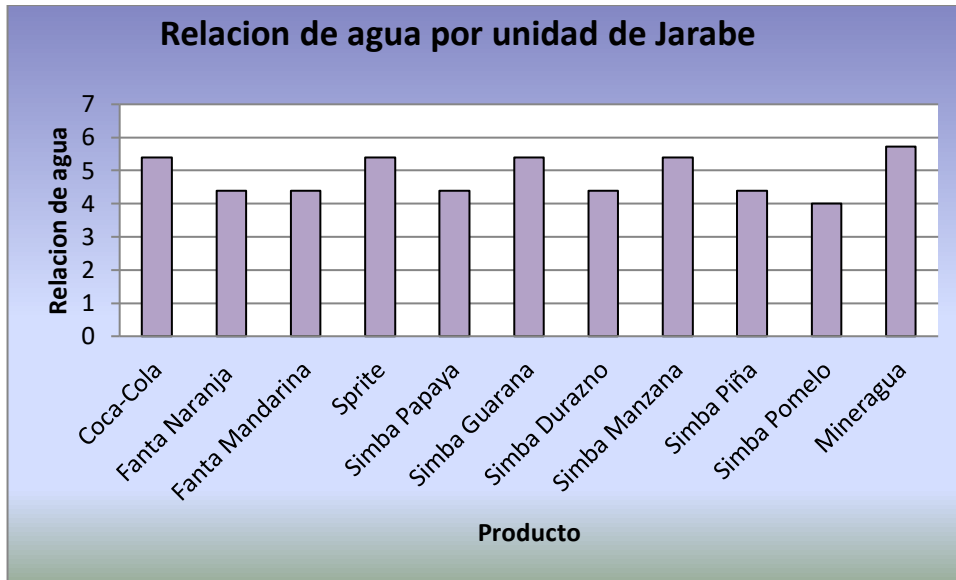
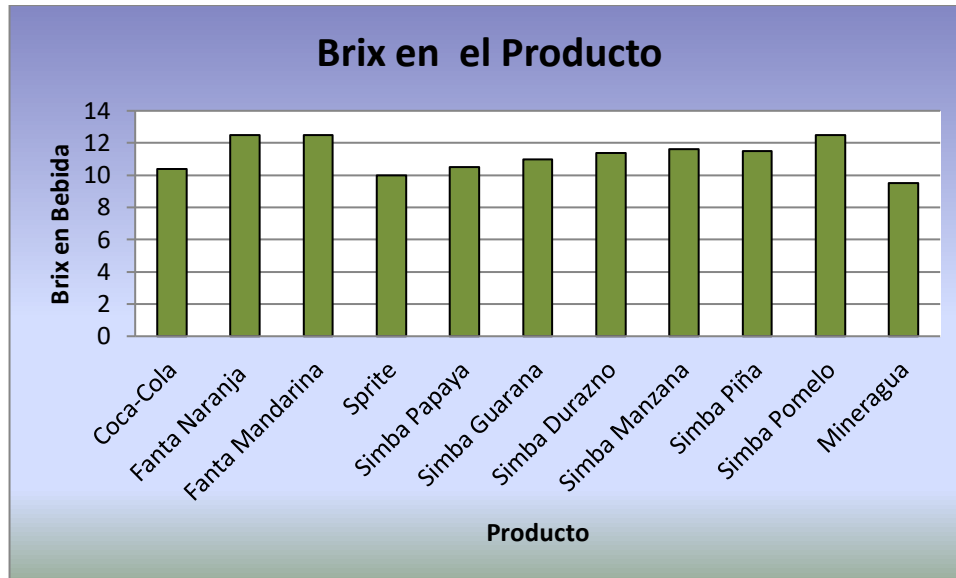


Figura 5. Esquema de Formación de biofilm





ANEXO B

Propuesta de saneamiento como contribución al saneamiento de maquinas dispenser.

En algún momento se mencionó los procesos de saneamiento que viene realizando la planta por el mantenimiento del equipo y a la vez asegurar la limpieza de los diferentes procesos, esto dentro de la planta. Existen lugares de consumo en los supermercados denominados *Dispenser* el cual también es sometido a un saneamiento periódico y con el fin de hacer un aporte a la institución se planteo una opción de saneamiento en base a un sanitizante (SU 331) que recientemente adquirió la empresa, esta propuesta se detalla a continuación:

Tomando en cuenta las características y composición del producto: “Limpiador alcalino clorado” (SU331) se determinó la razón de su efectividad como un agente bactericida, principalmente por su contenido de cloro.

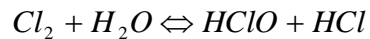
COMPONENTES
Hipoclorito de sodio NaHClO
Hidroxido de sodio NaOH
Hidroxido de potasio KOH
Tripolifostato de sodio
Agua

Información técnica	
PARAMETRO	CARACTERISTICAS
Aspecto	Líquido
Color	Amarillento
Densidad (g/ml) a 20°C	1,175
pH (solución al 1% a 20°C)	12
Cloro	3,75
Alcalinidad libre como Na ₂ O	7,8
DQO	<5 g O ₂ /Kg
Contenido de Nitrógeno (N)	No contiene
Contenido de Fósforo (P)	<2 g/kg

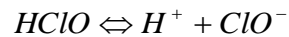
Para esto es que se trato de buscar las condiciones adecuadas para potenciar al máximo su efectividad, esto está relacionado con las reacciones químicas que puede presentar el cloro en el medio en el que se encuentra.

Formas de cloro que actúan como agente Bactericida

De acuerdo a la química del cloro, dependiendo del medio en el que se encuentre este puede sufrir diferentes reacciones, y finalmente llegar a un equilibrio químico.

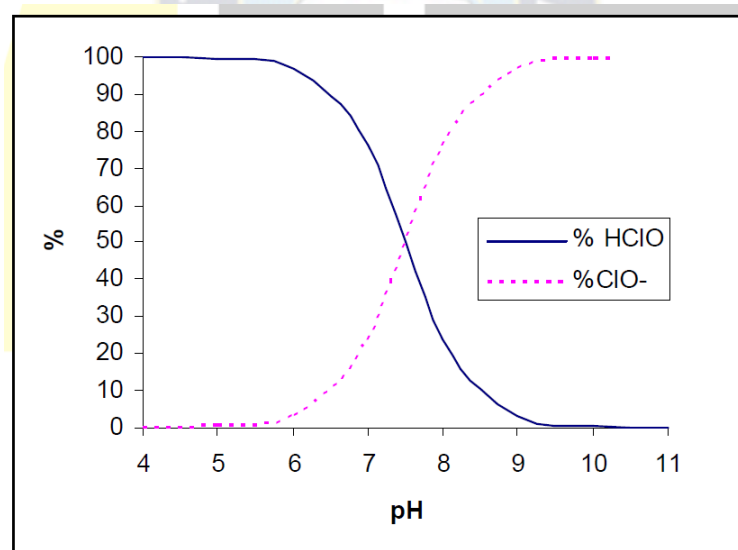


En cualquiera de los casos: cloro, hipoclorito sódico e hipoclorito cálcico, se acaba formando ácido hipocloroso, que es realmente la especie desinfectante. No obstante, éste se disocia según el siguiente equilibrio:



Equilibrio que es regido por una constante ($K_a=3.2 \cdot 10^{-8}$), que expresada matemáticamente nos permite observar la distribución de cada una de las especies en función del pH.

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{ClO}^-]}{[\text{HClO}]}: \text{ Expresión que se reduce a lo siguiente } \Rightarrow pK_a = \text{pH} - \log \frac{[\text{ClO}^-]}{[\text{HClO}]}$$



El ácido hipocloroso es un desinfectante mucho más eficaz que el ión hipoclorito, este hecho podría estar relacionado con la inexistencia de carga en la molécula de ácido hipocloroso. Al ser una molécula neutra, le sería más fácil penetrar la pared bacteriana con la consiguiente actividad bactericida.

A partir de este hecho, y teniendo en cuenta lo visto hasta ahora, es fácil entender la diferente actividad del hipoclorito como agente bactericida a diferentes valores

de pH. Así, a pH por debajo de 7.5 la cantidad de hipoclorito para desinfectar un agua es mucho menor que la necesaria para esa misma agua a pH superior a 7.5

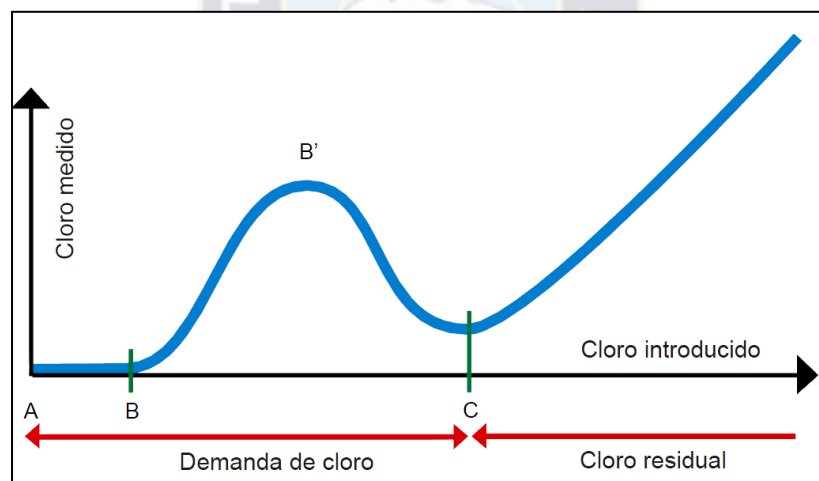
Comportamiento del Cloro en el medio

Al mezclar el sanitizante con agua, por su presencia en NaClO se irán produciendo sucesivamente diversas reacciones Químicas.

AB: El cloro introducido en el agua se combina con la materia orgánica que pueda haber en el medio.

BB: A partir del punto B, el cloro se combina con compuestos nitrogenados si es que existen en el medio.

Entonces ya se puede medir una cantidad de cloro residual, que no corresponde realmente al cloro activo, en esta etapa puede haber reacción con compuestos que generen olores.



C, el cloro introducido está finalmente disponible para cumplir su función de desinfectante.

PROPUESTA DE TRABAJO

Saneamiento Línea de Jarabes (para un tanque con capacidad de 20L)

- 1) Agua

- 2) Sanitizante SU 3331, que por su presencia en álcali nos ayudara a remover los restos de sacarosa que pudieran haberse caramelizado en el sistema.
- 3) Agua, para eliminar los restos de hidróxido del sanitizante SU 331, posteriormente determinar la ausencia del producto con fenolftaleína como indicador de este punto.
- 4) Hipoclorito de sodio en un medio ácido, para asegurar la formación de HClO y efectivizar la actividad anti-bacteriana, durante un tiempo determinado
- 5) Agua en la eliminación de restos anteriores, utilizar como reactivo indicador –DPD

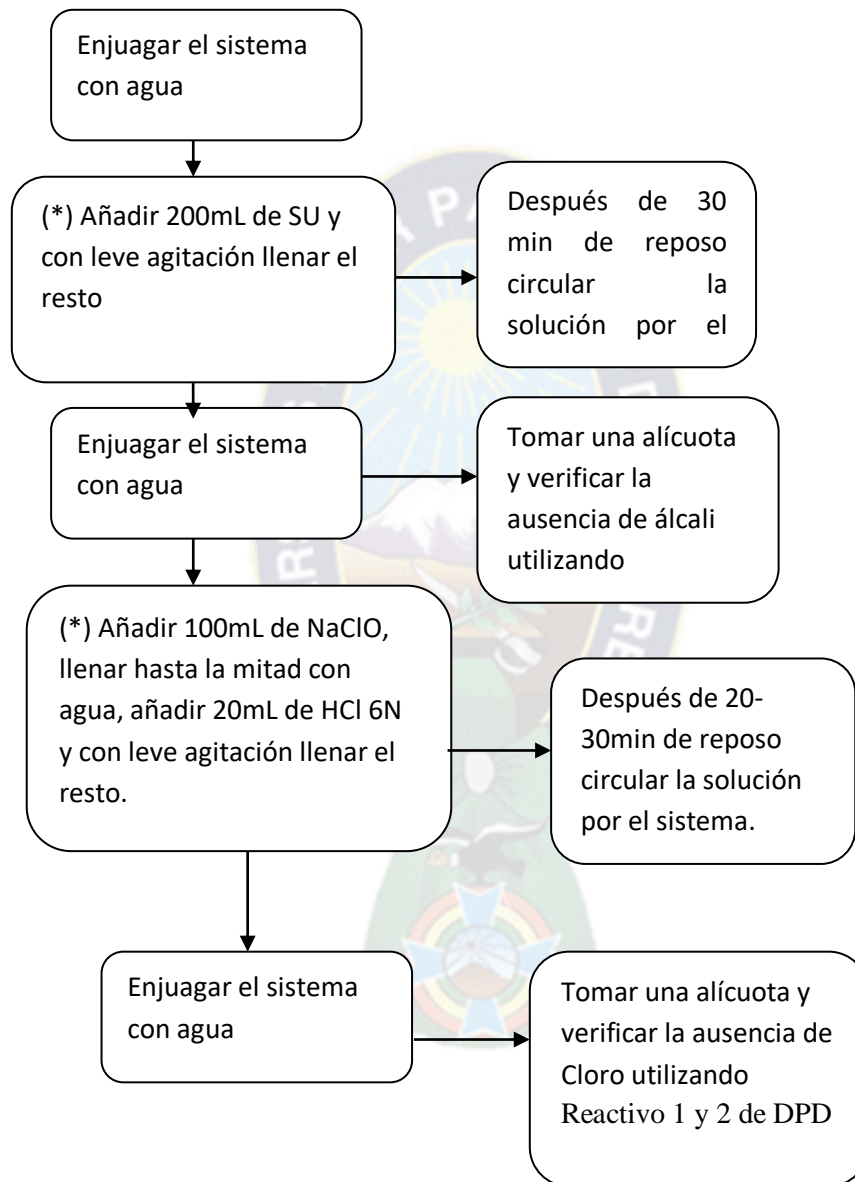
PASO	FUNCION	PROPORCIONES UTILIZADAS	INDICADOR UTILIZADO	TIEMPO DE APLICACIÓN
1	Enjuague de restos en el sistema	El volumen requerido por el sistema	No aplica	Hasta agotar el volumen del recipiente o cilindro.
2	Remoción de azúcares, mantener en suspensión partículas sólidas.	Solución de Soda Cáustica $\geq 1\%$ Opcionalmente utilizar Solución acuosa al 1 % del sanitizante SU 331	No aplica	30 minutos en el sistema.
3	Enjuague del sanitizante y restos de partículas	El volumen requerido por el sistema	Fenolftaleína,	El necesario para asegurarse de haber eliminado el sanitizante

removidas				
4	Formación de HClO como antibactericida	NaClO con adición de solución de HCl al 0.1 % (Proporcionado por el laboratorio)	Ninguno	De 20 a 30 minutos
5	Enjuague de restos del hipoclorito	El volumen requerido	Reactivo 1 y 2 de DPD	Hasta que el indicador nos asegure la ausencia de cloro.



Flujo grama de la Propuesta

Saneamiento Línea de Jarabes (para un tanque con capacidad de 20L)



Saneamiento Línea de Agua

1. Agua
2. Hipoclorito de sodio en un medio ácido, para asegurar la formación de HClO y efectivizar la actividad anti bactericida, durante un tiempo determinado.
3. Agua, para eliminar los restos de hipoclorito

PASO	FUNCION	PROPORCIONES UTILIZADAS	INDICADOR UTILIZADO	TIEMPO DE APLICACIÓN
1	Enjuague de restos en el sistema	El volumen requerido por el sistema	ninguno	Hasta agotar el volumen del recipiente o tanque del sistema.
2	Formación de HClO como antibactericida	NaClO con adición de solución de HCl al 0.1 % (Proporcionado por el laboratorio)	ninguno	20 minutos en el sistema.
3	Enjuague de restos del hipoclorito	El volumen requerido por el sistema	Reactivo 1 y 2 de DPD	Hasta que el indicador nos asegure la ausencia de cloro

Saneamiento Línea de Aguas (para un tanque con capacidad de 20L)