

Magaly Rodríguez Saavedra

**Revisión del género *Pectinatus* spp. en cervecería y propuesta de un medio de
detección en superficies.**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Dirigido por Gemma Beltran y María Jesús Torija

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultad de Enología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

12 de junio del 2016

**Revisión del género *Pectinatus* spp. en cervecería y propuesta de un medio de
detección en superficies.**

Autor: Magaly Rodríguez Saavedra

Dirección: Av. Lluís Companys N° 5 Tarragona 43005 - España

e-mail: Magaly.Rodriguez@estudiants.urv.cat

Palabras claves: bacterias ácido lácticas, anaerobios estrictos, bacterias alterantes,
biopelículas, *Pectinatus*, hisopado.

Revisión del género *Pectinatus* spp. en cervecería y propuesta de un medio de detección en superficies.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
I. Revisión del Género <i>Pectinatus</i> en cervecería	
1. Descubrimiento de las especies de <i>Pectinatus</i>	4
2. Taxonomía del género <i>Pectinatus</i>	5
3. Efectos alterantes a la cerveza	5
4. Características generales de las especies alterantes	7
5. <i>Pectinatus</i> spp., un agente emergente	10
6. Lugares de aislamiento en la cervecería	11
7. Mecanismos de supervivencia de <i>Pectinatus</i> spp. en biopelículas	13
8. Tipos de productos potencialmente alterables por <i>Pectinatus</i>	14
9. Métodos de detección de <i>Pectinatus</i> spp. dependientes de cultivo	15
II. Propuesta de método de detección de <i>Pectinatus</i> spp.	
1. Problemática de la detección de <i>Pectinatus</i> spp.	19
2. Objetivo	21
3. Materiales y Métodos	21
4. Resultados	24
5. Discusión	26
6. Conclusiones y Perspectivas	28
Agradecimientos	29
Referencias Bibliográficas	30
Anexos	38

RESUMEN

Hay un pequeño grupo de bacterias alterantes de la cerveza, no patógenas, que pueden sobrevivir, crecer y alterar la cerveza. Son muy pocos los casos de deterioro reportados en los últimos años debido a los altos niveles de higiene; pero el riesgo se ha incrementado por los avances tecnológicos. Debido a las regulaciones estrictas en materia de inocuidad de alimentos y bebidas y al deseo de mantener una buena imagen de la marca, los microorganismos alterantes de la cerveza son de grave preocupación para las fábricas de cerveza de todo el mundo.

Las bacterias alterantes de la cerveza, anaerobias estrictas, pertenecientes a los géneros *Pectinatus* y *Megasphaera* son las más difíciles de detectar debido a su naturaleza anaerobia; sin embargo existe la necesidad de detectarlas, incluso un único microorganismo viable en la cerveza. Desde el punto de vista preventivo, para evitar consecuencias no deseables en el producto terminado, esta necesidad se centra en su detección en las superficies de la cervecería.

Basados en esta necesidad se ha realizado una revisión del género *Pectinatus* en el mundo cervecero, incluyendo los métodos de detección dependientes de cultivo. Se propone el uso de un medio de cultivo, basado en el medio MRS-T para el análisis de superficies en la cervecería.

ABSTRACT

There is a small group of nonpathogenic bacteria that can survive, grow and spoil the beer. Very few cases of beer spoilage have been reported in recent years due to high levels of hygiene; but the risk has increased by technological advances. Due to the strict regulations on food safety and the desire to maintain a good brand image, the beer spoilage microorganisms are a serious concern to the breweries worldwide.

Genera *Pectinatus* and *Megasphaera* are the most difficult beer spoilage bacteria to detect due to their anaerobic nature; however there is a necessity to detect, even though a single viable microorganism in beer. From the prevention point of view in order to avoid undesirable consequences in the final product, the detection of *Pectinatus* on the brewery surfaces is one of the main necessities.

Based on this necessity, a revision of the genus *Pectinatus* in brewing has been made, including its detection by culture dependent methods. The use of modified medium based on MRS-T medium for surface analysis in the brewery is proposed.

INTRODUCCIÓN

La cerveza ha sido reconocida como una bebida con alta estabilidad microbiológica, de hecho sólo un número limitado de especies microbianas han sido capaces de alterarla ⁽¹⁾. Se han descrito propiedades intrínsecas de la cerveza que le permite ser estable microbiológicamente. Primeramente, tiene un bajo pH (3.8-4.7) ⁽²⁾, que facilita la entrada de ácidos orgánicos débiles en las células, lo que lleva a la acidificación intracelular, la destrucción de los sistemas enzimáticos, la reducción en la absorción de nutrientes, resultando en un metabolismo agotado. El contenido de etanol varía de 0.5% a 10% v/v, y típicamente está entre 3,5-5% v/v ⁽³⁾, aunque a la fecha también existe en el mercado cervezas sin alcohol o con contenido de alcohol < 0.5% v/v. En general se acepta que el alcohol causa daño a la membrana celular de las bacterias por una rápida desnaturalización de las proteínas, interfiriendo con el metabolismo, causando posteriormente lisis celular ⁽⁴⁾. Se ha demostrado que la exposición a 5% (v/v) de etanol, aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana, permitiendo un mayor paso de los protones al citoplasma, dejándolas incapaces de mantener un pH homeostático ⁽³⁾. La presencia de ácidos amargos del lúpulo (17-55 ppm de iso- α -ácidos) ⁽²⁾, son tóxicos especialmente para bacterias Gram positivas, aunque existen bacterias resistentes ^(1,5). De acuerdo con una serie de estudios, se encontró que los iso- α -ácidos actúan como ionóforos e inhiben el crecimiento de las bacterias sensibles al lúpulo, por disipación completa del gradiente de pH transmembrana, que es un componente importante de la fuerza motriz de protones, para generar energía (ATP) e interviene en el transporte de nutrientes ⁽⁶⁾. El alto contenido de CO₂ (aproximadamente 0.5% w/v) ^(1,2,5), que desde hace más de cien años se conoce su efecto inhibitor sobre el crecimiento de las bacterias; aunque el mecanismo no está aún del todo comprendido, los posibles mecanismos son la modificación de la membrana celular, la disminución del pH intracelular y la consecuente inhibición del metabolismo celular, la inactivación enzimática, trastorno del equilibrio de electrolitos intracelulares, y la separación de constituyentes vitales de las células y las membranas celulares ⁽⁷⁾. Se suman los bajos niveles de nutrientes, la presencia de sólo trazas de azúcares fermentables, debido a que la glucosa, maltosa, maltotriosa, algunas vitaminas B, amino ácidos, ya han sido consumidos por la levadura durante la fermentación ^(3,5); la presencia de bajos niveles de oxígeno en la cerveza (menos de 0.1-0.3 ppm) ^(1,5), si bien puede afectar el desarrollo de bacterias aerobias, podría facilitar el desarrollo de bacterias microaerófilas y/o

anaerobias. Sumado a ello existen factores extrínsecos e inherentes al proceso cervecero que reducen la posibilidad de contaminación, como el calor aplicado durante el macerado, la ebullición del mosto que destruye células vegetativas y sus esporas ⁽³⁾, la filtración, la pasteurización (túnel o flash), el envasado aséptico y el almacenamiento en frío ⁽⁸⁾. En el anexo 1, se resumen los factores implicados y sus modos de acción.

Aunque las razones expuestas parecen ser suficientes para que la cerveza sea microbiológicamente estable, hay una estrecha gama de bacterias alterantes de la cerveza que todavía pueden sobrevivir, crecer y alterar la cerveza ⁽⁹⁾. Siendo ésta más susceptible, cuando uno o más de los factores mencionados están ausentes o presentes a un nivel reducido. Así, se ha observado que las cervezas con niveles elevados de pH, bajo etanol, bajo CO₂, y aquellos con azúcar añadido (aumento de nutrientes) son más propensos a la contaminación ⁽¹⁰⁾. Las bacterias alterantes de la cerveza se encuentran en el anexo 2. Estas bacterias se pueden clasificar en bacterias Gram positivas, Gram negativas y además existen las levaduras extrañas.

Las bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* representan los principales grupos de microorganismos causantes de deterioro de la cerveza ⁽¹¹⁾. Esto afecta la calidad de la cerveza, con detrimento financieros para la industria ⁽¹⁰⁾.

Entre las bacterias Gram positivas se incluyen a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*. Las bacterias Gram negativas pueden ser anaeróbicas como *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* y *Zymophilus* y aeróbicas o anaerobias facultativas como *Acetobacter*, *Zymomonas*, *Selenomonas* y *Obesubacterium*, entre las principales. ^(12, 13)

Levaduras extrañas como *Torulaspora*, *Pichia*, *Hansenula*, entre otras ⁽¹⁴⁾, casi no causan graves problemas de deterioro; pero pueden interferir sensorialmente.

Por lo tanto muchos microorganismos pueden afectar el proceso cervecero. En el anexo 3 se muestra la microbiota que podría estar presente en cada proceso de la elaboración de la cerveza ⁽¹⁵⁾.

Este trabajo se basa en la revisión actualizada del género *Pectinatus* spp. y de los métodos de detección por análisis microbiológicos por cultivo o llamados convencionales, y pretende dar un propuesta de su detección en superficies por el método de hisopado.

I. Revisión del Género *Pectinatus* en cervecería

1. Descubrimiento de las especies de *Pectinatus*

Pectinatus sp. fue registrada como bacteria alterantes de la cerveza en los años 60's del siglo XX. Entre los años 1978 y 1980, se dio a conocer el aislamiento de una bacteria capaz de crecer en cerveza lupulada, gram negativa, mesofílica, de forma bacilar flagelada, no formadora de esporas, estrictamente anaeróbica; proponiéndose el género y especie de *Pectinatus cerevisiophilus* ⁽¹⁶⁾. Esta detección se llevó a cabo en una cervecería de los EE.UU, en cerveza no pasteurizada durante un test de estabilidad en estante a 30°C ⁽¹⁷⁾, posteriormente también se aisló en cervecerías de Finlandia ⁽¹⁸⁾, Alemania, Noruega, Japón, España, Países Bajos, Suecia, Francia ^(19, 20, 21) y Escandinavia ⁽²²⁾.

En 1990 con el uso de técnicas moleculares para la época, se logró identificar una segunda especie, a la cual denominaron *Pectinatus frisingensis*. Esta difiere de *P. cerevisiophilus* en base a la velocidad de crecimiento y la utilización de sustratos. *P. frisingensis* usa celobiosa y N-acetilglucosamina como sustratos adicionales de crecimiento y presenta diferencias significativas en la composición del peptidoglucano de la pared celular y en la secuencia de 16S rRNA ⁽²²⁾. Además los lipopolisacáridos difieren en la estructura de sus oligosacáridos “core” y en su contenido de ácidos grasos ^(23,24).

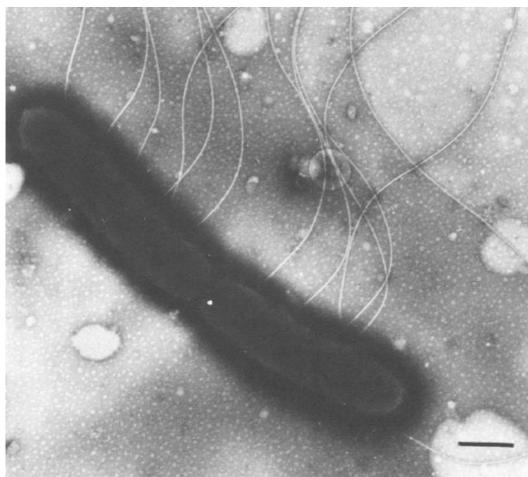
En el 2006, aislaron una cepa en Finlandia, del aire del salón de envasado y de cerveza lager con 2.7% de alcohol ⁽²⁵⁾, con diferencias en la utilización de azúcares, actividad proteolítica, actividad catalasa, resistencia antibiótica y tolerancia a la temperatura, comparada a las especies anteriores, a la cual denominaron *Pectinatus haikarae*, la misma que ha sido aislada de cerveza alemana contaminada ⁽¹⁸⁾.

Estas son las tres especies del género *Pectinatus*, que a la fecha se ha confirmado ser alterantes de la cerveza y han sido aisladas sólo de ambientes cerveceros ^(16, 22, 18), pues *Pectinatus* está muy bien adaptado al medio cervecero ⁽²⁰⁾.

En el 2009, otra especie del género *Pectinatus* fue aislada de salmueras de aguas residuales en China, ampliando los hábitats conocidos de los miembros del género, denominándolo *P. brassicae* ⁽²⁶⁾. Y, en el año 2013 se aisló de un tanque de salmuera comercial deteriorado a *P. sottacetoni* ⁽²⁷⁾. Sin embargo ninguna de estas dos últimas han sido detectadas en cerveza contaminada naturalmente.

2. Taxonomía del Género *Pectinatus*

Desde el año 2010, el género *Pectinatus* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Negativicutes*, orden *Selenomonadales*, familia *Veillonellaceae* ⁽²⁸⁾.



La figura 1 muestra a la bacteria *Pectinatus* sp. en forma de bacilo con muchos flagelos, situados sólo a un lado de la célula bacteriana ⁽²⁹⁾. El número de flagelos por célula depende del tamaño de la célula y su estado, pero oscila generalmente de 1 a 23 o más ⁽³⁰⁾.

Fig.1: Microscopía electrónica de *Pectinatus* sp. La barra es de 0.5 µm.

Sobre la base de experimentos de reactividad cruzada de anticuerpos flagelares, ⁽³⁰⁾ *P. cerevisiiphilus* descendería de *P. frisingensis*, (a pesar que fue descubierto previamente). *P. haikarae*, que es capaz de crecer a temperatura ligeramente más baja que las otras especies de *Pectinatus*, divergiría de *P. cerevisiiphilus* como resultado de una mejor aclimatación al entorno cervecero ⁽³¹⁾. *P. haikarae* es catalasa positiva a diferencia de las otras dos, lo que podría proporcionar una mejor supervivencia en ambientes cerveceros aeróbicos ⁽³²⁾.

3. Efectos alterantes a la cerveza

Los productos finales del metabolismo de *Pectinatus* spp. son extremadamente desagradables, y su crecimiento en la cerveza, incluso en conteo $<10^6$ ufc/ml, hace que sea imposible beberla ⁽³⁰⁾, por los defectos sensoriales producidos, que hacen que el producto no sea apto para el consumo ⁽¹⁷⁾. Un resumen de sus productos metabólicos se muestra en la siguiente tabla 1 ^(18, 22, 33, 34, 35).

Ocurrencia en ambientes cerveceros	Off flavour/olor	Efectos dañinos visuales	Sabor	Productos Metabólicos
Cerveza con bajo alcohol o sin alcohol, cerveza no pasteurizada, área de llenadora, biofilm.	Olor que recuerda a huevos podridos, olor desagradable, olor fétido y a podrido.	Turbidez/ densa turbidez. Sedimentación gruesa y opalescencia.	Sabor ácido	Acidos: acético, propiónico, láctico, succínico, oxálico. H ₂ S, acetoína, metil mercaptano. Dimetil sulfuro - DMS

Tabla 1: Efectos alterantes y productos metabólicos de *Pectinatus* spp.

Se puede encontrar en la cerveza contaminada hasta 80, 13 y 290 $\mu\text{g/L}$ de metilmercaptano, sulfuro de dimetilo y H_2S , respectivamente. Estos tres niveles son iguales o superiores a los umbrales de percepción ⁽³⁰⁾. También se ha observado una gran cantidad de ácido propiónico, a menudo superior a 1000 mg/L en cerveza contaminada ⁽³⁶⁾. Sin embargo, las cantidades relativas de los productos finales mencionados son dependientes del sustrato utilizado. Los defectos sensoriales están relacionados principalmente a propionato, H_2S y metilmercaptano ⁽³⁷⁾. La tabla 2 muestra las cantidades encontradas de componentes sulfurados, luego del desarrollo de *Pectinatus* en medio de cultivo y en una cerveza contaminada naturalmente, así como sus umbrales de percepción ⁽³⁸⁾.

	Culture medium	Contaminated beer	Taste threshold
Methyl mercaptane	14 - 80	20	1 - 3
Dimethyl disulphide	1.3 - 13.0	0.4	5 - 20
Dimethyltri-disulphide	0.5 - 2.8	0.1	0.1
Hydrogen sulphide	20 - 290	300	5 - 30

Tabla 2: Concentraciones de componentes sulfurados en $\mu\text{g/L}$

Esta bacteria incrementa la acidez de la cerveza. Una comparación entre las cantidades de los ácidos orgánicos que se encuentra en las cervezas normales y en cervezas contaminadas con *Pectinatus* spp. se muestra en el anexo 4.

El producto en mal estado e imbebible no sólo se traduce en pérdidas económicas, sino también es perjudicial para una marca de cerveza si se descubren los potentes defectos sensoriales por el consumidor ⁽³⁹⁾. La cerveza contaminada se vuelve turbia dentro de 2-14 días dependiendo del número inicial de células y el tipo de las condiciones de almacenamiento de la cerveza ⁽⁴⁰⁾.

El tipo de distribución de la contaminación de la cerveza, por *Pectinatus* sp., tiene características específicas: no contaminada todo el lote, sólo algunas unidades al azar (la contaminación se produce principalmente a través del aerosol durante el envasado de la cerveza); el crecimiento de bacterias (turbidez) puede no ocurrir hasta varias semanas después de la contaminación, cuando la cerveza ya está en el mercado; en casos extremos puede conducir a una explosión debido a la

acumulación de gas en la botella ⁽⁴⁰⁾. Se estima que esta bacteria es causante entre 20-30% de cervezas contaminadas ⁽⁴¹⁾.

4. Características generales de las especies alterantes de *Pectinatus*

Las diferencias principales entre las especies alterantes de *Pectinatus*, se resumen en la siguiente tabla 3 ^(18, 26, 27, 31, 32, 38).

Características	<i>P. cerevisiiphilus</i>	<i>P. frisingensis</i>	<i>P. haikarae</i>
Hábitat	cerveza contaminada	cerveza contaminada	salón de envasado, cerveza contaminada
Contenido G+C	38,6	39,1	38,4
Rango Temperatura (°C)	10 - 45	15-37	15 - 30
Temperatura óptima	30	30	20-30
Crecimiento a 37°C	Positivo	Positivo	Negativo
Rango de pH	3,5-8,5	3,5 - 8,0	4,0 - 8,0
pH óptimo	6,5	6,5	7
Actividad catalasa	Negativa	Negativa	Positiva
Habilidad dañina	Absolutamente dañino	Absolutamente dañino	Potencialmente dañino
Producción de ácidos			
<i>D-celobiosa</i>	Negativo	Positivo	Negativo
<i>i-inositol</i>	Negativo	Positivo	Positivo
<i>lactosa</i>	Negativo	Negativo	Positivo
<i>α-D-melibiosa</i>	Positivo	Negativo	Positivo
<i>N-acetil-glucosamina</i>	Negativo	Positivo	Negativo
<i>D-salicina</i>	Positivo	Positivo	Negativo
<i>D-xilosa</i>	Positivo	Negativo	Positivo
<i>glicerol</i>	Positivo	Negativo	Negativo
<i>aesculina</i>	Positivo	Positivo	Negativo
<i>mannosa</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>manitol</i>	Negativo	Positivo	Positivo
<i>sucrosa</i>	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 3: Características generales de las especies de *Pectinatus* alterantes de la cerveza.

El movimiento de las células jóvenes se asemeja a la letra “X”, lo cual es debido a la disposición inusual de los flagelos. Las células más viejas y más largas tienen un movimiento de "serpiente" a medida que avanzan, o puede que no se muevan en absoluto ^(29, 16, 18, 22, 27). Las descripciones de las especies de *Pectinatus* alterantes de la cerveza, se encuentran en los anexos 5, 6 y 7.

P. frisingensis puede metabolizar un amplio rango de azúcares fermentables; pero no puede utilizar etanol, maltosa y amino ácidos esenciales ⁽²²⁾. Sin embargo la mayoría de los aislados de *P. frisingensis* en cervecerías japonesas fueron capaces de crecer en maltosa ⁽⁴³⁾.

P. frisingensis sobrevivió a un cambio repentino de temperatura, enfriamiento de 30 °C a 2 °C, restableciendo rápidamente su homeostasis celular alterada, cuando se les proporcionó una fuente de carbono ⁽⁴⁴⁾. También recupera su homeostasis en caso de tratamiento térmico suave ⁽⁴⁵⁾. Individualmente, las especies difieren unas de otras en cuanto a su sensibilidad a elevadas temperaturas. *P. frisingensis* tiene mayor resistencia térmica que *P. cerevisiophilus* ⁽⁴⁶⁾. Se sabe que *Pectinatus* muere por encima de 50 °C ⁽⁴⁷⁾. Un estudio indica que a 58°C por un minuto es suficiente para su muerte ⁽³⁴⁾; es decir *Pectinatus* spp. puede ser inhibido por un tratamiento de 58–60°C por un minuto, el cual es menor que un tratamiento rutinario de pasteurización ⁽²¹⁾. Se sugirió el valor D-60 (una medida de la resistencia al calor a 60 °C, en la que se muestra el tiempo requerido para una reducción decimal de microorganismo probado) para esta especie, ser cercana a 0.4 min ⁽⁴⁸⁾. Sin embargo, la adaptación térmica puede aumentar notablemente la resistencia al calor ⁽⁴⁶⁾. También, *Pectinatus* spp. es capaz de persistir a temperaturas incluso de 8 °C.; aunque la temperatura influye inversamente en la resistencia al oxígeno; así el tiempo de reducción decimal, se redujo en 6,7 veces cuando la temperatura disminuyó de 32 °C a 8 °C ⁽²⁰⁾; por lo que el riesgo de contaminación de la cerveza en una sala de llenado, que se mantienen a una temperatura baja, depende especialmente de la calidad limpieza y sanitización ⁽³⁶⁾.

En co-cultivo con *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto, *P. cerevisiophilus* creció en una medida limitada incluso a 8 °C - 15 °C, sus metabolitos comenzaron a perturbar el crecimiento de la levadura ⁽⁴⁹⁾. Por lo tanto, la entrada de *Pectinatus* spp. en el proceso de elaboración de la cerveza, por ejemplo, a través de la siembra de levadura, podría dar lugar a problemas de fermentación ⁽³²⁾.

P. cerevisiophilus es altamente sensible a la vancomicina y bacitracina ⁽⁵⁰⁾, que son moléculas grandes que normalmente son incapaces de penetrar en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas ⁽³⁶⁾ y *P. frisingensis* es sensible a nisina y polimixina B. Nisina es una bacteriocina producida por bacterias ácido lácticas, la cual tiene actividad frente a la mayoría de bacterias Gram positivas; pero las bacterias Gram-negativas son resistentes, a menos que la membrana externa de la células se encuentre dañada ⁽⁵¹⁾. Estos resultados sugieren que la membrana externa de *Pectinatus* spp. en las condiciones ensayadas, no actúa como una barrera de

permeabilidad eficaz ⁽³⁶⁾. Se ha reportado la existencia de cepas de *P. frisingensis* resistentes a nisina ⁽⁵²⁾.

Se conoce que *Pectinatus* spp. es susceptible a la mayoría de los desinfectantes utilizados en las fábricas de cerveza y que son eficaces para su control, tales como yodo, cloro, ácido peracético y formaldehído ^(21, 34, 36). *Pectinatus* spp. es fácil de controlar mediante tratamiento térmico y desinfectante oxidante; pero sobrevive en lugares como esquinas o en biopelículas, que son de difícil acceso para limpieza y desinfección ⁽³⁶⁾; por lo que si la higiene de la planta se realiza de manera exhaustiva, debería reducir su incidencia en la fábrica de cerveza.

Se ha observado que la cerveza con un bajo contenido de alcohol es más propensa al deterioro por *Pectinatus* spp. ⁽²¹⁾. Por otro lado, las pruebas de tolerancia frente al alcohol indican que *Pectinatus* spp. es capaz de crecer en medio que contiene hasta 4.5%, w/v de etanol ⁽²⁹⁾ y es inhibido a una concentración de 5.5% (w/v) ⁽¹⁹⁾, aunque se ha descrito algunas cepas de *P. frisingensis* que resisten hasta 5,2% w/v ⁽³²⁾.

Las especies de *Pectinatus* son más resistentes a pH ácidos y pueden sobrevivir a pH de 4,1 ⁽²¹⁾, y pueden tolerar un pH de 3,7; por ello estos organismos están bien adecuados para crecer en cerveza ⁽³⁰⁾. La tolerancia del pH es dependiente de contenido de alcohol y de otras propiedades de la cerveza ⁽³⁶⁾. *P. frisingensis* está mejor adaptada para crecer en ambientes acídicos comparado a las otras especies de *Pectinatus* ⁽³²⁾.

Pectinatus spp. tolera las sustancias amargas del lúpulo ⁽¹⁴⁾ y pueden crecer en cerveza con unidades de amargor hasta 33–38 EBC ⁽²¹⁾, incluso altas concentraciones de componentes amargos como 150 mg/L no afectan su crecimiento ⁽⁵³⁾.

A pesar que *Pectinatus* spp. es descrito como estrictamente anaeróbico; *P. cerevisiophilus* puede sobrevivir en presencia de bajas concentraciones de oxígeno, y es más resistente en co-cultivos con *Saccharomyces cerevisiae*, a pesar de una tasa constante de oxígeno disuelto (OD) que existe en las primeras etapas de fermentación, que podría deberse al consumo de O₂ y producción de CO₂ ⁽²⁰⁾. El crecimiento de las especies de *Pectinatus* se ven afectadas significativamente por el contenido de oxígeno en la cerveza y se ha observado su crecimiento en cervezas

con OD de 0.96-1,9 mg / L ^(20, 21, 38). *P. frisingensis* tolera más oxígeno que *P. cerevisiophilus*, un estudio de ambas especies demostró su habilidad de crecer en cerveza con un contenido de OD entre 0.4–0.8 mg/l ⁽²⁰⁾. Incluso se menciona que *Pectinatus* cultivado en laboratorio desarrolla una alta tolerancia al OD ⁽⁵⁴⁾. La tolerancia de oxígeno de *P. cerevisiophilus* mejora con la disminución de la temperatura ⁽⁴⁶⁾. Así, *P. frisingensis* tiene más resistencia al OD, alcohol y es capaz de usar un amplio rango de fuentes de carbono que *P. cerevisiophilus* ⁽⁵⁵⁾.

Un autor analizó las variables de la cerveza, que permitieron el crecimiento de *Pectinatus* ⁽³⁰⁾. Un resumen de los resultados se encuentra en la anexo 8.

A pesar de ser descritas como bacterias Gram negativas, *Pectinatus* tiene gran interés académico ya que son considerados eubacterias intermedias entre Gram-negativas y Gram-positivas ⁽⁵⁶⁾. Los aislados de *Pectinatus* tienen una tinción de Gram-negativa a Gram-variable, y poseen una membrana externa que es típica de las bacterias Gram-negativas; pero por otro lado, *Pectinatus* tiene una capa de peptidoglucano muy gruesa y una membrana citoplasmática característica de bacterias Gram-positivas ⁽⁵⁰⁾. Además, *Pectinatus* se agrupa con las eubacterias Gram-positivas según el análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA ^(29, 22).

5. *Pectinatus*, un agente emergente

Si observamos desde los inicios del proceso, el mosto es oxigenado antes de la inoculación de la levadura, para incrementar su biomasa. Este paso debería limitar la contaminación del mosto respecto a las bacterias anaeróbicas; sin embargo los últimos avances en tecnología cervecera conducen a obtener niveles muy bajos de oxígeno en el producto terminado⁽¹⁵⁾, desde 0,4 hasta 0,8 mg/L, lo que hace posible el crecimiento y la proliferación de *Pectinatus* en la cerveza. Es interesante notar que *Pectinatus* fue aislado por primera vez en cervecerías modernas donde esa clase de técnica es muy común ^(10, 20, 46). En el gráfico del anexo 9 se observa la evolución del volumen de la cámara de aire en las botellas de cerveza desde 1960-1990, nótese que en los años 70's se descubrieron cervezas contaminadas con *Pectinatus*.

Desde que la cerveza sale de la fábrica, queda fuera de control de los cerveceros y está sujeta a cualquier condición que impongan los distribuidores, minoristas y consumidores. Los envases pueden estar expuestos a las fluctuaciones de

temperatura, luz, y/o turbulencia, todos los cuales degradan la calidad del producto interior y (con la excepción de exposición a la luz) promueven el crecimiento microbiano. Incluso en condiciones óptimas de almacenamiento, un importante volumen de cerveza puede pasar varios meses en el transporte y almacenamiento antes de su consumo, lo que aumenta la probabilidad de deterioro microbiano. La industria hace mucho abordó este tema a través de la estabilización del producto por medio de filtración, pasteurización, o alguna combinación de los mismos. Sin embargo, la creciente demanda de cervezas no pasteurizadas, y no filtrada (turbias), en los últimos años, ha aumentado la incidencia de contaminación microbiana en la cerveza envasada por microorganismos tales como *Pectinatus* ⁽²⁾.

6. Lugares de aislamiento de *Pectinatus*:

La mayoría de las especies de *Pectinatus* han sido aisladas de cerveza y ambientes de cervecería, pero su entorno natural y fuente de contaminación no son bien entendidos ⁽³⁶⁾. Por otro lado, un estudio de los lipopolisacáridos de *Pectinatus* sugiere que este género puede estar asociado originalmente con plantas. Esto se debe a cadenas-O, ricas en desoxiazúcares, que se observaron en algunas de las cepas de *Pectinatus*, que se encuentran a menudo asociadas a las bacterias saprofitas o patógenas de las plantas. Por lo que los autores plantearon la hipótesis de que *Pectinatus* podría haber llegado a las fábricas de cerveza con materiales vegetales, como los cereales, el arroz o el lúpulo ⁽⁵⁰⁾. Hay varios ambientes en donde se han detectado:

En bodegas: *P. cerevisiiphilus*, ha sido aislada en levadura para siembra ^(57, 22), en muestras de agua de enjuague de línea colectoras y de recuperación de CO₂, que no son sometidos a regímenes de limpieza (esto implica un desmontaje intenso de los equipos), por lo tanto, las bacterias pueden prevalecer en esta parte de la fábrica por mucho tiempo ⁽²¹⁾. *Pectinatus* se aisló ocasionalmente durante la maduración, en tanques de cerveza terminada antes de la filtración ⁽⁴⁹⁾ y en los canales de drenaje en el área de filtración de cerveza ⁽³⁷⁾. Algo ocasional; pero descrito es que se aisló del agua de remojo de la malta, antes de la molienda. El crecimiento de *Pectinatus* se ralentiza considerablemente a bajas temperaturas y por lo tanto rara vez se encuentran en bodegas cuando es de baja fermentación; pero puede estar presente en cervezas de alta fermentación, debido a las temperaturas más altas ⁽³⁶⁾.

En envasado:

Es muy poco probable una contaminación accidental con *Pectinatus*; pero habita permanentemente en ciertos entornos en las cervecerías. Se ha encontrado cepas serológicamente idénticas, en la misma fábrica, con un intervalo de 4 años ⁽⁵⁸⁾. A pesar de ser anaerobias, su presencia en los aerosoles (por un período de tiempo), alrededor de las llenadoras, en el aire u otros aerosoles podrían ser una posible fuente de contaminación ⁽¹⁹⁾. En general, los números más altos de microorganismos se encuentran en el aire, alrededor de la llenadora, al parecer debido a la aerosolización continua de la cerveza en esta ubicación ⁽⁴⁰⁾. Por lo tanto *Pectinatus* puede ser transmitida a los materiales de llenado y, luego, a la cerveza a través de los aerosoles producidos durante el proceso de llenado y durante los procesos de limpieza ⁽³⁶⁾.

Las pruebas de detección y conteo del número de microorganismos en el aire de salas de llenado de cervecerías finlandesas, mostraron que el número de bacterias en el aire de la llenadora es más bajo cuanto mayor es su distancia de la lavadora de botellas ⁽³⁷⁾.

Pectinatus se ha aislado a partir de aceite de lubricación mezclado con cerveza y agua, en grietas del sistema de drenaje ⁽³⁴⁾, de aire y pisos de salones de llenado, de agua condensada de los techos, baldosas sueltas y en suelos dañados, áreas que a menudo son anaerobias⁽²¹⁾. Una fuente de contaminación durante el llenado de cerveza pueden ser las cintas transportadoras, especialmente cuando no se incluyen en el proceso de limpieza de la línea. También se puede encontrar en biopelículas, sobre superficies rugosas en la sala de embotellado ⁽⁴⁰⁾; en ruedas de estrellas que son altamente aeróbicas ⁽²¹⁾. Un cuadro con las zonas de detección positiva, en 10 plantas cerveceras en el período de 3 años ⁽³⁷⁾, se muestra en el anexo 10.

P. frisigensis ha sido más frecuentemente detectada que las otras especies, en el salón de envasado. Durante el llenado, es común la explosión de botellas y la cerveza en contacto con los accesorios de la máquina llenadora y taponadora, se convierte en adecuado sustrato para los microorganismos ⁽³⁷⁾. El equipo usado en el proceso de llenado es propicio a la formación de biopelículas debido también a los grandes volúmenes de agua utilizados ⁽¹⁰⁾; pero, cuando se utilizan los métodos de cultivo convencionales este contaminante no es detectado en el control operacional en fábrica ⁽⁴⁰⁾.

A pesar de que los procesos de limpieza profundas se adoptan periódicamente en todas las fábricas de cerveza, los procedimientos de limpieza no son suficientemente eficaces para eliminar completamente las biopelículas adheridas, y las bacterias alterantes anaerobias estrictas pueden propagarse y dispersarse en el salón de envasado. ⁽¹⁹⁾.

7. Mecanismos de supervivencia de *Pectinatus* spp. en biopelículas:

La supervivencia de *Pectinatus* spp. en ambientes aeróbicos de salas de llenado es posible debido a la formación de biopelículas y asociaciones simbióticas de microorganismos que sobreviven dentro de ellas ⁽³⁶⁾, esta supervivencia prolongada de *Pectinatus* indica que el agua puede ser una posible fuente de contaminación⁽¹⁴⁾. Su presencia en condiciones aeróbicas proporciona conocimientos básicos sobre la complejidad de estas biopelículas bien establecidas ⁽²¹⁾.

Los colonizadores primarios de superficies (en cuestión de horas después del inicio de la producción) son microorganismos que producen sustancia poliméricas extracelulares (EPS) ⁽⁵⁹⁾; se trata de bacterias Gram negativas (bacterias ácido acéticas: BAA) y levaduras ⁽⁹⁾, que proliferan en los lugares donde se depositan los residuos de cerveza, agua u otros, de los procesos intermedios ⁽¹⁰⁾. Estos microorganismos consumen el oxígeno muy rápidamente por su intenso metabolismo aeróbico, creando condiciones anaerobias que apoyan el crecimiento de otros microorganismos, por ejemplo, bacterias ácido lácticas (BAL) y *Pectinatus*. Las levaduras y lactobacilos pueden habitar en estos lodos, mientras que el ácido láctico producido por las BAL puede ser metabolizado a ácido propiónico por bacterias anaerobias como *Pectinatus* ⁽²¹⁾.

Por otra parte, la muerte gradual de microorganismos aumenta el pH de las biopelículas, que también promueve el crecimiento de *Pectinatus* ⁽⁵⁹⁾. El limo producido por estas biopelículas protege a las bacterias contra la acción del oxígeno, la desecación y agentes desinfectantes ⁽⁶⁰⁾. La formación de biopelículas se apoya en la limpieza mecánica imperfecta antes de la desinfección química, convirtiéndose en una fuente permanente de contaminación. La cerveza que entra en contacto con las biopelículas crea un ambiente ideal para la supervivencia y el desarrollo de microorganismos, especialmente en lugares como grietas en el suelo,

paredes y techo de la sala de embotellado o en otra parte en la operación. En el anexo 11 se muestran fotografías de biopelículas que contienen *Pectinatus* ⁽³⁷⁾.

El hecho de que estos microorganismos se encuentren generalmente en fábricas modernas grandes, no significa que no existan en cervecerías pequeñas. Las condiciones, sin embargo, en las fábricas de cerveza más pequeñas pueden ser menos ideales para la propagación de estos organismos ⁽³⁰⁾. Para su eliminación se pueden aplicar métodos físicos, químicos y medidas biológicas ⁽⁶⁰⁾. Se ha sugerido el uso de agua de enjuague alcalina al final del procedimiento de limpieza (pH 12, con baja fuerza iónica), ya que en estas condiciones se disminuye la adhesión de las biopelículas a los materiales de construcción, tales como el acero inoxidable ⁽⁶¹⁾.

8. Tipos de productos potencialmente alterables por *Pectinatus*

Se ha incrementado la producción de algunos tipos de cerveza, las cuales poseen naturalmente una predisposición a la contaminación, como las cervezas con bajo lupulado, bajo alcohol, sin alcohol, o sin pasteurizar. El uso de pasteurización flash previo al llenado y la esterilización en frío, incrementan el riesgo de contaminación secundaria de la cerveza ⁽⁴¹⁾. El deterioro se produce "en envasado", y la cerveza contaminada puede estar ya en el mercado antes que la presencia de *Pectinatus* sea detectada por métodos de cultivo convencionales ^(62, 63).

Cerveza no pasteurizada:

Estas bacterias son contaminantes secundarios de cerveza no pasteurizada después de su envasado ⁽⁶⁴⁾, siendo *P. frisingensis* la más frecuente responsable de los incidentes de deterioro de la cerveza en comparación con *P. cerevisiophilus*. Las tres especies tienen una fuerte capacidad de deterioro principalmente en cerveza sin pasteurizar o de baja pasteurización ⁽¹⁹⁾.

Cerveza con bajo alcohol y sin alcohol:

En los últimos años, existe un desarrollo de marcas de cerveza con un bajo contenido de alcohol, las cuales tienen un mayor riesgo de los contaminantes secundarios, incluyendo *Pectinatus* spp, debido principalmente al bajo contenido de alcohol de la cerveza ⁽²¹⁾. Se ha descrito el hallazgo de *P. haikarae* en este tipo de cervezas ⁽³⁸⁾.

Cerveza “light”

La capacidad de *Pectinatus* spp. para utilizar diferentes fuentes de carbono, por ejemplo lactato y azúcares inusuales es particularmente peligroso en aquellos casos en que existe una contaminación mixta de cerveza, o en la cerveza “light”, que normalmente se espera que tengan una susceptibilidad reducida a la descomposición precisamente a causa del muy bajo contenido de sustratos fermentables ⁽³⁰⁾. Se ha descrito que *P. sottaceto* es una bacteria potencialmente alterante de la cerveza tipo light, con 4% de alcohol, 10 IBU y pH 4.2 ⁽³⁸⁾.

La concentración de *Pectinatus* spp. en los entornos de la cervecería, es mayor en los meses más calurosos, que en los meses más fríos del año ⁽²¹⁾, se indica que la fuente más común de contaminación es el embotellado y empaquetado en verano. *Pectinatus* crece bajo condiciones anaeróbicas dentro del producto empacado, entre 15 y 40°C y a pH de 4,5 ⁽³⁰⁾. La persistencia en la cervecería es favorecida por la alta humedad y alta temperatura, aproximándose a la temperatura de crecimiento óptima. El número de microorganismos en el aire se incrementa al aumentar la temperatura y la humedad ^(10, 37).

9. Métodos de detección de *Pectinatus* dependientes de cultivo:

El control microbiológico en cervecería utiliza principalmente métodos clásicos de cultivo, combinados con una simple identificación fenotípica de aislamientos ⁽⁴⁰⁾. Se basan generalmente en criterios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos (asimilación de nutrientes, la microscopía y la tinción selectiva, respectivamente). El conteo en placa y enriquecimiento siguen siendo los principales métodos para la detección de contaminación microbiana en las fábricas de cerveza durante el proceso de elaboración de la cerveza y en el productos final ⁽¹²⁾.

Medios de cultivo descritos y utilizados

En el anexo 12 se muestran los medios recomendados por varias organizaciones de cervecería para la detección de bacterias alterantes de la cerveza ⁽⁵⁾.

La mayoría de los medios recomendados para anaerobios son líquidos y contienen sustancias reductoras del potencial redox del medio ⁽³⁰⁾, (ácido ascórbico, tioglicolato de sodio, clorhidrato de cisteína, etc). La temperatura adecuada para el cultivo de *Pectinatus* es 28-32 ° C y el pH en el intervalo de 5,0 a 7,0 ⁽⁴⁰⁾.

En los laboratorios de cervecería para la detección de *Pectinatus* en producto terminado se hace uso de la "prueba de vida útil", en el que la cerveza está almacenada a temperatura ambiente durante hasta seis semanas y se observa la formación de turbidez ⁽⁴⁰⁾.

Pectinatus también se pueden cultivar y mantener en el caldo MRS, (de Man Rogosa, Sharpe) cultivado con un mínimo de cámara de aire y con el uso de un inóculo abundante ⁽³⁰⁾. Así una variante más rápida es la "prueba forzada", en la que se pone a prueba el desarrollo de turbidez en la cerveza o la cerveza mezclada con un medio de enriquecimiento, seguido de 4-6 semanas de incubación a 30 °C ⁽⁶⁵⁾. Se ha logrado detectar *Pectinatus* en 1-3 semanas mediante la adición del medio MRS a la cerveza sospechosa. El período de incubación también puede ser reducido a pocas semanas mediante la adición de caldo MRS concentrado con fructosa en la cerveza sospechosa en una proporción 1:5 ⁽⁶⁶⁾ o haciendo uso del caldo NBB-C (Nachweismedium für bierschädliche Bakterienkonzentrat) ⁽⁴⁰⁾. La fórmula del medio MRS ⁽⁶⁷⁾ está dada en el anexo 13 y la del medio NBB modificado ⁽²⁾, en el anexo 14.

Si se usa los medios NBB o MRS en un ratio 1:1 (v/v), se logra reducir la concentración de alcohol de la cerveza a la mitad, facilitando su recuperación en cervezas con porcentajes de alcohol como 6,6% ABV ⁽⁶⁸⁾.

El cultivo de *Pectinatus* se puede realizar en caldo MRS con una concentración convencional o modificada ⁽⁵⁶⁾, con agente reductor: clorhidrato de cisteína e indicador de oxidación-reducción: resazurina ^(62,22). Así se tiene el medio EC-MRS (EC: extra concentrado) ⁽⁶⁶⁾, que se utiliza para la etapa de cultivo previo a la identificación por PCR. También se ha usado caldo MRS doblemente concentrada con incubación a 27 °C durante 3 días. Si es necesario, se puede utilizar cicloheximida para inhibir el crecimiento de levaduras, previo a PCR ⁽⁴⁰⁾.

Otros estudios hacen uso de caldo PYF (peptona, extracto de levadura y fructosa) ^(5, 18, 21, 68), caldo PYG (con glucosa) ^(26, 58, 18) o caldo PYL (con lactato) ⁽²⁷⁾ y medio tioglicolato para enriquecimiento de cerveza ⁽⁵⁾.

Citando a los medios sólidos, el método habitual para aislar *Pectinatus* en los 80`s, requería del uso del "tubo de Lee" que contiene agar lactato de acetato de plomo (LL). La fórmula del agar LL ⁽³⁵⁾ se encuentra en el anexo 15. El tubo es de doble

pared, con tapón de rosca que permite la formación de un cilindro delgado de agar entre las dos paredes. La anaerobiosis se logra a través de la desoxigenación del cilindro profundo de agar durante la esterilización, un mínimo de cámara de aire, y el uso de un agente reductor para absorber el oxígeno introducido durante el procedimiento de inoculación ⁽⁶⁹⁾. Usa el feniletanol por su carácter selectivo para inhibir las bacterias Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas y usa una única fuente de carbono, lactato de sodio (evita el crecimiento de *Zymomonas*). Basándose en la naturaleza productora de H₂S, es posible diferenciar las colonias de *Pectinatus* de las colonias BAL, mediante la incorporación de acetato de plomo en el medio. En el agar LL, aparecen simultáneamente colonias blancas y/o negras. Las BAL desarrollan colonias de color blanco; pero de tamaño muy pequeño (0,5-1,0 mm), mientras que *Pectinatus* se desarrolla más (2,0 a 3,0 mm) y son colonias de color marrón oscuras a negras, debido a la reacción entre acetato de plomo y H₂S liberado por *Pectinatus*. Las BAL no producen H₂S. Los cultivos jóvenes de *Pectinatus* crecen dentro de 2 a 3 días, y se necesita otros 2 a 3 días de incubación para el desarrollo de color marrón oscuro a negro; los cultivos viejos pueden requerir 7 a 10 días para desarrollar el color negro ⁽³⁵⁾. Las limitaciones del método son la falta de disponibilidad comercial de los tubos de Lee y la baja sensibilidad para la detección de bajos niveles de contaminación, debido al pequeño volumen del inóculo (0,1 mL) ^(54, 40).

El medio recomendado por la American Society of Brewing Chemist (ASBC) para detectar *Pectinatus* y *Megasphaera* en cerveza, es el medio SMMP (Medio Selectivo para *Megasphaera* y *Pectinatus*). Se puede utilizar (15% medio selectivo: 85% de la cerveza (v/v)) ^(17,70). Con este medio, el contenido de alcohol de la cerveza permanece casi sin cambios ⁽⁶⁸⁾. El medio SMMP contiene sustancias reductoras del potencial redox (tioglicolato de sodio y clorhidrato de cisteína) que promueve el crecimiento de anaerobios, lactato como única fuente de carbono, la presencia de etanol (presente en la cerveza o añadida al medio en el análisis de la cerveza sin alcohol) y sustancias amargas (presente en la cerveza si es lupulada) como un factor inhibitorio para el crecimiento de enterobacterias (*Enterobacter*, *Escherichia* y *Flavobacterium*). La adición de cicloheximida inhibe el crecimiento de levadura de cultivo y levaduras extrañas; y la combinación de cristal violeta y fusidato de sodio suprimen a las bacterias Gram positivas ⁽¹⁷⁾. El autoclavado del

medio produce una pérdida de etanol que necesita ser ajustada, para evitar el crecimiento de las enterobacterias ⁽⁶⁸⁾. Para el análisis, se vierte 130 mL de cerveza sospechosa en un matraz con 20 mL de SMMP, se tapa, se mezcla y se incuba por 14 días a 28-30 °C. Se supervisa cada día la formación de turbidez o sedimento. La turbidez del medio se puede considerar como presencia preliminar de *Megasphaera* o *Pectinatus*, se debe observar al microscopio para determinar la morfología del microorganismo. *Pectinatus* tiene la forma de bacilos y *Megasphaera* de cocos. Además, el medio de SMMP exhibirá cambios de color. Para *Pectinatus*, el medio permanece púrpura con sedimento; para *Megasphaera*, el medio puede cambiar a amarillo con una incubación prolongada. La confirmación final se obtiene mediante la identificación de los ácidos orgánicos volátiles a través de cromatografía de gases. *Pectinatus* se identifica por la producción de ácido acético y ácido propiónico ⁽⁷⁰⁾. La fórmula de SMMP se encuentra en el anexo 16.

El medio NBB pre-reducido, también se puede utilizar ⁽²⁾. Este medio se produce como un caldo (NBB-B), agar (NBB-A) y concentrado (NBB-C). NBB se usa en diversas formas según el propósito deseado ⁽¹⁴⁾, ver anexo 17. Para el análisis, se mezcla NBB-C en proporciones variables con agua y cerveza, para la detección de bacterias alterantes, potencialmente alterantes o para la determinación general de presencia de bacterias en cerveza ⁽¹⁴⁾. También se recomienda el medio Raka Ray para análisis de rutina ⁽⁵⁾.

La principal limitación de los métodos de cultivo es su largo tiempo de incubación. Se necesita una semana o incluso más tiempo para obtener colonias visibles en las placas o turbidez en caldos. En consecuencia, los productos terminados, a menudo ya están a la venta antes de que los resultados microbiológicos estén disponibles. Otro problema es que estos medios no son específicos. Si la selectividad se incrementa por la adición de productos químicos específicos, podrían necesitarse mayor tiempo de detección ⁽⁵⁾. Los métodos de cultivo no permiten la identificación o localización de los contaminantes. Además, el enriquecimiento de cultivo es poco aplicable al análisis de muestras del proceso, naturalmente turbias. Tras la exposición a condiciones severas, las bacterias también pueden entrar en un estado viable pero no cultivable que no se pueden detectar en los medios de cultivo recomendados; pero pueden ser capaces de crecer en la cerveza ⁽¹⁾.

II. Propuestas de medio de detección de *Pectinatus*, en superficies.

1. Problemática de detección de *Pectinatus*

La detección de contaminantes en la cerveza consiste en concentrarlos de un volumen adecuado (100-500 mL) por filtración de membrana y cultivarlos en un medio adecuado ⁽³²⁾.

Pectinatus, es un anaerobio estricto, que no crece en una incubadora ordinaria de CO₂ cuando se utiliza medio sólido, para fines de aislamiento y purificación ⁽³⁵⁾. La cepa de *Pectinatus* VTT-E-79100, se analizó por filtración de membrana, vertido en placa e incubación en condiciones anaeróbicas (sistema anaerobio GasPak-BBL) y no se desarrolló. La sensibilidad de esta bacteria al O₂ hace que la técnica de filtración de membrana sea inadecuada para pruebas de rutina, esta técnica no puede detectar recuentos bajos de células o incluso recuentos elevados de células estresadas en la cerveza envasada ⁽⁵⁴⁾. La recuperación promedio en un test fue de 5-19%, dependiendo del estado fisiológico de las células. Obviamente, este método no es práctico y no puede ser recomendado para la detección de *Pectinatus* en muestras de cerveza filtrada incluso si se utiliza un medio pre-reducido y si filtrado se llevara a cabo en una atmósfera de CO₂. La razón de la baja recuperación es que la mayoría de las células viejas, que corresponden a células estresadas en la práctica, mueren durante la filtración de membrana ^(29, 54). La detección también está limitada por la técnica de muestreo; ya que en contacto con el O₂ estas bacterias mueren y los resultados arrojan falsos negativos ⁽⁷¹⁾. Esto a pesar que la European Brewery Convention (EBC) recomendó el uso de los medios sólidos no selectivos pre-reducidos: MRS, NBB, PYF, Raka Ray, SDA, UBA ⁽⁷²⁾.

Los medios de cultivo descritos anteriormente tienden a consumir mucho tiempo, a menudo toman varios días con el fin de detectar primero, los microorganismos potencialmente alterantes. Además la caracterización (identificación) pueden tomar varios días más, una vez que los cultivos hayan sido aislados ⁽⁶³⁾, teniendo en cuenta que un único medio no puede detectar a todas las bacterias alterantes de la cerveza ⁽⁶⁸⁾.

La desventaja en el uso de los medios de cultivo no selectivos (MRS, NBB, PYG, PYF, PYL) es que no impiden el desarrollo de otros géneros (levaduras, coliformes, BAL, etc.) que podrían estar presentes en una cerveza en mal estado, en

una superficie o medio ambiente de la cervecería. Estos microorganismos compiten con éxito con *Pectinatus* en estos medios, suprimiendo su desarrollo y posiblemente esta inhibición sea por los productos de su metabolismo, por el cambio de pH, etc. Por lo tanto el uso de medios no selectivos podría dar falsos negativos. Se recomienda el uso de estos medios cultivándolos en condiciones anaeróbicas para actuar de forma fiable, con cámara anaeróbica o con atmósfera controlada de N₂ y H₂; sin embargo éstos no son equipo comunes en los laboratorios de las plantas cerveceras ⁽⁴¹⁾.

Un medio prometedor que se puede aplicar para el análisis de hisopados de superficies y de biopelículas de los dispositivos de operación de fábrica, en la zona de envasado, es el caldo MRS reducido, con una composición modificada, llamada MRS-T, que contiene una mezcla de tetrahidro- α -ácidos y feniletanol para inhibir la microflora bacteriana acompañante. La fórmula del medio MRS-T está dada en el anexo 18. Este medio permite la detección de *Pectinatus* siendo adecuado para el muestreo y para el cultivo, contiene 0,2 % en peso de agar, que restringe su oxidación durante la manipulación y el transporte. La incubación se lleva a cabo a una temperatura de 28-30 °C y se controla la formación de turbidez en la parte inferior del tubo. Se puede detectar al microscopio después de 24-48 horas de la inoculación el típico movimiento de serpiente de *Pectinatus*. Sin embargo, con este medio, no se logra inhibir completamente el crecimiento de levaduras ⁽⁵³⁾, estando las levaduras presentes en las biopelículas por lo que se necesitaría un agente inhibidor.

Como aseguramiento de calidad, se debe tener en cuenta el aspecto preventivo en la planta. La falta de reclamos de producto contaminado significa que estos contaminantes secundarios podrían estar en las líneas de embotellado, en su fase de adaptación, debido a las limpiezas periódicas que garantizan condiciones de trabajo higiénicas. Algunas fábricas de cerveza pueden sufrir gravemente de contaminantes secundarios sin previo aviso perceptible en el producto terminado. Su aparición en ambientes aeróbicos indica problemas de saneamiento y revela la presencia de biopelículas altamente establecidas ⁽²¹⁾.

Con la tendencia actual de las cervezas “light”, de bajo alcohol o sin alcohol, el microbiólogo de planta, debe considerar este microorganismo como un problema potencial grave que puede llegar a ser muy perjudicial en un futuro. Debido a que el

origen de estos microorganismos en la fábrica de cerveza está aún bajo investigación, sólo las técnicas preventivas son útiles ⁽³⁰⁾. Por ello un buen plan microbiológico debe enfocarse en controlar estos lugares de aparición primaria de *Pectinatus*, así los esfuerzos, tanto en higiene, mantenimiento y control microbiológico, deben apuntar a las superficies y a las biopelículas del salón de envasado.

Los diferentes métodos utilizados para el muestreo de biopelículas en las superficies externas e internas son: hisopado, enjuague, inundaciones con agar, agar de contacto ⁽⁵⁹⁾, etc; por la naturaleza anaeróbica de *Pectinatus*, por su practicidad y por no dejar residuo nutritivo, el método de muestreo más adecuado será el hisopado.

No se puede partir de técnicas como “prueba de forzado” por la larga duración del análisis (semanas), ni de un medio como SMMP (14 días de incubación), que está recomendado sólo para cerveza y no es adecuado para hisopado de superficies. Tampoco se cuenta comercialmente con los tubos de Lee como para hacer uso del agar LL. Sumado a que ambos medios selectivos tienen una preparación engorrosa, SMMP y agar LL tienen muchos ingredientes en su composición y no existen comercialmente. Tampoco se puede tomar en cuenta métodos que demanden altos costos de implementación y análisis o la necesidad de personal altamente especializado en técnicas moleculares. La búsqueda se basó en lo descrito líneas abajo.

2. Objetivo

Optimizar el medio MRS-T, garantizando seguridad en la detección, rapidez, selectividad, claridad de lectura, de fácil preparación y de bajo costo.

3. Materiales y Métodos

a) Microorganismos:

Pectinatus frisingensis LMG 25633, obtenido del banco de cepas de la BCCM/LMG Bélgica. *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus brevis*, cepas aisladas de una cervecería del país. Cepas Biodiva de *Torulaspora delbrueckii* y Diamond de *Saccharomyces pastorianus* (Lallemand), obtenidas del grupo de investigación de Biotecnología Enológica de la URV bajo la forma de levadura seca activa (LSA). *Pectinatus* se cultivó en caldo MRS líquido que contiene

clorhidrato de cisteína y tioglicolato de sodio en una concentración de 0,25 g/L, (MRS-ct) con pH 5.6 a 5.8, por 48 horas a 28 °C, en botellas BVPF, no se necesitó una atmósfera anaerobia. *Lactobacillus* y *Pediococcus*, se cultivaron en caldo MRS líquido, pH 5.6 a 5.8, durante 48 horas a 28 °C. Las levaduras fueron cultivadas en agar YPD durante 48 horas a 28 °C.

b) Reactivos Especiales:

El extracto de lúpulo usado en este estudio, es una preparación comercial obtenida de Yakima Chief - Hopunion LLC. En cuanto a los tetrahidro-iso-alfa ácidos (THIAA), este extracto era una solución acuosa clara de sales de potasio de THIAA derivado de lúpulo, estandarizado a una concentración de 9% w/w por HPLC ⁽⁷³⁾.

c) Método de muestro simulando la técnica de Hisopado.

Se utilizó agua de humectación para los hisopos, para lograr mejores resultados, previo a la toma de muestra por hisopado, resulta ventajoso humectar el hisopo con agua reducida estéril, esto se logra con la adición de sustancias reductoras del potencial redox, clorhidrato de cisteína y tioglicolato de sodio en concentración de 0,25 g/L cada uno ⁽⁵³⁾. Los hisopos fueron sumergidos en el agua reducida, previo a la inmersión en la solución con el cultivo mixto.

d) Modificación del medio MRS-T

El medio propuesto, se basa en el medio MRS-T, éste a su vez usa el caldo MRS comercialmente disponible modificado por la adición de agar, compuestos reductores del potencial redox (tioglicolato de sodio y clorhidrato de cisteína), y los componentes selectivos de 2-feniletanol y THIAA. Adicionalmente a estos componentes se utilizó cicloheximida, azul de metileno y rojo de bromofenol. El medio se prepara mezclando todos los componentes, ajustado a un pH=7 +/- 0.1, dispensado en alícuotas de 12 mL en tubos de ensayo bacteriológico y se autoclava durante 15 min a 121 °C. El medio MRS-T modificado se mantiene en refrigeración y protegido de la luz por un máximo de 14 días. El desarrollo del medio implica probar diferentes concentraciones de cicloheximida (Cy) para inhibir levaduras y aumentar su selectividad, probar diferentes concentraciones de rojo de bromofenol (RBF) como un indicador de color para facilitar la lectura de resultados y probar el uso de azul de metileno (AM) como medida de control

del estado de oxidación del medio, así como verificar la utilidad de la concentración de agar al 0.2%.

d.1) Pruebas de Selectividad sobre Cultivos Mixtos. Los microorganismos mencionados anteriormente, se cultivaron como se describe en la sección a), y 1 mL de cada microorganismo a concentración de 10^8 ufc/mL (medido en una cámara de Neubauer) se coloca en un tubo de ensayo. En ese pool de microorganismos se sumerge el hisopo previamente remojado en agua reducida. Se inocula en medio MRS-T líquido recién preparado sin cicloheximida y con cicloheximida a concentraciones de 10, 20 y 30 mg/L, cinco pruebas por cada concentración. Se cultivó a 28 °C durante un máximo de 5 días. Se controló la formación de turbidez y sedimento cada 24 horas. La microscopía de las muestras se realizó con microscopio de luz convencional (aumento de 400 X) después de 24 h de cultivo.

d.2) Prueba de Cambio de Color por uso de indicador de pH. Se preparó el medio MRS-T modificado con Cy (20 ppm) y se adicionó RBF a 75 ppm y se preparó otra similar con 25 ppm de RBF. Se comparó cada 24 horas el cambio de color de rojo a amarillo por descenso de pH debido a la producción de ácidos por *Pectinatus*. Se incubó las cepas individualmente, para evaluar el aporte de ácidos en el medio por cada una de ellas. Se realizaron tres pruebas por cada concentración y por cada microorganismo.

d.3) Prueba de oxidación del medio por uso de agente de óxido reducción. Se preparó el medio MRS-T modificado con cicloheximida 20 ppm y se adicionó AM a 2,5 ppm. Se comparó con el medio MRS-T sin adición de AM.

d.4) Comprobación de la utilidad de uso de Agar al 0.2%. Se preparó el medio MRS-T modificado con Cy 20 ppm, RBF 25 ppm y 2,5 ppm de AM (con 0,2% de agar). Se comparó con caldo MRS-T con Cy 20 ppm, sin adición de agar, para lo cual se realizó una prueba de transporte de los tubos preparados en gradilla, simulando una distancia de 100 metros entre un laboratorio y el salón de envasado (ida y vuelta). Se utilizó una gradilla con 15 tubos con medio para la prueba de transporte.

4. Resultados

- a) **Pruebas de Selectividad sobre Cultivos Mixtos:** en la figura 1 se observa que en el medio MRS-T existe desarrollo de levaduras, sobre todo en la parte superior del medio (aerobio). Los resultados muestran que con medio MRS-T modificado con Cy a concentraciones de 20 y 30 ppm se logra inhibir el desarrollo de levaduras de cultivo y levaduras extraña, facilitando la visibilidad de la turbidez formada solo por *Pectinatus*.

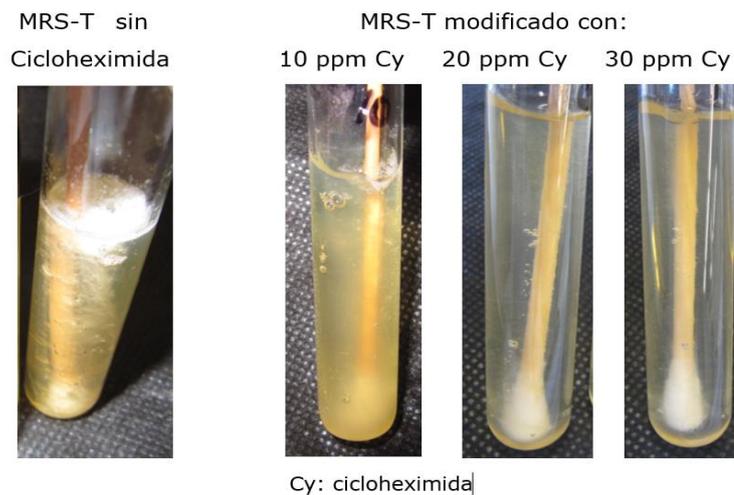


Fig. 2: Resultados a diferentes concentraciones de cicloheximida.

- b) **Prueba de cambio de color por uso de indicador de pH:** en la figura 3, donde P: *Pediococcus*, L: *Lactobacillos* y Pec: *Pectinatus*, se observa que a las 24 y 48 horas de incubación la variación de color del medio con 25 ppm de RBF, era más evidente que con RBF a 75 ppm. En ambas concentraciones el cambio de color se produjo sólo en el tubo con *Pectinatus* y no en las BAL.

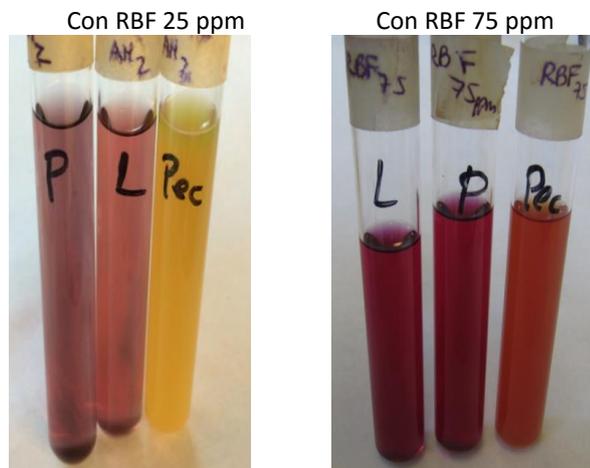
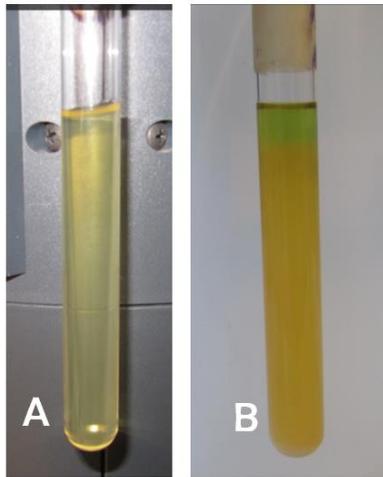


Fig. 3: Resultados a diferentes concentraciones de rojo de bromofenol.

c) Prueba de oxidación del medio por uso de agente óxido-reducción

En la figura 4 se aprecian los resultados obtenidos de esta prueba.



A) Medio inicial recién autoclavado y enfriado.

B) Medio MRS-T-con cicloheximida y azul de metileno, a las 48 horas de incubación con el cultivo mixto.

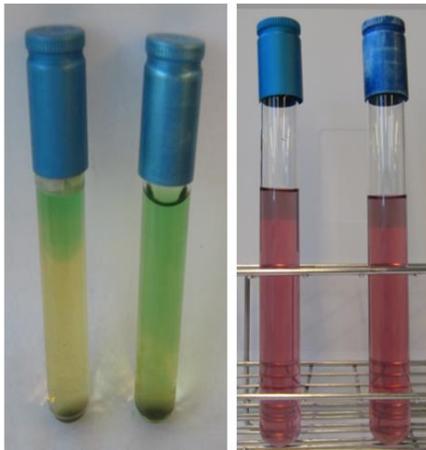
Se observa la coloración azul desarrollada por la oxidación de azul de metileno. En dicha zona no hay turbidez, lo que indica que en esa zona no se ha desarrollado *Pectinatus* por la presencia de oxígeno.

Fig. 4: Resultados con el uso de azul de metileno como agente de óxido reducción

d) Comprobación de la utilidad de uso de Agar al 0.2%.

En la figura 5 se aprecian los resultados obtenidos de esta prueba.

A) Medio sin agar B) Medio con agar



A) Se observa que con la prueba de transporte en canastillas, se produce movimiento del medio sin agar, permitiendo el ingreso de oxígeno al medio. El azul de metileno evidencia la oxidación en segundos.

B) El transporte no afecta al mismo medio con 0,2% de agar. No se evidencia desplazamiento del medio, ni oxidación (no hay incremento del color azul).

Fig. 5: Resultados con el uso de azul de metileno como agente de óxido reducción

5. Discusión

Previo a la modificación del medio MRS-T, se verificó su poder inhibitorio frente a *L. brevis* y *P. damnosus*. Se utilizaron estas bacterias ya que los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* son considerados como las bacterias alterantes de la cerveza con mayor incidencia. Ambas especies son resistentes al lúpulo ⁽⁵⁾. Se ha informado que *L. brevis*, *L. lindneri* y *P. damnosus* fueron los responsables del 70-80% de los incidentes de descomposición microbiana de cerveza, en Europa, durante el período de 1980 a 2002, ^(21, 74) (ver anexo 19), siendo *L. brevis* la implicada en más de la mitad de las cervezas deterioradas. La elección de *Torulaspora delbrueckii* como levadura extraña no *Saccharomyces* y de *Saccharyomyces pastorianus*, responde a la necesidad de cubrir el espectro de levaduras que se podrían encontrar en una cervecería. Las características de las bacterias ⁽²⁵⁾ utilizadas se muestran en el anexo 20.

Como se mencionó anteriormente, el medio MRS-T permite el desarrollo de levaduras en la mayoría de los casos. Se sabe que cicloheximide (Cy) se usa para suprimir el crecimiento de levaduras extrañas y de cultivo (sin efecto sobre el crecimiento bacteriano) ⁽⁶³⁾. Así, el medio SMMP contiene 20 ppm de Cy para los mismos fines ⁽¹⁷⁾. Otros medios utilizan concentraciones que van desde 10 a 100 ppm para detección de *Enterobacterias* y *Zymomonas*, respectivamente ⁽²⁾. Debido a que las levaduras se encuentran presentes en la mayoría de biopelículas en una cervecería, se ha imprescindible su uso como agente inhibidor en este medio.

Existe una serie de indicadores de óxido-reducción, como azul de metileno (AM) y resazurina. Sin embargo la disponibilidad de contar con AM en los laboratorios de cervecerías es mayor, ya que suele utilizarse para ensayos de viabilidad de levadura. Se ha hecho uso de azul de metileno en el agar LL, donde aparece en el tubo oxidado con una coloración azul-verdosa; y en su condición reducida es incolora, que se da cuando el agar gelifica ⁽³⁵⁾. De acuerdo a los resultados, tras la incubación sólo la parte superior del medio mostró la oxidación (de aproximadamente 1 cm de altura); sin embargo, esta altura es insignificante, ya que se usó 12 mL de medio por tubo, dejando una buena columna de medio anaeróbico para el crecimiento de *Pectinatus*. De allí que se debe evitar el uso de tubos con 5 mL de medio, ya que se tendría poca columna de medio anaeróbico y podría dar falsos negativos. El uso de AM también facilita por observación visual el estado del

medio, ya que si el medio es viejo (mayor a 14 días de preparación), la columna de color azul se incrementa y por observación visual el analista puede descartar los medios oxidados.

En su desarrollo *Pectinatus* produce metabolitos ácidos, por lo que baja el pH del medio. Esto se aprovechó con el uso de un agente indicador de pH. De las dos concentraciones de rojo de bromofenol analizadas en el medio, (25 y 75 ppm), la concentración de 25 ppm mostró una mejor variación de color. Esto facilita la lectura al analista, ya que cuando se realiza hisopados de superficie en los salones de envasado, se usa una gran cantidad de tubos por línea de envasado (entre 15-30) y si la cervecería cuenta con varias líneas de envasado, esta cantidad se multiplica. Si únicamente se observara microscópicamente cada uno de los tubos, cada 24 horas, resultaría ser un método impráctico, agotante y demandaría mucho tiempo. Así la utilidad del uso de un indicador de pH por cambio de color resulta muy práctico y ventajoso. Sólo aquellos tubos en los que se tiene duda del cambio de coloración, podrían observarse al microscopio. Aunque por análisis sensorial (producción de H₂S) los tubos positivos dudosos, podrían ser rápidamente diferenciados de los negativos.

El medio se ajustó a pH=7 y no a pH de 6,5 según el medio original, debido a que su uso a pH=7 tuvo buenos resultados, en un estudio previo de detección de *Pectinatus* en biofilms⁽³⁷⁾.

El uso de un agente de protección del medio frente a la oxidación durante el transporte es de vital importancia. En las cervecerías, la distancia de transporte entre el laboratorio y el salón de envasado, las subidas y bajadas de la gradilla al momento de hisopar, la apertura y cierre de cada tubo y la introducción del hisopo, hacen que un medio líquido o caldo incorpore oxígeno del aire, oxidándolo. En estas condiciones *Pectinatus* no se podría desarrollar y si estuviese presente en la muestra, el resultado sería un falso negativo. Usar 0,2% de agar en el medio, evita que el oxígeno ingrese al medio, incluso cuando se sumerge el hisopo.

Todos los componentes del medio son fáciles de adquirir, de bajo costo, de preparación simple y no requiere personal altamente especializado para la toma de muestra ni para la interpretación de resultados. Una forma confirmatoria, es la simple observación visual al microscopio, donde se observan los típicos movimientos de *Pectinatus*, en “X” o en forma de serpiente.

6. Conclusiones y Perspectivas

Debido al avance tecnológico *Pectinatus* surge como un agente emergente para la industria cervecera. Existe la necesidad de métodos de detección rápidos y a la vez de fácil accesibilidad para las cervecerías.

Los medios recomendados están enfocados en análisis de producto terminado; pero muchas veces no son métodos fiables o los resultados se obtienen cuando la cerveza ya se encuentra en el mercado. A pesar que existe una gran cantidad de métodos no dependientes de cultivo ⁽⁷⁵⁾ éstos no son accesibles a las cervecerías.

Una manera preventiva de detectarlo es a través de hisopados de superficies de la cervecería. Se obtienen buenos resultados en laboratorio, con el uso del medio MRS-T modificado con cicloheximida, con adición de azul de metileno como indicador visual de óxido-reducción y con adición de rojo de bromofenol como indicador de variación de pH.

A futuro, la puesta en práctica de este medio analizando biopelículas obtenidas de cervecerías nos dará una visión de su practicidad, de su poder de identificación, recuperación y sobre todo nos permitirá detectar los focos de contaminación por esta bacteria, permitiendo tomar medidas que aseguren la calidad del producto. Los sitios de muestreo deben cubrir las áreas críticas del salón de llenado, entrada de botellas vacías a la llenadora y el coronador o taponador como mínimo.

Con los resultados se podría establecer la relación de factores (tipo de pasteurización, tamaño de cervecería, capacidad/velocidad de línea, etc.) para su incidencia, y permitiría recopilar datos sobre la incidencia y distribución de las especies de esta bacteria en diferentes fábricas de cerveza.

A partir de este medio modificado, podría evaluarse su capacidad de detección de *Pectinatus* en producto terminado, por incorporación a la cerveza, haciendo uso del medio MRS-T modificado y concentrado. Si para ello se utilizase botellas tipo BVPF se podría prescindir del uso de azul de metileno.

A medida que las tecnologías de llenado en las fábricas de cerveza avanzan a nivel mundial, existe la necesidad de métodos de detección e identificación más rápidos, para evitar incidentes de deterioro por estas bacterias. De hecho, otros estudios académicos desde este punto de vista están actualmente en curso.

AGRADECIMIENTOS

1. A Dios por todas sus bendiciones dadas y por derramar su gracia en mí.
2. A mi familia, por todo su apoyo incondicional en mi desarrollo profesional.
3. Fundación Carolina, por su laborioso trabajo en la obtención de fondos para la dotación de becas a los países hispanoamericanos.
4. Al Ing. Rolando Caro, Vicepresidente de Manufactura de Unión de Cervecerías Peruanas Backus S.A. – Perú, por permitirme cursar este Máster.
5. Al Ing. PhD Dominique Gallo, investigador del Servicio de Sustancias Naturales y de Bioquímica, del Instituto Meurice de Brusellas – Bélgica, por su apoyo en el suministro de la sustancia derivada del lúpulo Tetra® del fabricante Yakima Chief.
6. A la Dra. Christina Schönberger, Presidente de la ASBC (American Society of Brewing Chemist) y Gerente Técnico de Innovaciones de la empresa Joh. Barth & Sohn GmbH & Co., por su apoyo en el suministro de la sustancia derivada del lúpulo Tetrahop Gold® de la marca fabricante a la que representa.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M. and Yamashita, H. (2006). A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *J. Inst. Brew.*, *112*(2), 173–191.
2. Jespersen, L. and Jakobsen, M. (1996). Specific Spoilage Organisms in Breweries and Laboratory Media for Their Detection. *International Journal of Food Microbiology*, *33*, 139-155. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01154-3](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)01154-3).
3. Vriesekoop, K., Krahl, M., Hucker, B. and Menz, G. (2013). 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *J. Inst. Brew.*, *118*, 335-345.
4. McDonnell, G. and Russell, A.D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*, 147-179.
5. Sakamoto, K. and Konings, W.N. (2003). Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, *89*, 105-124. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)
6. Simpson, W.J. (1993). Ionophoric Action of ISO Trans-Humulone on *Lactobacillus brevis*. *Journal of General Microbiology*, *139*, 1041-1045. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-139-5-1041>
7. García-González, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F. and Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, *117* (1), 1-28.
8. Menz, G., Aldred, P. and Vriesekoop, F. (2009). Pathogens in Beer. In: Preedy, V.R., Ed., *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 403-413), Academic Press, Amsterdam. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00039-0>
9. Storgårds, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R. and Suihko, M-L. (2006). Microbial Attachment and Biofilm Formation in Brewery Bottling Plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, *64* (1), 8-15.

10. Vaughan, A., O'Sullivan, T. and Van Sinderen, D. (2005). Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer— A Review. *Journal of Institute of Brewing*, 111, 355-371. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x>
11. Iijima, K., Asano, S., Suzuki, K., Ogata, T., & Kitagawa, Y. (2008). Modified Multiplex PCR Methods for Comprehensive Detection of *Pectinatus* and Beer-Spoilage Cocci. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(10), 2764–2766.
12. Priest, F.G. and Campbell, I. (Eds.) (2003) *Brewing Microbiology*. 3rd Edition, Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, 1-399. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-9250-5>
13. Suzuki, K., Paradh, A.D. and Juvonen, R. (2015) Part Two: Spoilage bacteria and other contaminants. In Hill A.E., Ed. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Wood Head Publication, Cambridge.
14. Back, W., (2005) Brewery. In: Back, W., Ed., *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 10-112.
15. Bokulich, N.A. and Bamforth, C.W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 157-172. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
16. Lee, S.Y., Mabee, M.S. and Jangaard, N.O. (1978) *Pectinatus*, a New Genus of the Family *Bacteriodaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28, 582-594. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-28-4-582>
17. Lee, S. Y. SMMP—A medium for selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* from the brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 52, 115, 1994.
18. Juvonen, R. and Suihko, M.L. (2006) *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., Isolated from Brewery Samples, and Emended Description of the Genus *Pectinatus*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 56, 695-702. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63699-0>
19. Paradh, A., and Hill, E. (2016). Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*, 6, 195-209. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.63020>

20. Chowdhury, I., Watier, D. and, Hornez, J. P. (1995). Variability in survival of *Pectinatus cerevisiiphilus*, strictly anaerobic bacteria, under different oxygen conditions. *Anaerobe*, 1, 151–156.
21. Paradh, A.D., Mitchell, W.J. and Hill, A.E. (2011). Occurrence of *Pectinatus* and *Megasphaera* in the Major UK Breweries. *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 498-506. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00497.x>
22. Schleifer, K.H., Leuteritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchhof, G. and Seidel, R.H. (1990). Taxonomic Study of Anaerobic, Gram-Negative, Rod-Shaped Bacteria from Breweries: Emended Description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and Description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40, 19-27. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-40-1-19>
23. Helander, I.M., Hurme, R., Haikara, A., Moran, A.P., (1992). Separation and characterization of two chemically distinct lipopolysaccharides in two *Pectinatus* species. *J. Bacteriol.*, 174, 3348–3354.
24. Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., Moran, A.P., Helander, I.M., Knirel, Y.A., (1995). Structures of the O-specific polysaccharide chains of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis* lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 232, 552–557.
25. Hutzler, M., Müller-Auffermann, K., Koob, J., Riedl, R. and Jacob F. (2013). Beer spoiling microorganisms – a current overview, *Microbiology Knowledge. Brauwelt International*, 2013 / I, 23-25.
26. Zhang, W.W., Fang, M.X., Tan, H.Q., Zhang, X.Q., Wu, M. and Zhu, X.F. (2012). *Pectinatus brassicae* sp. nov., a Gram-Negative, Anaerobic Bacterium Isolated from Salty Wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2145-2149. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.032144-0>
27. Caldwell, J.M., Juvonen, R., Brown, J. and Breidt, F. (2013). *Pectinatus sottacetoni* sp. nov., Isolated from a Commercial Pickle Spoilage Tank. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 3609-3616. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.047886-0>

28. Marchandin, H., Teyssier, C., Campos, J., Jean-Pierre, H., Roger, F., Gay, B., Carlier, J.-P. and Jumas-Bilak, E. (2009) *Negativicoccus succinicivorans* gen. Nov., sp. Nov., Isolated from Human Clinical Samples, Emended Description of the Family *Veillonellaceae* and Description of *Negativicutes* Classis nov., *Selenomonadales* ord. nov. and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the Bacterial Phylum *Firmicutes*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 1271-1279. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.013102-0>
29. Haikara, A., Pentillä, L., Enari, T., and Lounatmaa, K. (1981). Microbiological, Biochemical, and Electron Microscopic Characterization of a *Pectinatus* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 511-517.
30. Chelack, B. J., Ingledew, W. M., (1987). Anaerobic gram-negative bacteria in brewing – A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 45, 123-127.
31. Paradh, A. (2013). *Pectinatus* and *Megasphaera* RNA Based Novel Detection Method. International Centre for Brewing and Distilling School of Life Sciences Heriot Watt University Edinburgh, UK. Con acceso el 21 de mayo del 2016 en http://www.ros.hw.ac.uk/bitstream/handle/10399/2717/ParadhA_1013_sls.pdf?sequence=1.
32. Juvonen, R. (2009.) DNA-Based Detection and Characterisation of Strictly Anaerobic Beer-Spoilage Bacteria. VTT Publications 723, Helsinki, 1-140.
33. Schisler, D. O., Mabee, M. S., and Hahn, C. W. (1979). Rapid Identification of Important Beer Microorganisms Using Gas Chromatography *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 37(2), 69-76.
34. Lee, S. Y., Mabee, M. S., Jangaard, N.O. and Horiuchi E. K. (1980). *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. *J. Inst. Brew.* 86, 28–30.
35. Lee, S. Y., Moore, S. E. and Mabee, M. S., (1981). Selective-differential medium for isolation and differentiation of *Pectinatus* from other brewery microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2, 386–387.
36. Suzuki, K. (2011). 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 131-155. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x>

37. Matoulkova, D., Kosar, K., Slaby, M., Sigler, K., 2012b: Occurrence and species distribution of strictly anaerobic bacterium *Pectinatus* in brewery plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 70, 262–267.
38. Juvonen, R. (2012). Strictly anaerobic beer-spoilage bacteria with special emphasis on new and emerging species. The 26th Nordic Meeting on Brewing Technology. VTT Technical Research Centre of Finland, con acceso el 10 de mayo del 2016 <http://media.bryggmastare.se/2012/10/Nr-23-Strictly-anaerobic-beer-spoilage-bacteria-with-special-emphasis-on-new-and-emerging-species-Riikka-Juvonen.pdf>
39. Pittet, V., Haakensen, M, Chaban, B. and Ziola, B. (2014). Detection and Identification of *Pectinatus* Brewery Contaminants Based on the Gene for the Major Outer Membrane Protein. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 72 (3), 169-174. <http://dx.doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-0610-02>
40. Matoulková, D., Kubizniaková, P. (2014) Microbiology of brewing – Strictly anaerobic bacteria *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Zymophilus* and *Selenomonas* and methods for their detection. *Kvasny Prum.* 60 (11–12), pp. 285–295
41. Matoulkova et-al. (2011) Patent Application Publication No. S2011/0256584 A1, United States.
42. Haikara, A. and Juvonen, R. (2015). *Pectinatus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–11, con acceso el 12 de mayo del 2016 en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00699/abstract>
43. Motoyama, Y., Ogata, T., and Sakai, K. (1998). Characterization of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *P. frisingensis* by Ribotyping. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 56, 19-23.
44. Chihib, N.E. and Tholozan, J.L. (1999a) Effect of Rapid Cooling and Acidic pH on Cellular Homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a Strictly Anaerobic Beer-Spoilage Bacterium. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 191-202. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00046-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00046-X)
45. Tholozan, J. L., Membre, J. M. and Grivet, J. P., (1997). Physiology and development of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*, two strict anaerobic beer spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 35, 29-39.

46. Flahaut, S., Tierny, Y., Watier, D., Hornez, J.P. and Jeanfils, J. (2000). Impact of Thermal Variations on Biochemical and Physiological Traits in *Pectinatus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 53-61. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00194-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00194-X)
47. Tholozan, J.L. and Jacquemont, J. (1999). Physiological response of *Pectinatus frisingensis*, a beer spoilage bacterium, to mild heat treatments. *Can. J. Micro.*, 45 (7), 598-606.
48. Watier, D., Leguerinel, I., Hornez, J. P., Chowdhury, I. and Dubourguier, H. C. (1995). Heat resistance of *Pectinatus* sp., a beer spoilage anaerobic bacterium. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 164-168.
49. Chowdhury, I., Watier, D., Leguerinel, I. and Hornez, J.P. (1997) Effect of *Pectinatus cerevisiiphilus* on *Saccharomyces cerevisiae*, Concerning Its Growth and Alcohol Production in Wort Medium. *Journal of Food Microbiology*, 14, 265-272. <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1996.0092>
50. Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Salkinoja-Salonen, M. S., 2004: Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – lipopolysaccharides of a gram-positive genus. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 543–552.
51. Chihib, N., Monnerat, L., Membre, J. and Tholozan, J. L. (1999). Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *J. Appl Microbiol* 87, 438–446.
52. Chihib, N-E., Crepin, T., Delattre, G and Tholozan J-L. (1999) Involvement of cell envelope in nisin resistance of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium naturally sensitive to nisin. *FEMS Microbiology Letters*, 177, 167-175.
53. Matoulkova, D., Kosař, K., Sigler, K., 2012: Rapid, simple and specific cultivation-based method for detection of *Pectinatus* sp. In brewery samples. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 70, 29–34.
54. Haikara, A., (1985). Detection of *Pectinatus* contaminants in beer. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 43, 43-46

55. Tholozan, J-L, Grivet, J-P., Vallet, C. (1994). Metabolic pathway to propionate of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Arch Microbiol.*, 162, 401-408.
56. Chaban, B., (2003). Identification and Analysis of the Flagellin and protein from the genus *Pectinatus*. A Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science, University of Saskatchewan Saskatoon. Con acceso el 8 de mayo del 2016 en https://ecommons.usask.ca/bitstream/handle/10388/etd-12112003-115308/Chaban_thesis.pdf
57. Haikara, A., Matilla-Sandholm, T. and Manninen M. (1990). Rapid Detection of Contaminants in Pitching Yeast Using Automated Turbidometry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 48, 92-9.
58. Haikara, A., 1983: Immunological characterization of *Pectinatus cerevisiophilus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1054–1058.
59. Mamvura, T. A., Iyuke, S. E., Cluett, J. D., and Paterson, A. E. (2011). Soil films in the beverage industry: A review. *J. Inst. Brew.*, 117, 608-616.
60. Kumar, C. G., and Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 42, 9-27.
61. Bittner, M., de Souza, A.C., Brozova, M. (2016). Adhesion of anaerobic beer spoilage bacteria *Megasphaera cerevisiae* and *Pectinatus frisingensis* to stainless steel LWT - *Food Science and Technology*, 70, 148-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.044>.
62. Gares, S. L., Whiting, M. S., Ingledew, W. M., Ziola, B., (1993). Detection and identification of *Pectinatus cerevisiophilus* using surface-reactive monoclonal antibodies in a membrane filter-based fluoroimmunoassay. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 51, 158–163.
63. Hill, A.E. (2009) Microbiological Stability of Beer. In: Bamforth, C., Ed., *Beer: A Quality Perspective*, Academic Press, Cambridge, 163-184. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-669201-3.00005-1>
64. Juvonen, R. (2015) Strictly anaerobic Beer Spoilage Bacteria. In: Hill, A.E., Ed., *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising*

- Waste, Wood Head Publication, Cambridge, 195-214.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00009-5>
65. Satokari, R., Juvonen, R., Mallison, K., von Wright, A., and Haikara, A. (1998). Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 45,119-127.
 66. Juvonen, R., Satokari, R., Mallison, K., Haikara, A., (1999): Detection of spoilage bacteria in beer by polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 57, 99–103.
 67. MRS Caldo, fórmula, con acceso el 12 de mayo del 2016 en sitio web
<http://britannialab.com.ar/esp/productos/b02/mrscaldo.htm>
 68. Paradh, A.D., Hill, A.E. and Mitchell, W.J. (2014). Detection of Beer Spoilage Bacteria *Pectinatus* and *Megasphaera* with Acridinium Ester Labelled DNA Probes Using a Hybridisation Protection Assay. *Journal of Microbiological Methods*, 96, 25-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.10.014>
 69. Ogg, J. E., S. Y. Lee, and B. J. Ogg. (1979). A modified tube method for the cultivation and enumeration of anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 26, 987-990.
 70. Dull, C.L., Karr, T., and Kawasaki, M., (1998). SMMP medium for the selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* (ICM). *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 212–124.
 71. Matoulkova, D., (2008). Strictly anaerobic bacteria in beer and in breweries. *Kvasny Prum.*, 54, 338–343.
 72. Analytica Microbiologica EBC capítulo 2011. 4.3.3.2 *Pectinatus* y *Megasphaera*. <http://www.analytica-ebc.com/>
 73. Maëlle Lempereur, Claire Majewska, Amandine Brunquers, et al., “Tetrahydroiso-alpha Acids Antagonize Estrogen Receptor Alpha Activity in MCF-7 Breast Cancer Cells,” *International Journal of Endocrinology*, vol. 2016, Article ID 9747863, 12 pages, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9747863>
 74. Hollerová, I. and Kubizniaková, P. (2001). Monitoring Gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *J. Inst. Brew.*, 107, 355-358.
 75. Storgårds, E., Haikara, A. and Juvonen, R. 2006. Brewing control systems: microbiological analysis. In: Bamforth, C. W. (ed.). *Brewing. New technologies*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited. Pp. 391–426

ANEXOS

ANEXO 1

Modo de inhibición de los factores antimicrobianos, intrínsecos y extrínsecos de la cerveza.

Antimicrobial hurdles	Mode of inhibition
<i>Intrinsic hurdles</i>	
Ethanol	Inhibits cell membrane functionality
Low pH	Affects enzyme activity
Hops	Enhances inhibitory effects of hops Inhibits cell membrane functions
Carbon dioxide	Affects Gram-positive bacteria only Creates anaerobic conditions Lowers pH Affects enzyme activity Affects cell membrane
Low oxygen levels	Creates anaerobic conditions
Lack of nutrients	Starves cells
Sulphur dioxide ^a	Affects various metabolic systems
<i>Processing (extrinsic) hurdles</i>	
Mashing	Causes thermal destruction of cells
Kettle boil	Causes thermal destruction of cells
Pasteurization ^a	Causes thermal destruction of cells
Filtration ^a	Removes cells by physical size exclusion
Bottle conditioning ^a	Creates anaerobic conditions
^a Not applicable to all beers.	

De: Vriesekoop, K., Krahl, M., Hucker, B. and Menz, G. (2013). 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *J. Inst. Brew.*, 118, 335-345.

ANEXO 2

Bacterias alterantes de la cerveza de acuerdo a su tinción y morfología.

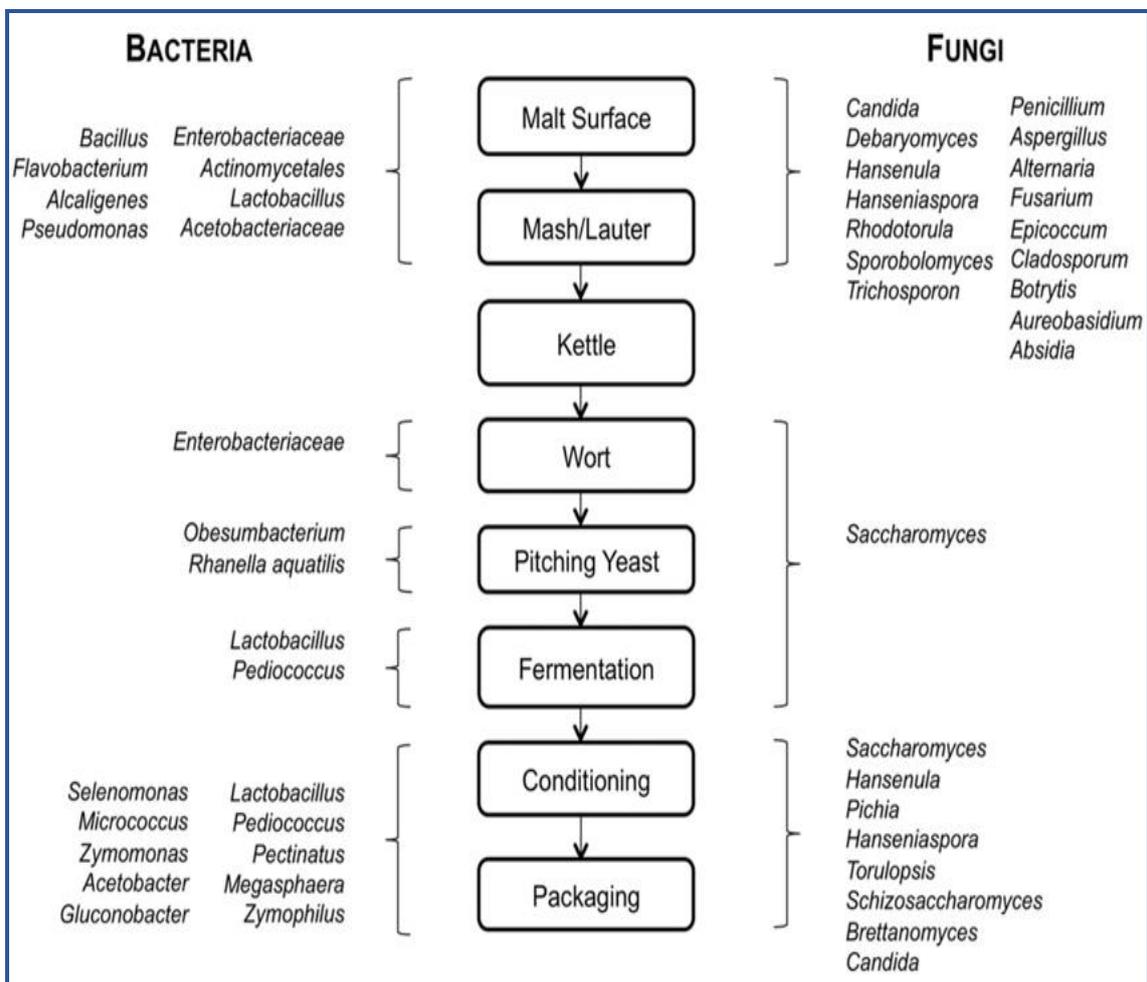
Beer spoilage bacteria		
	Rod-shaped	Cocci
Gram-positive bacteria	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. brevisimilis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryneformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. lindneri</i> <i>Lb. malefermentans</i> <i>Lb. parabuchneri</i> <i>Lb. plantarum</i>	<i>Pediococcus</i> spp. <i>P. damnosus</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. inopinatus</i> <i>Micrococcus</i> sp. <i>M. kristinae</i>
Gram-negative bacteria	<i>Pectinatus</i> spp. <i>P. cerevisiophilus</i> <i>P. frisingensis</i> <i>P. sp. DSM20764</i> <i>Selenomonas</i> sp. <i>S. lacticifex</i> <i>Zymophilus</i> sp. <i>Z. raffinovorans</i>	<i>Megasphaera</i> sp. <i>M. cerevisiae</i> <i>Zymomonas</i> sp. <i>Z. mobilis</i>

De: Sakamoto, K. and Konings, W.N. (2003). Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, 89, 105-124.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)

ANEXO 3

Microbiota del malteado y elaboración de cerveza.

Visión general de las especies bacterianas y fúngicas en las etapas principales de la cervecería.



De: Bokulich, N.A. and Bamforth, C.W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 157-172.
<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>

ANEXO 4

Ácidos orgánicos en cervezas normales y en cervezas contaminadas con *Pectinatus* sp.

Organic Acids in Normal and <i>Pectinatus</i>-Contaminated Beers^a		
Organic Acid	Normal Beer (mg/L)	Contaminated Beer (mg/L)
Gluconic acid	29 ^b	14
Pyroglutamic acid	115	96
Lactic acid	58	42
Acetic acid	90	221
Pyruvic acid	50	...
Malic acid	65	...
Propionic acid	22	933
Citric acid	104	...
Succinic acid	38	241

^aFrom Takahashi 1983 (24).
^bFinal cell concentration approximated to be only 10⁵/ml.

De: Chelack, B. J., Ingledew, W. M., (1987). Anaerobic gram-negative bacteria in brewing – A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 45, 123-127.

ANEXO 5

Descripción de *Pectinatus cerevisiiphilus*.

P. cerevisiiphilus Pec.ti.na'tus. L. part. adj. *Pectinatus* combed; N.L. masc. n. *Pectinatus* combed (bacteria).

La pared celular es gram-negativa, son bacilos ligeramente curvados o helicoidales, que tienen de 0,4 a 1,0 mm de diámetro y de 2 a 50 micras o más, con extremos redondeados. Se encuentran individualmente, en parejas o, rara vez en cadenas cortas. La aparición de filamentos helicoidales, más largos es característico de las células más viejas. Las células son generalmente móviles por medio de peine flagelación que emana de un solo lado de una célula. Estos organismos son estrictamente anaerobios mesófilos, no formador de esporas, con un metabolismo tipo fermentativo. Las células no sintetizan citocromo oxidasa, desulfovirdina o indol, hidroliza la arginina o licuan o reducir el nitrato. No producen catalasa. Producen H₂S y acetoína y en cantidades menores a ácido succínico y láctico. Las colonias son circulares, enteras, de color beige a blanco, brillantes y opacas. La temperatura óptima de crecimiento es 30 °C. La glucosa y la fructosa son metabolizadas principalmente a ácido acético y propiónico. Cadaverina o putrescina se encuentra en el peptidoglicano de la pared celular, directamente reticulado con ácido meso-diaminopimélico. Los lípidos F también se encuentran como un compuesto celular característico. El contenido de G + C del ADN es 38 a 41% en moles. Las especies del género pueden ser separados el uno del otro mediante el uso de varios criterios genéticos y fenotípicos. Aislado de la cerveza empacada en mal estado, los entornos de cervecería, las aguas residuales y los procesos de elaboración de la cerveza. Según la estructura de la envoltura celular, la tinción es un intermedio entre bacterias Gram positiva y bacteria Gram-negativas. Las células jóvenes móviles formar una "X" durante el movimiento mientras que las células viejas tienen movimientos de serpiente.

De: Lee et al., 1978, Schleifer et al., 1990, Juvonen 2006, Caldwell 2013, Haikara 2015. (16, 18, 22, 27, 42)

ANEXO 6

Descripción de *Pectinatus frisingensis*

Pectinatus frisingensis (fri.sin.gen'sis. L. adj. *frisingensis*, of *Frisinga*, del nombre latín Freising, una ciudad en la República Federal de Alemania donde el organismo fue aislado). Estrictamente anaeróbicos, generalmente móviles, bacilos no esporulantes gram-negativos. Las células son ligeramente curvadas y se presentan predominantemente como células individuales o, a veces en pares. Son 0,7 a 0,9 por 3 a 20 micras. La aparición de filamentos más largos, ligeramente helicoidales es característico para cultivos viejos. Las colonias en agar MRS modificado son brillantes, opacas, circulares, de color ligeramente amarillo, y de 1 a 2 mm de diámetro después de 3 días a 30 °C. La temperatura óptima de crecimiento es 30 ° C. La glucosa es fermentada a ácido acético y ácido propiónico, acetoina, y a veces en cantidades menores de ácido succínico. *P. frisingensis* se puede distinguir de *P. cerevisiophilus* por su capacidad para fermentar celobiosa, inositol, y N-acetil-glucosamina y su incapacidad para utilizar xilosa y melibiosa.

De: Scheifel 1990 ⁽²²⁾

ANEXO 7

Descripción de *Pectinatus haikarae*

Pectinatus haikarae (hai.ka'rae. N.L. gen. fem. n. *haikarae* de Haikara, nombrado por las tantas contribuciones a la caracterización y detección de las especies de *Pectinatus* por Dr Auli Haikara. Las células son bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas, bacilos rectos o ligeramente curvados y flexibles con extremos redondeados, 0,6-0,8 x 3-50 mm o más en tamaño. Por lo general, se presentan aisladas y, ocasionalmente en pares. Las células en fase estacionaria, pueden formar filamentos helicoidales largos y formaciones redondas y en forma de bucle con extremos distendidos. Las células jóvenes son móviles, siguiendo un patrón similar a la letra X. Las células viejas exhiben movimientos lentos, con forma de serpiente o no tienen movilidad. Estrictamente anaeróbica. Crece a 15-30 °C: pero no a 10 ó 37 °C, siendo el óptimo entre 20 y 30 °C. Un buen crecimiento se obtiene en medios PYF, PYG, MRS y SMMP a 1-2 días a 30 °C. Las colonias en placas PYG PYF a 3 días a 30 °C, son convexas a piramidal, brillantes, opacas, crema a gris en color y circular con bordes enteros y un diámetro de 0,5-2,5 mm. Los principales productos de la fermentación de fructosa son los ácidos propiónico y acético. También produce acetoina y H₂S.

De: Juvonen 2006 ⁽¹⁸⁾.

ANEXO 8

Crecimiento de *Pectinatus* y *Megasphaera* en diferentes cervezas.

Variable/ Bacteria	Beer Variety					
	Diet Pilsner	Old Beer	Light Full Beer	Yeastless Wheat Beer	Export	Light Doppelbock
°Plato	8.4	11.8	11.6	12.7	12.7	18.4
Alcohol, % w/v	3.5	3.5	3.9	4.0	4.3	6.5
Bittering units	23.6	27.3	27.8	13.4	30.4	32.8
pH	4.75	4.00	4.49	4.39	4.42	4.53
<i>Pectinatus</i>						
<i>cerevisiophilus</i>	+2 ^b	+ >14	+4	+7	+7	-14
MKP 1	+4	+ >14	+4	+4	+7	-28
MKK 1	+5	-28	+4	+4	+7	-28
Wa/1b	+3	-28	+4	+4	+5	-14
<i>Megasphaera</i>						
sp. III 2e	+14	-14	+4	+4	+14	-28
sp. V ₁	+14	-28	+4	+10	+14	-28
<i>elsdenii</i>	-28	-14	-28	-28	-28	-28

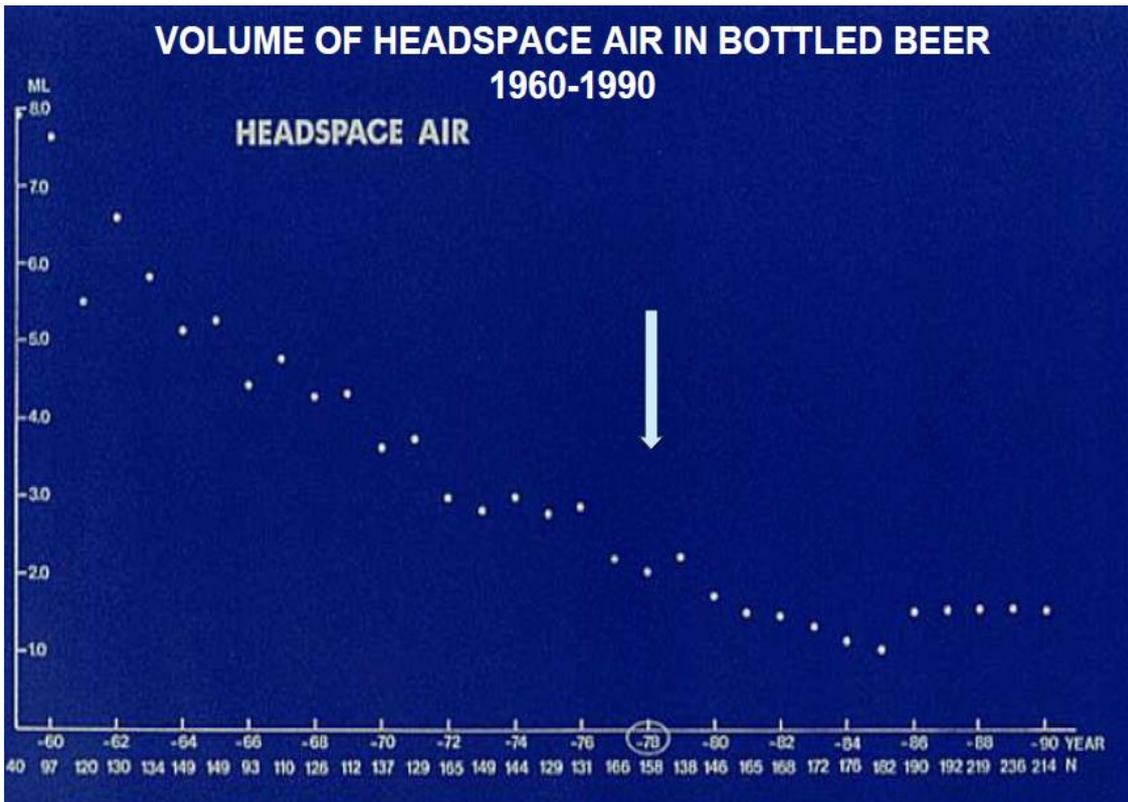
^a From Seidal et al 1979 (23).

^b + = Growth, - = no growth; the numbers following the ± indicator give the number of days after the inoculation where the strongest multiplication occurred or, in the negative case, when the test was interrupted. The various *Pectinatus* and *Megasphaera* isolates used were given test numbers as their exact species were not determined.

De: Chelack, B. J., Ingledew, W. M., (1987). Anaerobic gram-negative bacteria in brewing – A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 45, 123-127.

ANEXO 9

Evolución del volumen de la cámara de aire en las botellas de le cerveza desde 1960 – 1990.



De: Juvonen, R. (2012). Strictly anaerobic beer-spoilage bacteria with special emphasis on new and emerging species. The 26th Nordic Meeting on Brewing Technology. VTT Technical Research Centre of Finland, con acceso el 10 de mayo del 2016 <http://media.bryggmastare.se/2012/10/Nr-23-Strictly-anaerobic-beer-spoilage-bacteria-with-special-emphasis-on-new-and-emerging-species-Riikka-Juvonen.pdf>

ANEXO 10

Puntos de muestreo y % de muestras positivas en envasado.

Sample area	Sampling sites	% of <i>Pectinatus</i> positive samples	Total number of samples		
Conveyor belt	Before monoblock	Surface of conveyor belt ^b	75		
		Side ledge of the conveyor belt cover ^{a,b}	65		
		Stainless steel conveyor belt cover – inside part ^{a,b}	56		
		Conveyor belt construction and brackets ^{a,b}	50		
		Driving rollers underneath the conveyor belt ^b	48		
		Bundles of cable lines underneath the conveyor belt ^{a,b,c}	36		
		Plastic sleeves ^{a,b}	38		
	After monoblock	Conveyor belt construction stand ^{a,b}	38		
		Conveyor belt surface ^a	110		
		Side ledge of conveyor belt cover ^{a,b}	65		
		Stainless steel conveyor belt cover – inside part ^{a,b}	86		
		Conveyor belt – from underneath ^a	44		
		Driving rollers underneath the conveyor belt ^b	62		
		Bundles of cable lines underneath the conveyor belt ^{a,b}	36		
		Plastic sleeves ^{a,b}	32		
		Conveyor belt construction stand ^{a,b}	40		
		Monoblock	Construction	Monoblock bench ^b	139
				Surface of piping below monoblock bench ^{a,b}	52
Monoblock construction struts ^{a,b}	48				
Cable channel underneath the monoblock bench ^{a,b}	52				
Brackets of piping and cables underneath the monoblock bench ^{a,b}	62				
Engine cover ^{a,b}	42				
Inside surface of stainless steel (or Plexiglas) side covers of monoblock ^b	26				
Filler	Inlet star		– stainless steel hub ^b	89	
			– framework ^b	75	
			– shaft ^b	46	
		Filling tubes ^b	56		
		Centering bells ^b	42		
		Filler frames ^b	35		
		Filler pantographs ^b	29		
		Outlet star – stainless steel hub ^b	51		
		Outlet star - framework ^b	49		
	Outlet star - lateral frame struts ^b	36			
	Crownner	Outlet star - shaft ^b	43		
		Capping heads ^b	76		
		Crownner framework ^b	52		
Bottle stands ^b		82			
Floor	Crownner star ^b	85			
	Crownner shaft ^b	48			
	Floor underneath the monoblock and the conveyor belt ^{a,b,c}	65			
	Floor cracks ^{a,b,c}	50			
	Crumbling floor joints ^{a,b,c}	42			
Sewers – sewage system ^{a,b,c}	36.5				

^a Biofilm formation.

^b Beer/water residues.

^c Mechanical impurities.

De: Matoulkova, D., Kosař, K., Slaby, M., Sigler, K., 2012: Occurrence and species distribution of strictly anaerobic bacterium *Pectinatus* in brewery plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 70, 262–267.

ANEXO 11

Biopelículas en cervecería positivas a *Pectinatus*.



Fig. 1. Biofilm on the side ledge of the conveyor belt cover.



Fig. 3. Biofilm on construction elements in the monoblock and conveyor belt sampling area.



Fig. 2. Biofilm and impurities on the bundles of cable lines underneath the conveyor belt.

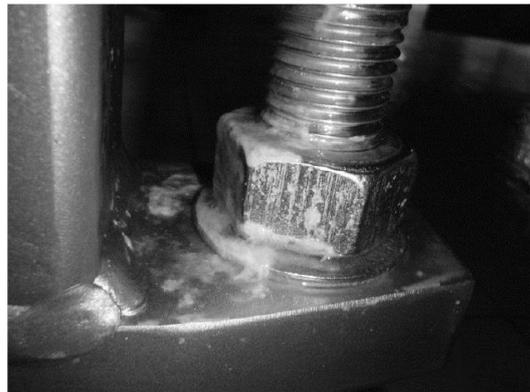


Fig. 4. Biofilm on construction elements in the monoblock and conveyor belt sampling area.



Fig. 5. Biofilm on the surface of pneumatic valve beside the filler.



Fig. 6. Biofilm on a release ledge of filling valves in the filler release area – the site is beyond the reach of central foaming system.

De: Matoulkova, D., Kosař, K., Slaby, M., Sigler, K., 2012: Occurrence and species distribution of strictly anaerobic bacterium *Pectinatus* in brewery plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 70, 262–267.

ANEXO 12

Ejemplos de medio de cultivo para la detección de bacterias alterantes de la cerveza.

Media	Bacteria	Recommended by ^a
MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)	LAB ^b	EBC, ASBC, BCOJ
Raka-Ray	LAB, G(-) ^c	EBC, ASBC, BCOJ
VLB S7-S (Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin)	LAB	EBC, BCOJ
HLP (Hsu's <i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i> medium)	LAB	EBC, BCOJ
WLD (Wallerstein Differential)	LAB	EBC, BCOJ
Nakagawa	LAB	EBC, BCOJ
SDA (Schwarz Differential Agar)	LAB	EBC, BCOJ
Concentrated MRS	G(-)	EBC, BCOJ
PYF (Peptone, Yeasts extract and Fructose)	G(-)	EBC, BCOJ
Thioglycolate Medium	G(-)	EBC
LL-Agar	G(-)	EBC, BCOJ
UBA (Universal Beer Agar)	LAB, G(-)	EBC, ASBC, BCOJ
NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakteriën)	LAB, G(-)	EBC, BCOJ
Brewer's Tomato Juice Medium	LAB, G(-)	ASBC
LMDA (Lee's Multi-Differential Agar)	LAB	ASBC
BMB (Bamey-Miller Brewery Medium)	LAB	ASBC
SMMP (Selective Medium for <i>Megasphaera</i> and <i>Pectinatus</i>)	G(-)	ASBC, BCOJ

^a EBC, European Brewery Convention; ASBC, American Society of Brewing Chemists; BCOJ, Brewery Convention of Japan.

^b LAB, lactic acid bacteria.

^c G(-), Gram-negative bacteria.

De: Sakamoto, K. and Konings, W.N. (2003). Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, 89, 105-124.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)

ANEXO 13

Fórmula del medio MRS

Fórmula (en gramos por litro)	
Proteosa peptona N° 3	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05

MRS Caldo, fórmula, con acceso el 12 de mayo del 2016
<http://britannialab.com.ar/esp/productos/b02/mrscaldo.htm>

ANEXO 14

Fórmula del medio NBB modificado

Composition of modified NBB medium	
Casein peptone	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
Meat extract	2.0 g
Tween-80	0.5 ml
Potassium acetate	6.0 g
Sodium phosphate, dibasic	2.0 g
L-Cysteine monohydrochloride	0.2 g
Chlorophenolred	70 mg
Glucose	15 g
Maltose	15 g
L-Malic acid	0.5 g
Agar	15 g
Beer/distilled water (1:1), ad	1000 ml
Final pH	5.8

Kindraka, 1987.

De: Jespersen, L. and Jakobsen, M. (1996). Specific Spoilage Organisms in Breweries and Laboratory Media for Their Detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 139-155. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01154-3](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)01154-3)

ANEXO 15

Fórmula del agar LL

0,5% de extracto de levadura, 0,3% de extracto de carne
1,7% de lactato de sodio [60% de jarabe], 0,1% ácido ascórbico,
0,01% Na₂S₂O₃·5H₂O, 0,02% de acetato de plomo,
0,0002% de azul de metileno, 0,2% de alcohol feniletilo,
1,5% de agar.

De: Lee, S. Y., Moore, S. E. and Mabee, M. S., (1981). Selective-differential medium for isolation and differentiation of *Pectinatus* from other brewery microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2, 386–387.

ANEXO 16

Fórmula del medio SMMP

Basal medium modified

Yeast extract (Difco 0127, or equiv.).....75 g
Bacto-Peptone (Difco 0118, or equiv.)75 g
DL-Lactic acid sodium salt (60% syrup).....75 mL
Sodium thioglycollate0.75 g
L-Cysteine HCL0.75 g
Dipotassium phosphate, K₂HPO₄·3H₂O.....7.5 g
Potassium phosphate, KH₂PO₄.....7.5 g
Sodium chloride, NaCl7.5 g
Ammonium phosphate, (NH₄)₂HPO₄..... 7.5 g
Sodium acetate, NaC₂H₃O₂·3H₂O..... 7.5 g
Distilled water..... 736 mL

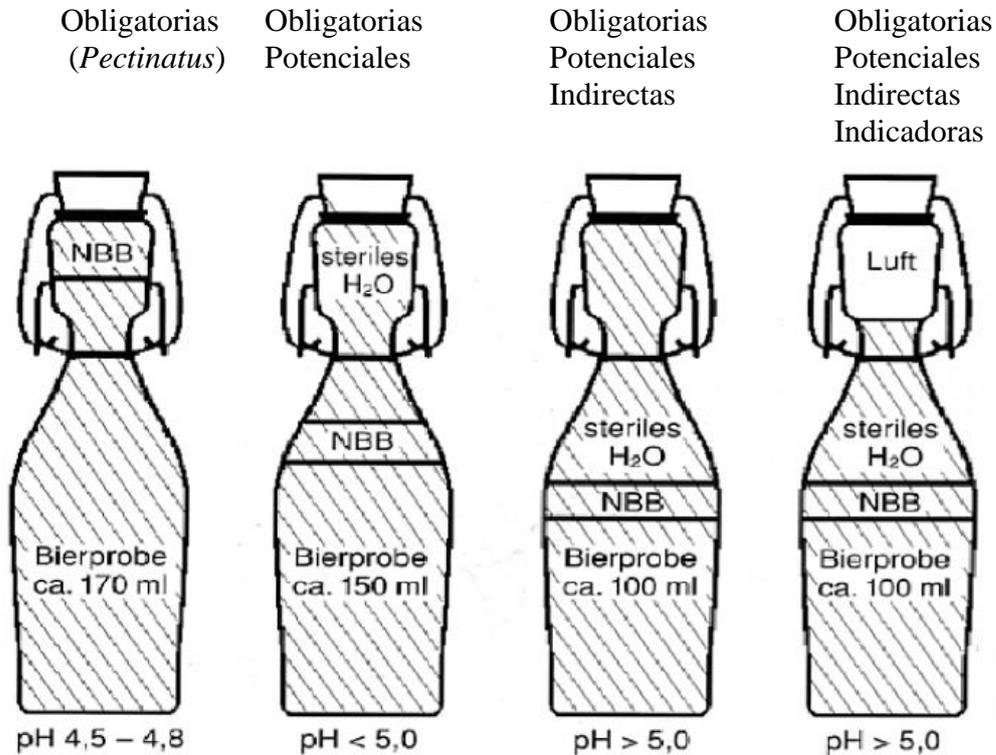
Selective stock solution modified

Sodium fusidate (Sigma F0881).....0,75 g
Cycloheximide (Sigma C7698, or equiv.)..... 0.6 g
Crystal violet (Sigma C6158, or equiv.).....0.15 g
Absolute ethanol..... 100 mL

De: Lee, S. Y. SMMP—A medium for selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* from the brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 52, 115, 1994.

ANEXO 17

Pruebas con NBB-C



De: Back, W., (2005) Brewery. In: Back, W., Ed., *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 10-112.

ANEXO 18

Fórmula del medio MRS-T

Component	Amount
MRS broth	According to the instructions of producer
Sodium thioglycolate	0.25 g
Cysteine hydrochloride	0.25 g
Tetrahydroiso- α -acids	50 mg
2-Phenylethanol	0.15%
Agar bacteriological	0.2%
Distilled water	1,000 mL
Final pH	6.5

De: Matoulkova, D., Kosař, K., Sigler, K., 2012a: Rapid, simple and specific cultivation-based method for detection of *Pectinatus* sp. In brewery samples. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 70, 29–34.

ANEXO 19

Frecuencia de Aislamiento de Bacterias Gram positivas en 4 cervecerías (A, B, C y D)

	Number of isolates			
	A	B	C	D
<i>L. brevis</i>	11	11	14	25
<i>L. plantarum</i>	3	7	6	14
<i>L. collinoides</i>	4	4	3	7
<i>L. buchneri</i>	1	2	3	5
<i>L. para. paracasei</i>	0	1	3	4
<i>L. fructivorans</i>	0	0	1	1
<i>Leuc. mesenteroides</i>	0	0	1	1
<i>Pediococcus sp.</i>	1	1	5	6
<i>Ped. damnosus</i>	1	1	0	1

A Isolates of bacteria from spoiled beer after 3 weeks.
B Isolates of bacteria from spoiled beer after 8 weeks.
C Isolates which did not spoil beer.
D Total number of isolates.

De: Hollerová, I. and Kubizniaková, P. (2001). Monitoring Gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *J. Inst. Brew.*, 107, 355-358.

ANEXO 20

Características microbiológicas de las cepas utilizadas

Microbiological characteristics	Rods/Cocci	Gram	Catalase	Beer spoilage potencial	Hop tolerance	Ethanol tolerance	Growth at pH=4.3	Primary (p)/secondary (s) contamination	Observed slime formation of brewery isolates
<i>L. brevis</i>	Rods	Positive	Negative	++	++	++	+	s>p	Positive
<i>P. damnosus</i>	Cocci	Positive	Negative	++	++	+	+	p>s	Negative
<i>Pec. cerevisiophilus</i>	Rods	Negative	Negative	++	++	+	-/+	s	Negative
<i>Pec. frisingensis</i>	Rods	Negative	Negative	++	++	+	-/+	s	Negative
<i>Pec. haikarae</i>	Rods	Negative	Positive	++	++	+	-/+	s	Negative

L = Lactobacillus, P = Pediococcus, Pec= Pectinatus.
 ++=very high/strong. +=strong/high, -/+ negative tendency or few strains or strong adaptation necessary.

De: Hutzler, M., Müller-Auffermann, K., Koob, J., Riedl, R. and Jacob F. (2013). Beer spoiling microorganisms – a current overview, *Microbiology Knowledge. Brauwelt International*, 2013 / 1, 23-25.