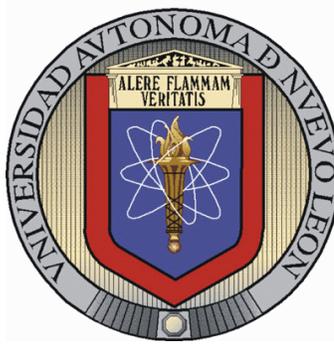


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



“DETECCIÓN MOLECULAR DE *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Pectinatus* spp. Y *Megasphaera* spp. EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA”

TESIS COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACION EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA:

JORGE HUGO GARCÍA GARCÍA

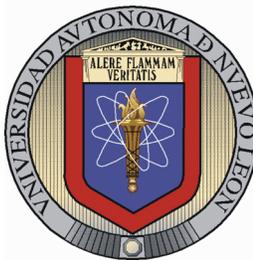
SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

OCTUBRE 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



“DETECCIÓN MOLECULAR DE *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Pectinatus* spp. Y *Megasphaera* spp. EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA”

COMISIÓN DE TESIS

Presidente

Dr. Benito Pereyra Alférez

Secretario

Dr. José María Viader Salvadó

Vocal

Dr. Luis J. Galán Wong

Vocal

Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos

Vocal

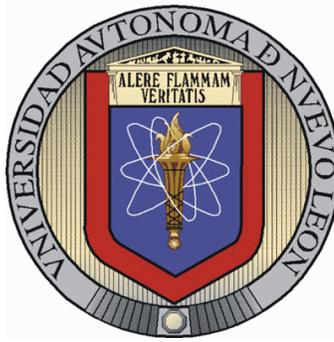
Dr. Carlos Fransisco Sandoval Coronado

Asesor Externo

Dr. Luis Cástulo Damas Buenrostro

Cd. Universitaria

Octubre de 2012



“DETECCIÓN MOLECULAR DE *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Pectinatus* spp. Y *Megasphaera* spp. EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA”

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio L4 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León así como también en el Laboratorio de Microbiología de la Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma bajo la dirección y asesoría del Dr. Benito Pereyra Alférez y la asesoría del Dr. Luis Cástulo Damas Buenrostro.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mi familia por el apoyo que me brindaron en mi decisión de continuar mis estudios más allá de la carrera profesional ya que sin este apoyo no hubiese podido realizar este posgrado.

Agradezco al Dr. Benito Pereyra Alférez por aceptarme en su equipo de trabajo y por guiarme durante todo el proceso, también a Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma por proporcionar el material para este estudio y al Dr. Luis Damas Buenrostro por asesorarme en todos los aspectos del proceso cervecero.

También quiero agradecer a mí ahora esposa Erika Marlen Martínez Montalvo por estar conmigo y apoyarme a lo largo de mis estudios de posgrado y darme todo su amor.

DEDICATORIA

Este trabajo lo realice pensando siempre en mi esposa Erika

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
Página de Título	I
Comisión de Tesis	II
Lugar de Trabajo	III
Agradecimientos	IV
Dedicatoria	V
Índice de contenido	VI
Lista de tablas	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de abreviaturas	XI
Resumen	XII
1.- Introducción	1
2.- Definición del problema y justificación	3
3.- Hipótesis	4
4.- Objetivo general	4
5.- Objetivos específicos	4
6.- Antecedentes	5
Incidentes de contaminación en cerveza	5
<i>Lactobacillus</i> y <i>Pediococcus</i>	6
<i>Pectinatus</i> y <i>Megasphaera</i>	8
Habilidad de los microorganismos para crecer en cerveza	10
Fuentes de contaminación	14
Detección de bacterias en la cerveza	16
7.- Materiales y Métodos	20
Cepas de referencia	20
Medios de cultivo	20
Preparación de la técnica de qPCR	21
Estandarización de la técnica de qPCR	23

Detección e identificación de <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Pectinatus</i> y <i>Megasphaera</i> en muestras de proceso	23
8.- Resultados	25
Observación microscópica de cepas de referencia	25
Cinéticas de crecimiento	26
Estandarización de qPCR	31
Análisis de muestras del ambiente cervecero	37
9.- Discusión	41
10.- Conclusiones	46
11.- Literatura citada	48

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
I	Porcentajes de microorganismos contaminantes de cerveza en reportes de incidentes en el periodo de 1980 a 2002	5
II	Configuración general y programas para el uso del estuche Foodproof® Beer Screening de Bioteccon Diagnostics en el LigthCycler 480 II de Roche	22
III	Componentes para la preparación de las reacciones del estuche Foodproof® Beer Screening de Bioteccon Diagnostics	23
IV	Detección de <i>Pediococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> por qPCR a distintas concentraciones de células	31
V	Comparación del Tm de las cepas de referencia con el Tm reportado para las mismas	36
VI	Resultados de qPCR para las muestras del ambiente cervecero	37
VII	Total de muestras positivas para cualquiera de las cuatro bacterias de interés en cada uno de los medios de cultivo	39
VIII	Porcentaje de muestras positivas para cada bacteria detectada	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pagina
1	Morfología microscópica de cepa de referencia para <i>Lactobacillus</i> ; a) observación a 100x, b) observación a 40x	25
2	Morfología microscópica de cepa de referencia para <i>Pediococcus</i> ; a) observación a 100x, b) observación a 40x	25
3	Morfología microscópica de cepa de referencia para <i>Megasphaera</i> ; a) observación a 100x, b) observación a 40x	26
4	Morfología microscópica de cepa de referencia para <i>Pectinatus</i> ; a) cultivo fase exponencial a 40x, b) cultivo fase estacionaria a 40x	26
5	Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C	27
6	Observación microscópica a 40x de <i>Lactobacillus</i> ; a) cultivo en CLBM a 2 días, b) cultivo en CLBM a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días	27
7	Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus</i> en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C	28
8	Observación microscópica a 40x de <i>Pediococcus</i> ; a) cultivo en CLBM a 2 días, b) cultivo en CLBM a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días	28
9	Cinética de crecimiento de <i>Megasphaera</i> en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C	29
10	Observación microscópica a 40x de <i>Megasphaera</i> ; a) cultivo en CLBM a 2 días, b) cultivo en CLBM a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días.	29
11	Cinética de crecimiento de <i>Pectinatus</i> en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C	30
12	Observación microscópica a 40x de <i>Pectinatus</i> ; a) cultivo en	30

CLBM a 2 días, b) cultivo en CLBM a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días.

13	Curva de amplificación de la cepa de referencia para <i>Pediococcus</i>	32
14	Curva de amplificación de la cepa de referencia para <i>Lactobacillus</i>	32
15	Temperatura de fusión (Tm) para la cepa de referencia de <i>Pediococcus</i> ; a) Tm de muestras con menos de 1×10^5 células/ml, b) Tm de muestras con más de 1×10^6 células/ml	33
16	Temperatura de fusión (Tm) para la cepa de referencia de <i>Lactobacillus</i> ; a) Tm de muestras con menos de 1×10^6 células/ml, b) Tm de muestras con más de 1×10^7 células/ml	34
17	Temperatura de fusión (Tm) para la cepa de referencia de <i>Megasphaera</i> ; a) Tm de muestras con menos de 1×10^5 células/ml, b) Tm de muestras con más de 1×10^6 células/ml	35
18	Temperatura de fusión (Tm) para la cepa de referencia de <i>Pectinatus</i>	36

ABREVIATURAS

ABC	Transportador multidrogas de casete de unión a ATP
ALT	ácidos lipoteicoicos
BAL	Bacterias ácido lácticas
CP	Crossing Point, ciclo de la amplificación en el cual el aumento de la florescencia es exponencial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBC	Convención europea de cerveceros
Fig.	Figura
Figs	Figuras
H	Horas
Kb	Kilo pares de bases
Min	Minutos
MRS	Medio de cultivo Man, Ragoza, Sharpe
NBB	Medio de cultivo Nachweismedium für bierschädliche Bakterien
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa o en tiempo real
Tm	Melting Temperature, temperatura a la cual las sondas del qPCR se encuentran unidas a su sitio blanco en el fragmento amplificado
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

La cerveza posee características desfavorables para el crecimiento de muchos microorganismos, además contiene lúpulo, que se añade para dar el sabor amargo. Los compuestos del lúpulo presentan actividad antimicrobiana lo que confiere una defensa adicional contra bacterias. A pesar de esto, algunas si logran crecer. Estos microorganismos pueden causar un incremento en la turbidez y cambios sensoriales en la cerveza. El número de especies que podemos encontrar en la cerveza es relativamente pequeño, pero pueden contaminar cualquier etapa del proceso y muchas veces es difícil saber de dónde proviene la contaminación. Sin embargo, podemos usar una técnica de detección rápida, como el qPCR, para conocer el inicio y desarrollo de la contaminación en el proceso y poder así tomar medidas preventivas. El objetivo general de este trabajo fue Detectar, identificar y conocer la frecuencia de contaminaciones de bacterias de los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* en procesos de elaboración de cerveza. Para llevar esto a cabo, tomamos muestras del ambiente cervecero y las muestras se enriquecieron en dos medios de cultivo diferentes (NBB-C y MRS modificado) en donde encontramos que el medio MRS modificado nos proporciona un aumento en el número de células más rápido en las cuatro cepas de interés, teniendo células suficientes para el análisis por qPCR en menos de 3 días. Seguido a esto, realizamos la detección e identificación de microorganismos por qPCR a 36 las muestras del ambiente cervecero. De las 36 muestras analizadas, 29 resultaron positivas, 28 en medio MRS modificado y 8 en medio NBB, siendo *Lactobacillus* la bacteria encontrada con mayor frecuencia con 75.9%, seguido de *Pediococcus* con 24.1% y por ultimo *Pectinatus* con 6.9%. No se encontró ninguna muestra contaminada con *Megasphaera*.

INTRODUCCIÓN

La cerveza ha sido reconocida, desde hace cientos de años, como una bebida segura ya que posee muy buena estabilidad microbiológica. La razón es que la cerveza es un medio con características desfavorables para el crecimiento de muchos microorganismos debido a la presencia de etanol (0.5 a 10 % p/p), el alto contenido de dióxido de carbono, un bajo pH (3.8 a 4.7), contenido reducido de oxígeno y solo trazas de sustancias nutritivas como glucosa y maltosa. Adicionalmente, el lúpulo proporciona, principalmente, los iso- α -ácidos, los cuales presentan actividad antimicrobiana (Richards y MacRae. 1964). A pesar de estas características desfavorables para los microorganismos, algunas bacterias no patógenas si logran crecer (Fernández y Simpson. 1993). Estos microorganismos pueden causar un incremento en la turbidez y cambios sensoriales en la cerveza debido a la producción de compuestos secundarios. Estos cambios afectan negativamente la calidad final del producto, lo que resulta en pérdidas financieras para las empresas.

Debido al ambiente restrictivo de la cerveza no muchos microorganismos pueden crecer en ella (Back. 1994; Susuki *et al.*, 2003), pero su proceso de elaboración es propenso al crecimiento de microorganismos debido al ambiente rico en nutrientes del mosto y al tiempo de producción relativamente largo desde la preparación del mosto hasta el embotellado (Haikara. 1992), incluyendo las fermentaciones de hasta varias semanas, esto da el tiempo suficiente para el desarrollo de microorganismos no deseados. Entre los microorganismos capaces de crecer en cerveza, los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera*, son considerados los más perjudiciales para las cerveceras, especialmente en términos de frecuencia de contaminación y en los efectos negativos en el perfil de sabores de la cerveza. (Back. 2005; Dworkin *et al.*, 2006; Iijima *et al.*, 2008).

La contaminación bacteriana del proceso cervecero se puede dividir en dos tipos; a) contaminación primaria, originándose de las levaduras o el mosto y b) contaminación secundaria, originándose en el envasado. Las contaminaciones secundarias son

responsables de la mitad de los incidentes en cervecerías que no utilizan pasteurización en túnel, pero las consecuencias de las contaminaciones primarias con o sin pasteurización pueden ser mucho más desastrosas (Back. 1997).

Las principales fuentes de contaminación son la inoculación de las levaduras y el uso de botellas retornables con poca sanitización (Back. 1994). Otros puntos de entrada para contaminación incluyen instrumentos de medición, válvulas, tuberías de gas (condensación) y superficies desgastadas donde se puedan acumular los microorganismos (Paier y Ringhofer. 1997). Además todos los puntos de contacto con botellas limpias vacías o llenas pero sin sellar son posibles fuentes de contaminación, principalmente el llenador y el sellador (Back. 1994).

Para asegurar la calidad del producto, es necesario detectar a los microorganismos contaminantes lo antes posible, pero los métodos de detección convencionales toman mucho tiempo, que va desde una semana para las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Pediococcus*, hasta de 3 a 4 semanas para las bacterias anaeróbicas *Megasphaera* y *Pectinatus* (Haikara. 1991). Por lo tanto, la detección de estos microorganismos antes de que el producto esté terminado es muy difícil. La alternativa más viable y segura es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con esta técnica podremos detectar e identificar rápidamente a los microorganismos que alteran la cerveza (Tsuchiya *et al.*, 1992; DiMichele y Lewis. 1993; Suzuki *et al.*, 2005; Iijima *et al.*, 2008; Postollec *et al.*, 2011).

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Aun y cuando la cerveza es una bebida microbiológicamente estable y libre de patógenos, existen incidentes de contaminación microbiológica en la industria cervecera, lo que causa alteraciones al aspecto y sabor de esta bebida, disminuyendo drásticamente la calidad del producto y por consecuencia generando pérdidas para la empresa. Estas alteraciones son causadas principalmente por bacterias de los géneros, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera*. Estos cuatro géneros son responsables de más del 90% de los casos de contaminación en Europa por lo que se consideran los principales agentes de alteración del producto en la industria cervecera (Suzuki. 2011).

Para asegurar la calidad de la cerveza, es necesario detectar e identificar a estos microorganismos contaminantes lo antes posible para así tomar medidas correctivas y preventivas para procesos posteriores. La detección temprana es posible actualmente con el uso de técnicas moleculares como la PCR cuantitativa (qPCR) (Suzuki *et al.*, 2005; Haakensen *et al.*, 2008; Iijima *et al.*, 2008; Postollec *et al.*, 2011). Por lo que adaptamos una técnica existente de qPCR para su uso en la detección e identificación de bacterias contaminantes en procesos de elaboración de cerveza.

Además de la detección temprana, es necesario conocer la distribución de los cuatro géneros, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera*, en los procesos de elaboración de cerveza para contar con más herramientas y conocimiento para prevenir futuras contaminaciones del proceso.

HIPÓTESIS

El uso de la qPCR aplicada al proceso de elaboración de cerveza permite la detección e identificación de géneros bacterianos de importancia en la calidad de la cerveza, así como también dá a conocer su distribución y prevalencia en el proceso de elaboración de cerveza.

OBJETIVO GENERAL

Detectar, identificar y conocer la frecuencia de contaminaciones de bacterias de los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* en procesos de elaboración de cerveza.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar identificación morfológica de las cepas de referencia.
- 2) Comparar el crecimiento de las cepas de referencia para *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* en dos medios de enriquecimiento distintos, MRS modificado (CLBM) y NBB-C.
- 3) Establecer el número mínimo de células que se pueden detectar con el método de qPCR a utilizar.
- 4) Definir los patrones de las curvas de temperatura de fusión de las cepas de referencia para la identificación de bacterias en muestras positivas.
- 5) Realizar la detección e identificación por qPCR de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* en muestras de producción.

ANTECEDENTES

Incidentes de contaminación de cerveza

Más del 90 % de los incidentes de contaminación microbiológica de cerveza en Europa es causado por *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* (Susuki, 2011). En el periodo de 1980 a 2002, el 60 a 90 % de las contaminaciones reportadas en Europa fueron causados por *Lactobacillus* y *Pediococcus*, mientras que el 6 a 30 % fue por *Pectinatus* y *Megasphaera* (Tabla I) (Back, 1994, 2003; Susuki, 2011).

Tabla I. Porcentajes de microorganismos contaminantes de cerveza en reportes de incidentes en el periodo de 1980 a 2002^a

Genero/Especie ^b	1980-1990	1992 ^c	1993 ^c	1997	1998	1999	2000	2001	2002
<i>L. brevis</i>	40	39	49	38	43	41	51	42	51
<i>L. linderi</i>	25	12	15	5	4	10	6	13	11
<i>L. plantarum</i>	1			1	4	2	1	1	2
<i>L. casei/paracasei</i>	2	3	2	6	9	5	8	4	4
<i>L. coryniformis</i>	3			4	11	4	1	3	6
<i>P. damnosus</i>	16	4	3	31	14	12	14	21	12
<i>Pectinatus</i>	4	28	21	6	3	6	5	10	7
<i>Megasphaera</i>	2	7	3	2	2	4	4	4	2

a, Adaptada de los estudios de Back en el periodo de 1980 a 2002 (Back, 1994; Back, 2003; Susuki, 2011).

b, *L. brevis* incluye a *L. brevis imilis* que exhibe similitudes fenotípicas y morfológicas con *L. brevis*. De acuerdo con Back, *L. brevis* en esta tabla consiste de varios tipos de bacterias en base a los perfiles de fermentación, utilización de arginina y características morfológicas, sugiriendo que este grupo puede ser dividido en especies y subespecies distintas.

c, En los estudios de 1992 y 1993, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. coryniformis* se juntaron en un solo grupo.

Lactobacillus y Pediococcus

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están formadas por un gran grupo de bacterias Gram positivo, incluyendo a *Lactobacillus* y *Pediococcus*. En el periodo de 1980 a 2002, aproximadamente del 60 al 90 % de los incidentes de contaminación microbiológica de cerveza en Europa fue causado por *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Back. 1994; 2003).

Lactobacillus son bacilos Gram positivo, no esporulados, raramente móviles, anaerobio facultativo, catalasa negativo. Las células son en forma de bastón regular de 0.5 a 1.2 x 1 a 10 µm. Usualmente son bastones alargados pero algunas veces son casi cocoides, comúnmente en cadenas cortas. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 40 °C (Holt *et al.*, 1994). *Lactobacillus* es el género más grande de BAL e incluye numerosas especies y se utiliza en diversos procesos de fermentación, pero solo algunas especies han sido reportadas con la capacidad de crecer en cerveza (Back, 1994; Fernández y Simpson, 1993; Iijima *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2005).

Entre las especies de lactobacilos, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus lindneri* son consideradas las mayores bacterias contaminantes de cerveza. *L. brevis* y *L. lindneri* son heterofermentativos y a estas especies pertenecen las cepas con la mayor habilidad de alterar la cerveza (Back. 1981; Ingledew. 1979). Además de estas dos especies, también podemos encontrar *L. buchneri*, *L. casei*, *L. coryneformis*, *L. curvatus* y *L. plantarum* pero son menos comunes en la cerveza (Priest. 1996).

L. brevis es la especie que se ha reportado con mayor frecuencia como contaminante de cerveza (Back. 2005) y está ampliamente distribuida en la industria alimenticia y en el ambiente en general, pero su habilidad para crecer en cerveza depende de la cepa y del lugar donde se halla aislado (Back, 2005; Susukiet *al.* 2006). Algunas cepas crecen en casi cualquier tipo de cerveza, ocasionando turbidez, sedimentos y acidificación. En cambio, cepas de *L. brevis* aisladas de lugares diferentes a ambientes cerveceros generalmente presentan muy baja o ninguna capacidad para crecer en cerveza (Nakagawa. 1978; Susuki *et al.*, 2008; Susuki. 2009). Aunque se reporta que en el grupo de *L. brevis* se encuentran diferentes tipos de bacterias que se

pueden separar en distintas especies o subespecies dependiendo de sus perfiles de fermentación, utilización de arginina y características morfológicas específicas (Susuki. 2011).

La segunda bacteria más frecuente es *L. linderi*, la cual es altamente resistente a los compuestos del lúpulo y crece de manera óptima de los 19 a los 23 °C ocasionando turbidez y sedimento en la cerveza (Back *et al.*, 1996; Back. 2005). También se reporta que no crece a temperaturas más altas que los 28 °C. Sin embargo, esta especie es conocida por tolerar tratamientos con temperaturas relativamente altas y algunas veces sobrevive a procesos de pasteurización subóptimos (Back *et al.*, 1992). Además. *L. linderi* como muchas de las cepas adaptadas a la cerveza, crece pobremente en muchos medios de cultivo utilizados en la industria cervecera y puede a llegar causar contaminación sin ser detectada en los controles de calidad microbiológicos (Susuki *et al.*, 2008). La ocurrencia de *L. linderi* fuera de los ambientes cerveceros ha sido raramente reportado, aunque se sugiere que *L. linderi* y una especie relacionada de BAL fueron aisladas de uvas y del proceso de elaboración de vino (Back. 2005; Susuki. 2009).

Seguido en importancia a *L. brevis* y *L. linderi* de acuerdo a la frecuencia de contaminación de cerveza, se encuentra *Pediococcus damnosus* (Back. 2005). *Pediococcus* un género de bacterias homofermentativas, cocos Gram positivo, no esporulados, inmóviles, aerobio facultativo, catalasa negativo. Las células son esféricas, nunca alargadas, de 1 a 2 µm de diámetro, forman tétradas bajo condiciones favorables, algunas veces solo se observan en pares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 40 °C (Holt *et al.*, 1994). Este género es el responsable de la clásica alteración de la cerveza “enfermedad sarcina” que, en su forma más grave, se caracteriza por un exceso de acidez, turbidez, un sedimento granular y malos sabores y aromas a consecuencia de la formación de diacetilo. Sin embargo, una alteración así solo se produce cuando hay un crecimiento elevado y en las demás situaciones la producción de diacetilo es el problema más importante (Varnam y Sutherland. 1994).

Se han reportado varias especies de *Pediococcus* que tienen la habilidad de alterar la cerveza (Back. 1994), pero *P. damnosus* produce grandes cantidades de

diacetilo mientras que otras especies como *P. inopinatus* y *P. pentsauces* no lo producen. Es por esto que los cerveceros usualmente solo prestan atención a *P. damnosus* (Varnam y Sutherland. 1994). Además, algunas cepas de *P. damnosus* producen exopolisacaridos los cuales dan una consistencia gelatinosa a la cerveza (Back. 2005).

Las contaminaciones por *P. damnosus* son más frecuentes durante la fermentación de la cerveza, debido en parte por su habilidad para crecer a bajas temperaturas (Back, 2005), en donde se ha observado que se adhiere a las levaduras y algunas veces ocasiona sedimentación prematura de las mismas, resultando en una retardación del proceso de fermentación (Priest, 1996). Al igual que *L.linderi*, *P. damnosus* crece muy lentamente en medios de cultivo de laboratorio y ha sido aislada casi exclusivamente de ambientes donde se produce cerveza y vino (Taguchi *et al.*, 1990; Back. 2005).

Recientemente se han descrito nuevas especies de BAL como *L. backi* y *L. paracollinoides* (Funahashi *et al.*, 1998; Bohak *et al.*, 2006) y su frecuencia en incidentes de contaminación de cerveza no es muy bien conocida. La caracterización genética de *L. backiy* *L. paracollinoides* muestra que están relacionadas con *L. coryniformis* y *L. collinoides* respectivamente. Debido a esto, cepas de *L. backiy* *L. paracollinoides* pudieron haber sido equivocadamente identificadas como *L. coryniformis* y *L. collinoides*. Otra nueva especie reportada es *P. claussenii*, la cual posee cepas que producen exopolisacaridos (Dobson *et al.*, 2002).

Todas las cepas caracterizadas hasta la fecha de *L. backi*, *L. paracollinoides* y *P. claussenii* se han aislado de ambientes cerveceros, por lo que se consideran especies de BAL únicas de la industria cervecera (Susuki. 2011).

Pectinatus* y *Megasphaera

Estos dos géneros, pertenecen al grupo de bacterias con envoltura celular de Gram negativo que se encuentran dentro del phylum de las bacterias Gram positivo

(Stackebrandt. 1985; Schleifer *et al.*, 1990), poseen una membrana externa como las Gram negativo y una pared gruesa de peptidoglicano como las bacterias Gram positivo (Helander *et al.*, 2004). El porcentaje de incidentes de contaminación causado por estos dos géneros en Europa en la década de los 80's fue aproximadamente del 6% (Back. 1994). Sin embargo, el porcentaje aumento hasta un 24 a 38% a inicios de los 90's pero regreso a su porcentaje normal en el periodo de 1997 a 2002 (Susuki. 2011). Este aumento en la contaminación por *Pectinatus* y *Megasphaera* fue causado principalmente por los avances en la tecnología de llenado de botellas con el cual se obtenía cerveza con un contenido casi nulo de oxígeno lo cual es una ventaja para estos géneros ya que son anaerobios estrictos.

Pectinatus son bacilos curvos, Gram negativo, anaerobios, móviles con flagelos en forma de peine en el lado cóncavo de la célula. Tiene forma de bastón ligeramente curvo, miden de 0.7 a 0.9 x 3 a 30 μm , con puntas redondeadas. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C (Holt *et al.*, 1994). Las principales especies que alteran la cerveza son *P. cerevisiiphilus* y *P. frinsigensis* (Shleifer *et al.*, 1990), pero también se ha reportado recientemente a *P. haikarae* (Juvonen *et al.*, 2006). El crecimiento de esta bacteria en la cerveza provoca turbidez, sedimentos, pequeños grumos y también hay una producción de ácido sulfhídrico lo que ocasiona que la cerveza tenga un olor a huevo podrido (Lee *et al.*, 1978).

Megasphaera son cocos Gram negativo, anaerobios, no móviles. Las células esféricas o ligeramente ovaladas tienen un diámetro de 1.3 a 1.6 μm , se observan solas, en pares o en cadenas cortas (Haikara. 1991). Tiene un crecimiento óptimo de 28 °C y puede crecer entre 15 y 37 °C y a pH mayor de 4.1. *M. Cerevisiae* es la principal especie de este género responsable de la alteración en la cerveza desde 1976 (Weiss *et al.*, 1979; Haikara y Lounatmaa. 1987; Lee. 1994) pero recientemente se han reportado dos nuevas especies *M. suciensis* y *M. paucivorans* (Juvonen y Suihko. 2006). La alteración causada por este microorganismo causa una ligera turbidez, compuestos con mal olor incluyendo ácido butírico, caproico y sulfhídrico (Seidel *et al.*, 1979; Lee. 1994). *Megasphaera* no tolera muy bien el etanol, por lo que las cervezas bajas en alcohol son más susceptibles a la contaminación con esta bacteria.

Los sabores y olores desagradables ocasionados por el crecimiento de *Pectinatus* y *Megasphaera* son muy dañinos para el producto y para la marca de la cerveza. Debido a esto, *Pectinatus* y *Megasphaera* son muy temidos en la industria cervecera. También es común que ocurran contaminaciones combinadas de *Pectinatus* y *Megasphaera* con BAL (Back. 2005; Susuki. 2011).

Habilidad de los microorganismos para crecer en cerveza

La cerveza es un medio muy hostil para el crecimiento de microorganismos debido principalmente al contenido de etanol (0.5 a 10 % p/p), bajo contenido de oxígeno, baja concentración de sustancias nutritivas como glucosa y maltosa y a la presencia de iso- α -ácidos del lúpulo (17 a 55 $\mu\text{g/ml}$), los cuales tienen propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivo (Susuki *et al.*, 2006). A pesar de estas características desfavorables para el crecimiento de microorganismos, algunos poseen mecanismos que les permiten crecer en este medio.

Los ácidos del lúpulo son ácidos débiles que pueden atravesar la membrana citoplasmática de bacterias Gram positivo y una vez dentro de la célula actúan como protonoforos que disipan el gradiente de pH transmembranal (Kashket. 1987), por lo que es importante para las BAL como *Lactobacillus* y *Pectinatus* evitar la entrada de los compuestos del lúpulo a la célula. Se ha mostrado que el gene *horA*, identificado originalmente en *L. brevis*, confiere resistencia a lúpulo en BAL (Susuki *et al.*, 2006).

Anteriormente se creía que la resistencia al lúpulo era una característica estable codificada en el DNA cromosomal (Fernández y Simpson. 1993), pero muchas cepas cerveceras de BAL adquieren gradualmente una resistencia aumentada a los compuestos del lúpulo a través de cultivación seriada en medios con un incremento en la concentración de ácidos del lúpulo (Richards y MacRae. 1964; Sami *et al.*, 1997). A este fenómeno se le llama adaptación al lúpulo. Esto llevó al descubrimiento que por lo menos en *L. brevis* ABBC45 un factor genético que confiere resistencia al lúpulo se encuentra en plásmido, el cual es una forma de DNA relativamente inestable. El análisis de secuencia de pRH45 reveló que poseía un marco abierto de lectura (ORF), al que se

llamó *horA*. Este ORF codifica para una proteína de membrana, la cual tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad del 53% con *Lmra* (Sami *et al.*, 1997), la familia de transportadores multidrogas de casete de unión de ATP (ABC) identificado en *Lactococcus lactis* (Fath y Kolter, 1993). A partir de estos resultados se sugirió que *HorA*, el producto de *horA*, confiere resistencia a *L. brevis* ABBC45 funcionando como un transportador multidrogas que expulsa los ácidos del lúpulo fuera de la célula.

El gen de resistencia *horA*, se encuentra en un plásmido de 15.1 kpb llamado pRH45, localizado en *L. brevis* ABBC45 y las copias de éste aumentan con la adaptación al lúpulo de *L. brevis* (Sami *et al.*, 1997). Por lo tanto, este plásmido es uno de los factores genéticos que confiere resistencia al lúpulo en *L. brevis* ABBC45. Una variante de esta cepa, fue obtenida en cultivo seriado y se encontró que se inducía la pérdida de pRH45 en *L. brevis* ABBC45. A la variante sin el plásmido se le llamó ABBC45c. La resistencia al lúpulo de la cepa ABBC45c se vio muy disminuida en comparación con la cepa silvestre ABBC45. El fenotipo fue restablecido con introducción del plásmido; demostrando que pRH45 confiere resistencia al lúpulo a *L. brevis* ABBC45 (Sami *et al.*, 1998).

HorA se expresó en *L. lactis* NZ9000 y esto aumentó la resistencia de la bacteria a los compuestos del lúpulo y otras sustancia citotóxicas (Sakamoto *et al.*, 2002). Gracias a estos estudios, ahora se sabe que *HorA* es una proteína de membrana de la familia de transportadores multidrogas ABC que confiere resistencia al lúpulo en BAL. Sin embargo *L. brevis* ABBC45c, una variante que había perdido *horA*, todavía mostraba una habilidad residual para alterar la cerveza, indicando la presencia de mecanismos de resistencia independientes de *horA* (Susuki *et al.*, 2002).

Para encontrar los mecanismos de resistencia independientes de *horA* se estudió a *L. brevis* ABBC45c (Susuki *et al.*, 2004). Por medio de una cultivación seriada a 37 °C, se obtuvo una variante que mostró una resistencia reducida a compuestos del lúpulo. Esta variante, llamada ABBC45cc, había perdido totalmente la habilidad para crecer en cerveza. La caracterización genética de *L. brevis* ABBC45cc, reveló que una porción de 12.6 kb había sido eliminada de un plásmido de 23.4 kb llamado pRH45II (Susuki *et al.*, 2004). La región ausente de pRH45II contenía 12 ORFs y se asumió que el segundo gen

de resistencia al lúpulo se encontraba en esta región. Por el otro lado, el análisis bioquímico de la cepa ABBC45c indicó que el mecanismo independiente de *horA* está mediado por un transportador multidrogas dependiente de la fuerza protón motriz (FPM) (Susuki *et al.*, 2002).

La caracterización genética de la región ausente de pRH45II demostró que el ORF5 codifica para una proteína con 11 a 12 dominios transmembranales (Susuki *et al.*, 2003) lo cual es una característica de los transportadores multidrogas dependientes de la FPM (Paulsen *et al.*, 1996). Esto llevó a la evaluación de la presencia o ausencia del ORF5 en 29 cepas cerveceras de *L. brevis*. El ORF5 se encontró en las 29 cepas cerveceras mientras que estaba ausente en las 8 no cerveceras de este estudio (Susuki *et al.*, 2003).

Intentos de obtener una cepa que no altera la cerveza de *L. lindneri* DSM 20692 dió nueva información acerca de la región de DNA ausente en pRH45II. No se habían encontrado cepas sensibles al lúpulo de *L. lindneri* pero recientemente se adquirió por cultivo seriado a 30 °C una variante sensible de *L. lindneri* DSM 20692, llamada DSM 20692NB (Susuki *et al.*, 2005). El análisis de esta cepa demostró que no solo era sensible al lúpulo sino que también poseía resistencia disminuida a múltiples drogas no relacionadas estructuralmente con los ácidos del lúpulo. Este resultado sugirió que la resistencia de *L. lindneri* DSM 20692 está dada por un transportador multidrogas. Un análisis posterior mostró que la cepa DSM 20692 contiene homólogos de los ORF1 y ORF2, que se habían identificado originalmente en la región ausente de pRH45II. Estos ORFs en *L. lindneri* DSM 20692 se encuentran un plásmido de alto peso molecular y además se perdieron junto con la resistencia al lúpulo de esta cepa. De estas observaciones, se concluyó que el ORF1 y ORF2 están implicados en la resistencia independiente de *horA* y se les renombró *horB* y *horC*, los cuales codifican para proteínas transportadoras multidrogas dependientes de FPM (Susuki *et al.*, 2005).

Además del uso de proteínas transportadoras para la resistencia al lúpulo, se ha observado que las BAL que pueden crecer en cerveza, una vez que se encuentran en presencia de lúpulo, aumentan su función de ATPasa para la translocación de protones, lo que contrarresta el efecto de los ácidos del lúpulo (Sakamoto *et al.*, 2002).

En contraste a los mecanismos activos de resistencia al lúpulo descritos anteriormente, también encontramos mecanismos de defensa pasivos, en los que no se requiere el uso de energía una vez que están establecidos. La resistencia al lúpulo en estas bacterias está dada por la morfología de su doble membrana, ya que la membrana externa es hidrofóbica y no permite la entrada de los ácidos del lúpulo a la célula. En *L. brevis* se ha observado que la composición de la membrana cambia incorporando un mayor número de ácidos grasos saturados, resultando en una membrana menos fluida y protegiendo a la célula contra la introducción de ácidos del lúpulo (Behr. 2006). También se ha observado que esta misma bacteria que los ácidos lipoteicoicos (ALT) de la pared celular aumentan en presencia de ácidos del lúpulo (Yasui *et al.*, 1997; Behr. 2006). Estos cambios en la composición de ALT reducen la entrada de ácidos del lúpulo a la célula. Se cree que los ALT funcionan como reservorios de cationes divalentes, como Mn^{2+} , los cuales de otra manera se vuelven escasos como resultado de su unión con los ácidos del lúpulo (Viegas. 1998; Behr. 2006). Los ALT modificados tienen un mayor potencial para la unión de cationes divalentes y para competir por ellos contra los ácidos del lúpulo y así reduciendo los efectos negativos del lúpulo dentro de la célula.

Debido a que el lúpulo no tiene efecto antimicrobiano en bacterias Gram negativo (Sakamoto y Konings. 2003), la capacidad de crecer en cerveza de *Megasphaera* y *Pectinatus* no está dada por los genes *horA*, *horC* y ORF5 como en las BAL, sino que se debe a diversos factores. Por ejemplo, se ha observado que la cerveza con bajo contenido de etanol es más propensa a presentar contaminación con *Pectinatus* y *Megasphaera* (Back. 2005). Así que la frecuencia de contaminación de estas bacterias es inversamente dependiente al contenido de alcohol (Susuki. 2011). El crecimiento de *Megasphaera* se muestra restringido en cerveza comercial con un contenido de etanol de 3.5 % p/v. En cambio, *Pectinatus* es más tolerante al etanol y puede crecer en cerveza con un contenido desde 3.7 hasta 4.4 % p/v, aunque la velocidad de crecimiento disminuye a medida que aumenta el contenido de alcohol (Haikara y Helander. 2006).

Otra característica importante que afecta el crecimiento de microorganismos en cerveza es el pH. Conforme aumenta el pH, la cerveza se vuelve más susceptible a la contaminación con *Pectinatus* y *Megasphaera* (Back, 2005). De los dos géneros,

Pectinatus es más tolerante a ambientes con bajo pH y se requiere un pH de 4.1 para retrasar su crecimiento (Haikara, 1984). En cambio, para retrasar el crecimiento de *Megasphaera* se necesita un pH de 4.5, pero todavía se observa crecimiento en cerveza con pH de 4.38 pero no de 4.0 (Haikara. 1991).

El contenido de oxígeno en la cerveza también es uno de los factores más decisivos para el crecimiento de *Pectinatus* y *Megasphaera* (Haikara. 2006). El contenido de oxígeno disuelto en la cerveza ha disminuido considerablemente en los últimos años debido a avances en las tecnologías de llenado (Susuki. 2011). Actualmente, se puede obtener en los envases un volumen de aire de 1 ml con un mínimo de 0.3 mg/L de oxígeno (Haikara. 2006). Sin embargo, cepas de *Pectinatus* y *Megasphaera* crecen en cerveza con menos de 0.3 mg/L de oxígeno disuelto (Back. 2005), por lo que las contaminaciones con estas bacterias ocurren principalmente en cervecerías modernas con sofisticados sistemas de llenado.

Fuentes de contaminación

Los tipos de contaminación en las cervecerías normalmente se dividen en contaminaciones primarias, las cuales se originan de las levaduras, el mosto o la fermentación y en contaminaciones secundarias las cuales provienen del envasado de la cerveza. Alrededor del 50 % de los problemas microbiológicos se atribuyen a contaminaciones secundarias ocurridas en la sección de envasado en cerveza no pasteurizada (Back. 1997), pero las consecuencias de una contaminación primaria pueden llegar a ser más extensas y desastrosas. Los microorganismos que alteran la cerveza pueden aparecer en cualquier etapa del proceso (Haikara. 1984).

Datos anteriores muestran que las fuentes de contaminación más importantes son las levaduras y botellas retornables sucias (Back. 1994). Otros puntos de contaminación en las cervecerías incluyen instrumentos de medición, válvulas, tuberías de gas y superficies del suelo desgastadas (Paier y Ringhofer. 1997).

Solo pocas especies y cepas pueden adaptarse y crecer en cerveza, pero por el otro lado, las especies adaptadas al ambiente cervecero normalmente no se han aislado de ningún otro lado (Haikara. 1992; Back. 1994). Los microorganismos que alteran la cerveza como las BAL y bacterias anaerobias regularmente se encuentran en el equipo, en el aire o en la materia prima. Estos organismos pueden sobrevivir por mucho tiempo en nichos del proceso, probablemente fuera de la línea de producción sin causar signos de contaminación, entonces, estos microorganismos pueden contaminar todo el proceso a causa de fallas tecnológicas o limpieza insuficiente (Back. 1994).

Las contaminaciones que ocurren en el área de envasado pueden provenir de cualquiera de los puntos en contacto directo o indirecto con botellas limpias o llenas sin sellar son posibles fuentes de contaminación. Las causas más comunes de contaminaciones secundarias ocurren en el sellado (35%), el llenado (25%) y en la inspección de botellas (10%) (Back. 1994). Estas contaminaciones en el área de llenado nunca ocurren de manera espontánea, siempre son consecuencia de un crecimiento secuencial de microorganismos, primero bacterias ácido acéticas y algunas enterobacterias comienzan a crecer en lugares donde existen residuos intermediarios del proceso o cerveza. Estas bacterias no se consideran dañinas para el producto, pero debido a la formación de biopelículas protegen a microorganismos acompañantes de la desecación y desinfección. Si los productos residuales se encuentran presentes durante largos periodos de tiempo, las levaduras comienzan a crecer y estas producen factores que promueven el crecimiento de BAL. El ácido láctico producido por estos microorganismos puede ser metabolizado a ácido propionico por otras bacterias como *Pectinatus* (Back. 1994).

La contaminación proveniente del aire puede ocurrir en el área de llenado durante el transporte de botellas abiertas desde el lavado de botellas hacia el llenado y hasta que la botella sea sellada. Este tipo de contaminación es más importante en cervecerías que no pasteurizan sus productos (Henriksson y Haikara. 1991). La distribución de los microorganismos en el aire depende de las corrientes de aire locales así como de la humedad, temperatura, presión al igual que las propiedades de los microorganismos como la resistencia a la deshidratación y rayos UV del sol. Finalmente,

se ha observado que existe una relación entre la humedad y el número de microorganismos en el aire, confirmando que una alta humedad relativa lleva a un alto número de microorganismos en el aire (Oriet y Pfenninger. 1998).

Detección de bacterias en la cerveza

Todas las etapas en la producción de cerveza necesitan un monitoreo ocasional de microorganismos para asegurar la calidad del producto. Este monitoreo ayuda a indicar fallas en el proceso o el desarrollo de pobres condiciones de higiene (Back. 2005).

Mientras que no existen especificaciones oficiales para el número permitido de microorganismos presentes en cerveza, es generalmente aceptado que hasta el más mínimo número de microorganismos que alteran la cerveza constituye un riesgo debido al largo proceso de elaboración y la vida de anaquel de la cerveza (Jespersen y Jakobsen. 1996). Los límites sugeridos de microorganismos en cerveza no pasteurizada van de 0 a 50 UFC por cada 100 – 200 ml (Jespersen y Jakobsen. 1996; Back. 2005).

Las cervecerías normalmente dependen de métodos clásicos de cultivo combinados con caracterización fenotípica básica de los aislados. El procesamiento de la muestra depende del microorganismo que se busca, la etapa de producción y los recursos disponibles. Este proceso normalmente involucra la recolección de células de las muestras mediante filtración por membrana seguida de inoculación en medios selectivos y no selectivos. Existen diversos medios de cultivo para bacterias que alteran la cerveza, la convención cervecera de Europa recomienda para *Lactobacillus* y *Pediococcus* medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), Raka-Ray y UBA (agar universal de cerveza). Ninguno de estos medios son adecuados para detectar todas las cepas, pero una combinación de estos da buenos resultados. Para la detección de *Megasphaera* y *Pectinatus* se recomienda caldo MRS concentrado, PYF (peptona, extracto de levadura y fructosa), NBB y medio tioglicolato para enriquecimiento de la cerveza (EBC, 2005).

Seguido a la detección de los microorganismos en estos medios, se necesita la identificación de la especie. Además de las pruebas básicas de morfología colonial, morfología celular, tinción Gram y prueba de catalasa, también se pueden realizar pruebas como fermentación de azúcares y análisis cromatográfico de ácidos orgánicos. Igualmente, se pueden utilizar métodos específicos de detección e identificación como inmunoensayos (Whitinget al., 1992; Ziolaet al., 2000) y PCR o qPCR (Tsuchiyaet al., 1992, 1993; Yasui et al., 1997; Suzuki et al., 2005; Haakensen et. al. 2008; Postollec et. al., 2011).

Aun y cuando se utilicen técnicas de detección e identificación rápidas como el qPCR, es necesario realizar cultivos de enriquecimiento ya que los generalmente los niveles de contaminación son muy bajos en la cerveza y es necesario poder detectar la mínima cantidad posible de células en la muestra. Para esto se utilizan medios de enriquecimiento que nos permites obtener un número suficiente de células para su identificación. Sin embargo, uno de los aspectos más difíciles de las pruebas de calidad en las cervecerías es que muchas bacterias que contaminan la cerveza no crecen bien en los medios de cultivo utilizados en el laboratorio (Back. 2005; Susuki et al., 2008). Por ejemplo, las cepas que crecen en cerveza de *L. linderi* y *L. paracollinoides* generalmente pasan sin ser detectadas en los medios de control de calidad (Susuki et al., 2008), como el MRS, el cual es usado ampliamente para el cultivo de BAL (De Man et al., 1960). Por el contrario, algunas cepas de estas bacterias que inicialmente mostraron lento crecimiento en medio MRS en el momento del aislamiento, gradualmente adquirieron un crecimiento más rápido cuando fueron cultivadas de manera repetida en medio MRS. Además, se observa que *L. linderi* y *L. paracollinoides* crecían mejor cuando el medio de cultivo es suplementado con cerveza, indicando que estas especies de bacterias están muy bien adaptadas al ambiente cervecero (Susuki. 2011).

Las diferencias entre la cerveza y los medios de cultivo son algunas de las razones por las que las BAL a la cerveza no pueden crecer en los medios de laboratorio. Por ejemplo, el pH óptimo para el crecimiento de bacterias adaptadas a la cerveza es menor a 5.0, el cual se considera muy bajo comparado con BAL ordinarias, de hecho, el pH del medio MRS normalmente es de 5.7 o más, dependiendo del proveedor, el cual es

muy alto para estas bacterias ya que el pH de la cerveza va de 3.8 a 4.7 (Susuki. 2011). Otra diferencia es que los nutrientes de la cerveza desaparecen casi completamente debido proceso de fermentación llevado a cabo por las levaduras. En cambio, los medios de cultivo ordinarios contienen cantidades considerables de acetato de sodio/potasio, extracto de levadura, peptona y sulfato de magnesio para potenciar el crecimiento de BAL, entonces, es razonable decir que los medio para la detección de estas bacterias son drásticamente distintos al medio ambiente de las cervecerías. Para otros microorganismos se ha reportado que un cambio repentino en el medio donde crecen induce un estado de shock, resultando en una baja de crecimiento (Susuki. 2011).

El crecimiento de *Pectinatus* y *Megasphaera* en medios de cultivo se ve afectado principalmente por el sistema de incubación ya que son bacterias anaerobias estrictas, así como por las formulaciones del medio (Susuki. 2011), por lo que la EBC recomienda evaluar la recuperación de estas bacterias en distintos medios de cultivo con distintas formulaciones como lo son el MRS y el NBB suplementados con cerveza.

Después de la detección e identificación, para algunas especies es necesario comprobar si la bacteria puede alterar la cerveza. Mientras que todas las cepas pertenecientes a *Pectinatus* y *Megasphaera* se han reportado con la habilidad de alterar la cerveza (Haikara. 1991; Iijima et al., 2008), las BAL incluyen cepas que tienen la habilidad de alterar la cerveza y cepas que no lo pueden hacer (Suzuki et. al., 2006). En tiempos pasados, el único método disponible para detectar esta habilidad era la “prueba forzada”. En esta prueba la bacteria era inoculada en cerveza o cerveza enriquecida. Sin embargo, esta prueba está lejos de ser practica para aseguramientos de calidad ya que se ocupan varias semanas o hasta meses para tener resultados concluyentes.

Procedimientos más rápidos se han desarrollado. La identificación de cepas se puede realizar a nivel genómico amplificando regiones exclusivas de cada especie del gen de RNA ribosomal 16S (Doyle et al., 1995; Barney et al., 2001; Iijima et al., 2008). Otra manera es determinar una propiedad fisiológica responsable de la alteración de la cerveza, como en el caso de las BAL en las cuales el denominador fisiológico es la resistencia a los compuestos del lúpulo que permite a estas bacterias crecer en cerveza. Sin embargo, medir la resistencia al lúpulo cultivando estos microorganismos en medio

con lúpulo toma mucho tiempo. Entonces es más rápido detectar por PCR los genes responsables de la resistencia al lúpulo o regiones específicas del gen para el rRNA 16S (Suzuki et. al., 2005, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de referencia

Utilizamos cepas de referencia para *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* las cuales se obtuvieron del cepario del Instituto de Biotecnología de la UANL. Las cuatro cepas de referencia se observaron al microscopio a 40x y 100x con tinción Gram para comprobar que las cepas correspondían a los géneros de interés.

Medios de cultivo

Los principales medios de cultivo que se recomiendan para el crecimiento de bacterias que crecen en cerveza son el MRS y en NBB. Ya que se conoce que las bacterias adaptadas a los ambientes cerveceros no crecen muy bien en medio MRS (Back, 2005; Susuki *et al.*, 2008), nosotros utilizamos un MRS modificado llamado CLBM al cual principalmente se le agrega maltosa y malta, el cual ha mostrado un mejor rendimiento en la recuperación de bacterias adaptadas al ambiente cervecero (resultados no publicados). También utilizamos el medio NBB-C.

Para conocer cuál de los dos medios de cultivo presenta un mejor rendimiento de recuperación para *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera*, realizamos cinéticas de crecimiento para cada género en los dos medios de cultivo. Inoculamos 10 UFC/ml de cada una de las bacterias en 10 ml de los medios CLBM y NBB-C a 7 % v/v de NBB-C en cerveza estéril. Los inóculos que se utilizaron estuvieron bajo presión creciendo en medio de cultivo con cerveza para evitar que perdieran su habilidad de crecer en cerveza como ha sido reportado (Susuki *et al.*, 2005). Los medios de cultivo se incubaron en anaerobiosis a 25 °C durante 10 días, tomando muestras a las 0 h y cada 24 h por lo que inoculamos 10 tubos de cada bacteria en cada medio de cultivo para tomar la muestra sin afectar la anaerobiosis del cultivo.

Cada muestra que tomamos se observó al microscopio con tinción Gram a 40x y 100x para realizar el conteo de células y descartar contaminaciones. Para realizar el conteo utilizamos el método de cuenta directa al microscopio (Norma mexicana NMX-F-256-1977) el cual consiste en medir el radio del campo en el objetivo de 40x o 100x utilizando un portaobjetos calibrado y se calcula el área del campo con $(\pi)(r^2)$ y el número de campos por ml o factor del microscopio (FM) con $100/(\pi)(r^2)$. Seguido a esto, se extiende en el portaobjetos 0.01 ml de muestra en 1 cm^2 y se cuentan las células en 10 a 60 campos dependiendo del FM, se calcula el promedio y se multiplica por el FM para obtener células/ml de la muestra. En este caso, nuestro microscopio cuenta con un FM de 500,000 en 40x, por lo que contamos, 50 campos para las muestras con menos de 1 célula por campo, 20 campos para muestras con de 1 a 10 células por campo y 10 campos para muestras con más de 10 células por campo.

Preparación de la técnica de qPCR

Para la detección e identificación de las bacterias por qPCR realizamos la extracción de DNA con el equipo de extracción automatizado Maxwell 16 de Promega con el estuche de extracción de baja elución de la siguiente manera:

1. Tomar 10 ml de muestra o cultivo y centrifugar 3 min a 9000 rpm
2. Decantar 9 ml con ayuda de pipeta serológica
3. Transferir el mililitro restante a un tubo de 1.5 ml
4. Centrifugar a 10000 rpm por 3 min
5. Lavar el tubo con 1ml de solución salina.
6. Centrifugar a 10000 rpm por 2 min y decantar sobrenadante.
7. Agregar 100 μl de lisozima y 400 μl de buffer de elución (incluido en el estuche de extracción).
8. Incubar por 10 min a $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.
9. Agregar los 500 μl de muestra y 30 μl de buffer de elución en los cartuchos del equipo y montarlos como se indica en el manual.
10. Correr el programa de extracción.

Una vez teniendo el DNA de los cultivos, llevamos a cabo la detección e identificación en el termociclador Ligth Cycler 480 II (Roche) utilizando el estuche comercial de detección e identificación de bacterias que crecen en cerveza Foodproof® Beer Screening Kit de Bioteccon Diagnostics. El termociclador se programó de acuerdo a las especificaciones incluidas en el manual del estuche de detección (Tabla II). Igualmente, las reacciones se prepararon según las instrucciones del manual (Tabla III). Una vez terminada la amplificación, realizamos la interpretación de los resultados siguiendo el manual del estuche y un suplemento del mismo (Differentiation of groups and species via Melting curves Analysis in Channel 640/Back 530 and 705/Back 530).

Tabla II. Configuración general y programas para el uso del estuche Foodproof® Beer Screening de BiotecconDiagnostics en el LigthCycler 480 II de Roche

Configuración		
Formato de detección	Tipo de bloque	Volumen de reacción
Multicolor HybProbe	96	20 µl
Configuración del filtro	Modo dinámico: Fluos(465-510), Red 640 (498-640) y Cy 5/ Cy 5.5 (498-660)	
Programas		
Nombre	Ciclos	Modo de análisis
Pre-incubación	1	Ninguno
Amplificación	45	Quantification
Temperatura de fusión	1	Melting Curves
Enfriamiento	1	Ninguno

Tabla III. Componentes para la preparación de las reacciones del estuche Foodproof® Beer Screening de Bioteccon Diagnostics

Componente	Volumen (µl)
foodproof® Beer Screening Master Mix	13
foodproof® Beer Screening Enzyme Solution	1
foodproof® Beer Screening Internal Control	1
Muestra/Control Negativo/Positivo	5
Total	20

Estandarización de la técnica de qPCR

Para conocer el número mínimo de células que podemos detectar con el método descrito en la sección anterior, realizamos qPCR a cultivos con número de células conocidos de *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Para *Lactobacillus* utilizamos muestras de 10 ml con 10, 100, 1000, 1×10^6 y 1×10^7 células/ml y para *Pediococcus* teníamos muestras con 100, 1000, 10000, 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 células/ml.

A continuación, realizamos el qPCR a las cuatro cepas de referencia siguiendo el método descrito el cual sería utilizado posteriormente para analizar las muestras de proceso. De esta manera obtuvimos las gráficas de la temperatura de fusión (T_m) de cada una de las cepas de referencia, las cuales comparamos con las gráficas reportadas en el manual y el suplemento (Differentiation of groups and species via Melting curves Analysis in Channel 640/Back 530 and 705/Back 530) del estuche comercial Foodproof® Beer Screening Kit.

Detección e identificación de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* en muestras de proceso

Recibimos y analizamos diversas muestras tomadas del ambiente de cervecerías, estas fueron enriquecidas en dos de los medios de cultivo recomendados para el cultivo de bacterias que crecen en cerveza, MRS modificado (CLBM) y NBB-C. De cada una de las muestras tomamos 1 ml para inocular en 9 ml de CLBM con cicloheximida. Para los cultivos en NBB-C, tomamos 9.3 ml de muestra y agregamos 0.7 ml de NBB-C. Los cultivos de CLBM inoculados con muestras fueron incubados a 25°C durante 10 días, mientras que los de NBB-C los incubamos a 30°C durante el mismo periodo. De esta manera teníamos el medio CLBM a la temperatura óptima de crecimiento de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, y el medio NBB-C con la temperatura óptima para *Pectinatus* y *Megasphaera*.

Una vez terminado el tiempo de incubación, realizamos la extracción de DNA a los 10 ml de cultivo y posteriormente el qPCR, así obteniendo las gráficas de Tm de las muestras positivas. Para realizar la identificación de las bacterias detectadas, comparamos las gráficas de Tm de las muestras positivas con las gráficas reportadas en el manual del estuche comercial y las obtenidas en la estandarización de la técnica.

RESULTADOS

Observación microscópica de cepas de referencia

Las cepas control fueron teñidas con la técnica de Gram y se observaron al microscopio para confirmar los géneros *Lactobacillus* (Fig. 1), *Pediococcus* (Fig. 2), *Megasphaera* (Fig. 3) y *Pectinatus* (Fig. 4).

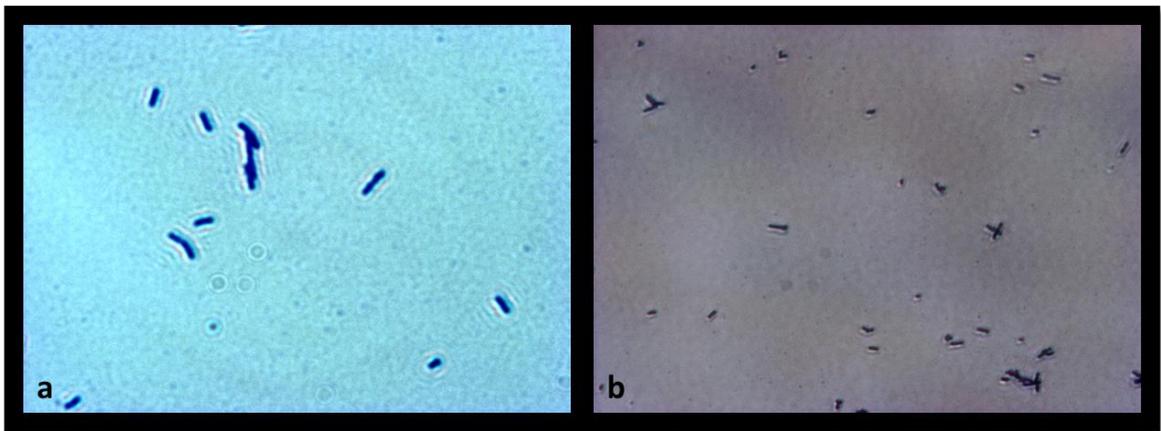


Figura 1. Morfología microscópica de cepa de referencia de *Lactobacillus*; a) observación a 100x, b) observación a 40x.

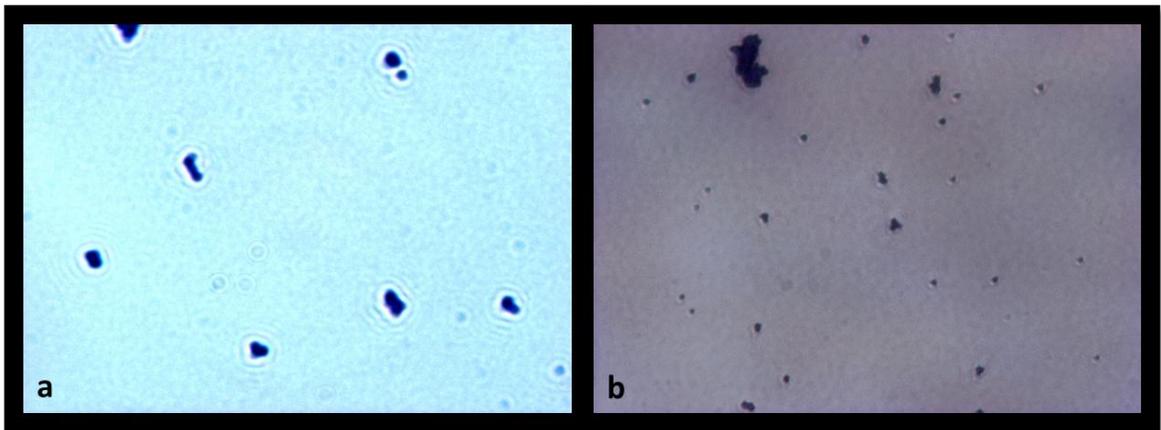


Figura 2. Morfología microscópica de cepa de referencia para *Pediococcus*; a) observación a 100x, b) observación a 40x.

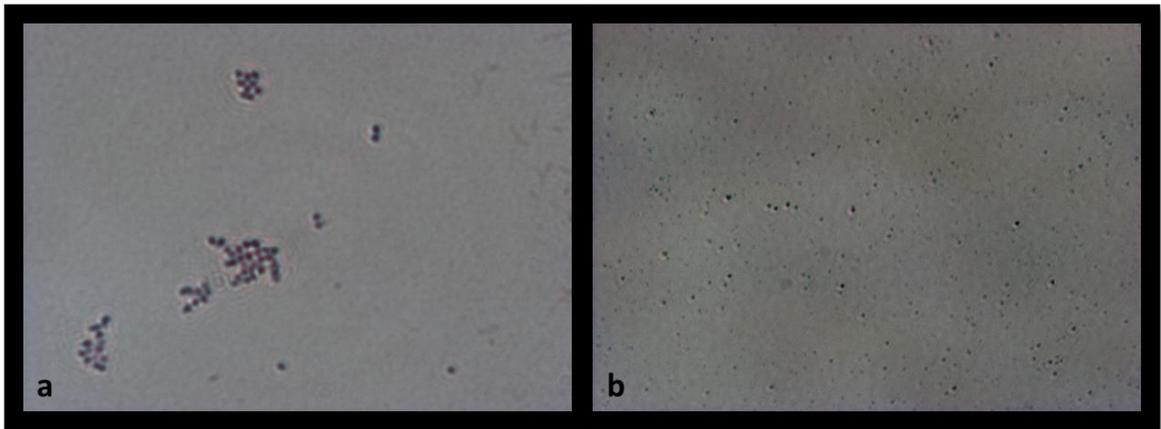


Figura 3. Morfología microscópica de cepa de referencia para *Megasphaera*, a) observación a 100x, b) observación 40x

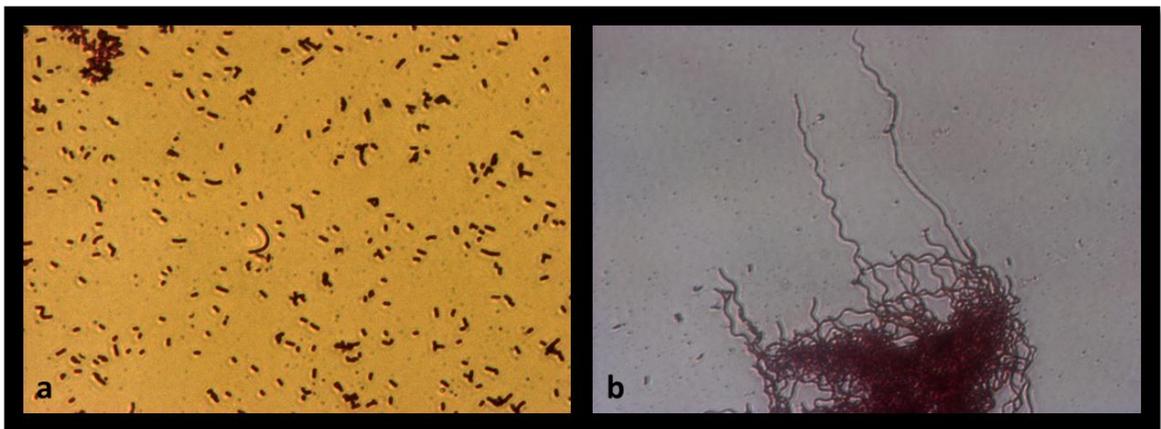


Figura 4 Morfología microscópica de cepa de referencia para *Pectinatus*, a) cultivo fase exponencial a 40x, b) cultivo fase estacionaria a 40x

Cinéticas de crecimiento

Realizamos cinéticas de crecimiento para las 4 cepas en medio CLBM y NBB-C/cerveza (Figs. 5 - 9).

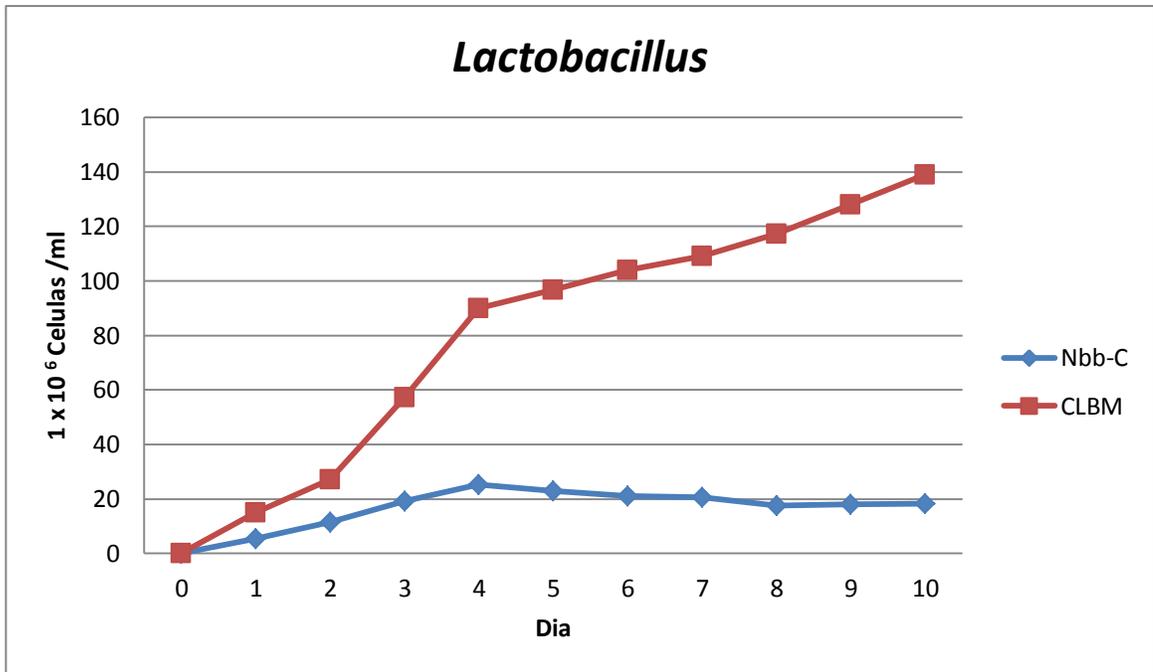


Figura 5. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus* en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C

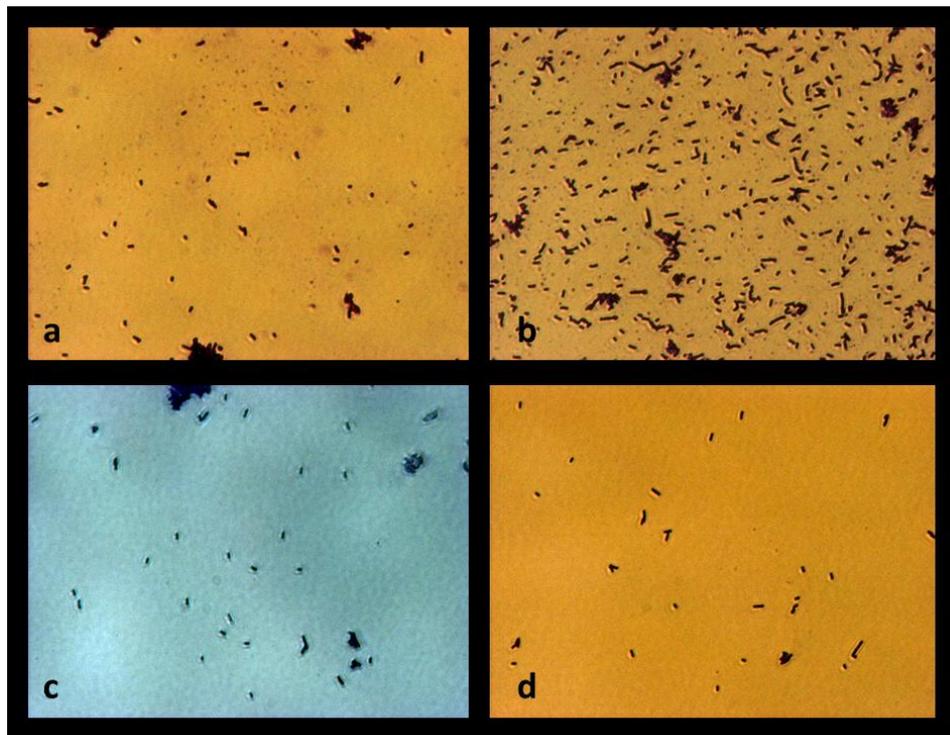


Figura 6 Observación microscópica a 40x de *Lactobacillus*; a) cultivo en CLBM a 2 días, b) a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días.

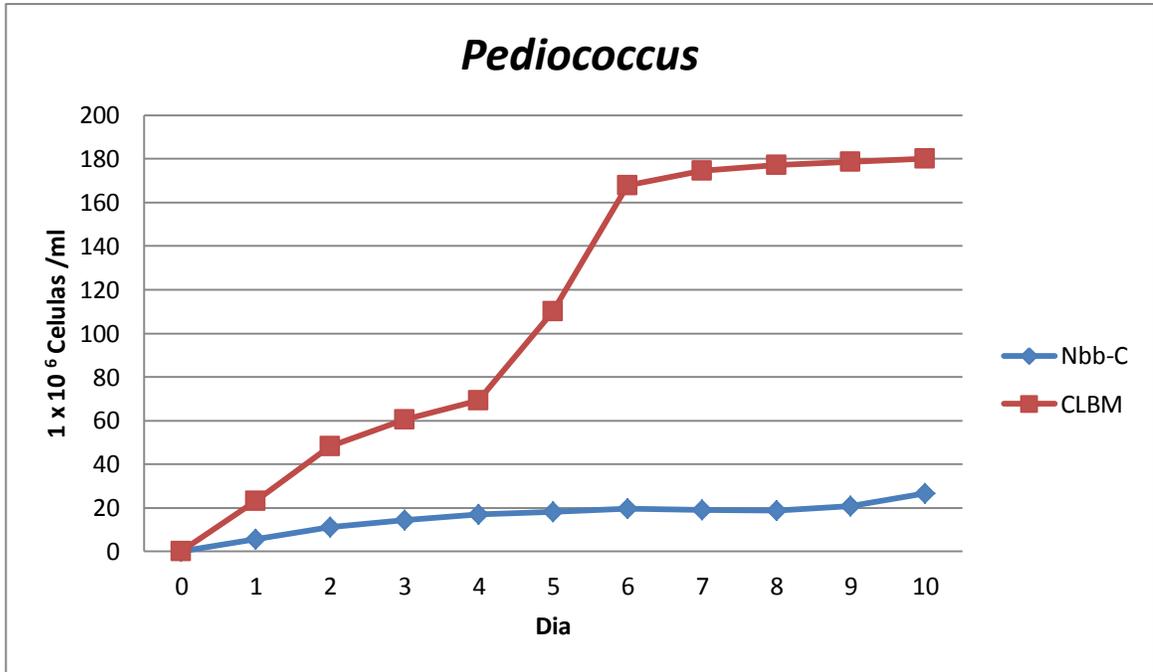


Figura 7. Cinética de crecimiento de *Pediococcus* en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C

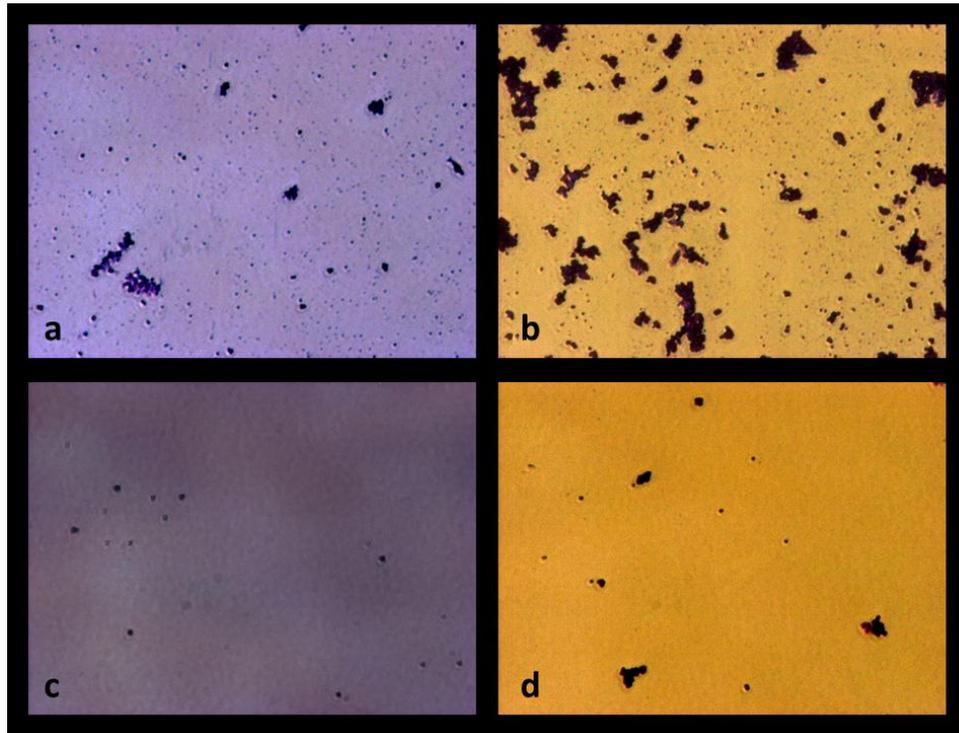


Figura 8. Observación microscópica a 40x de *Pediococcus*; a) cultivo en CLBM a 2 días, b) cultivo en CLBM a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días.

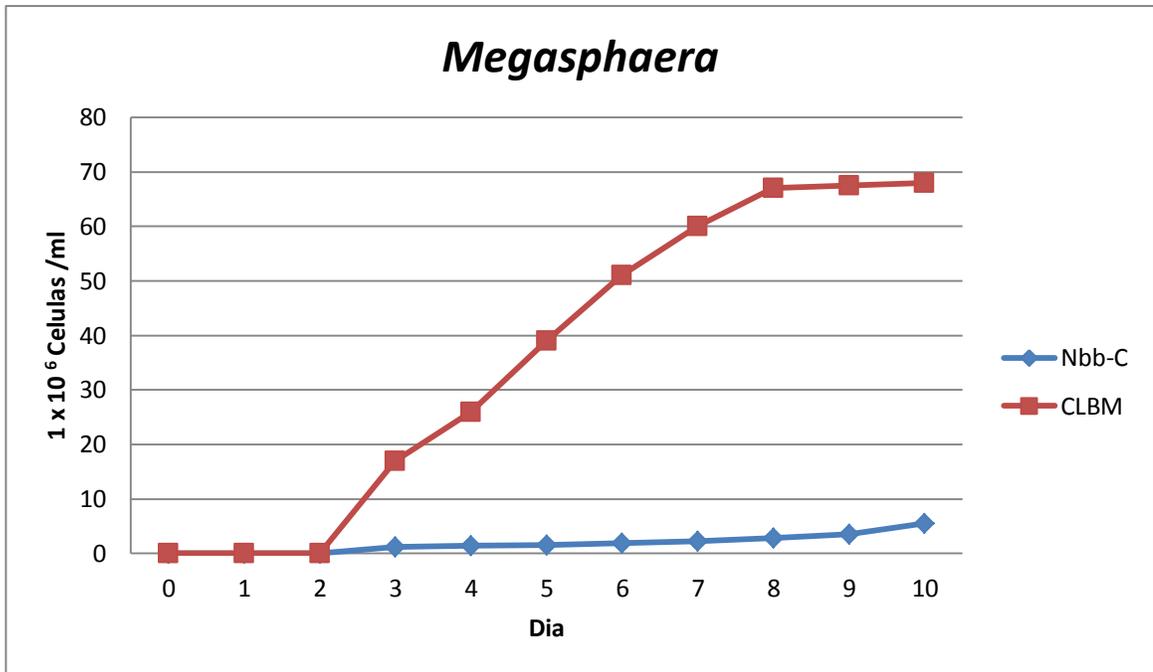


Figura 9. Cinética de crecimiento de *Megasphaera* en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C

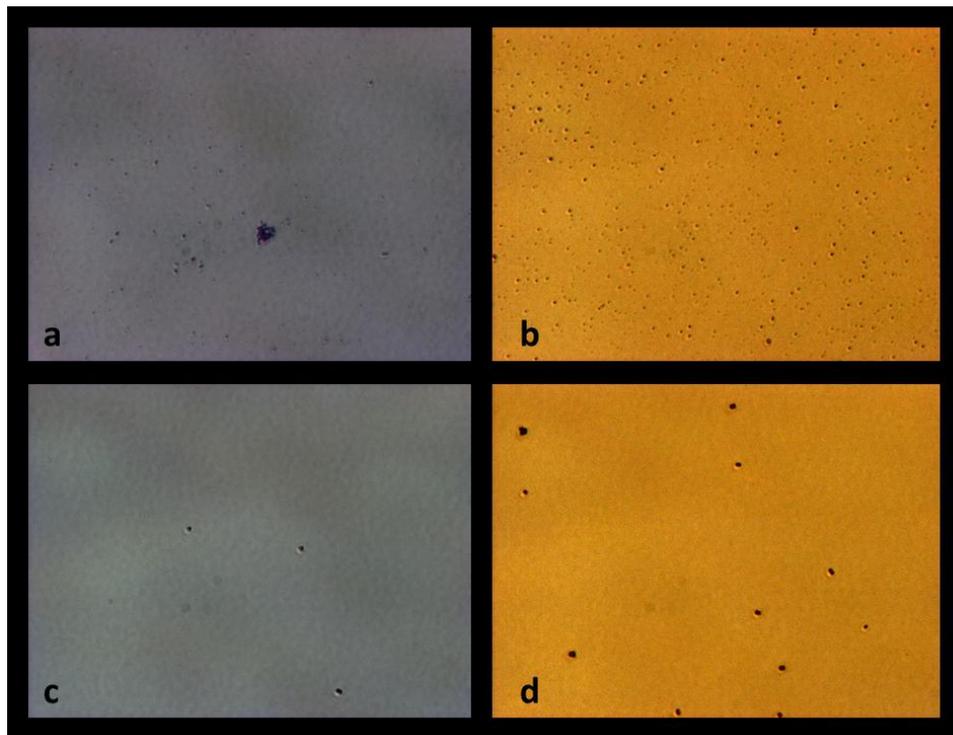


Figura 10. Observación microscópica a 40x de *Megasphaera*; a) cultivo en CLBM a 2 días, b) cultivo en CLBM a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días.

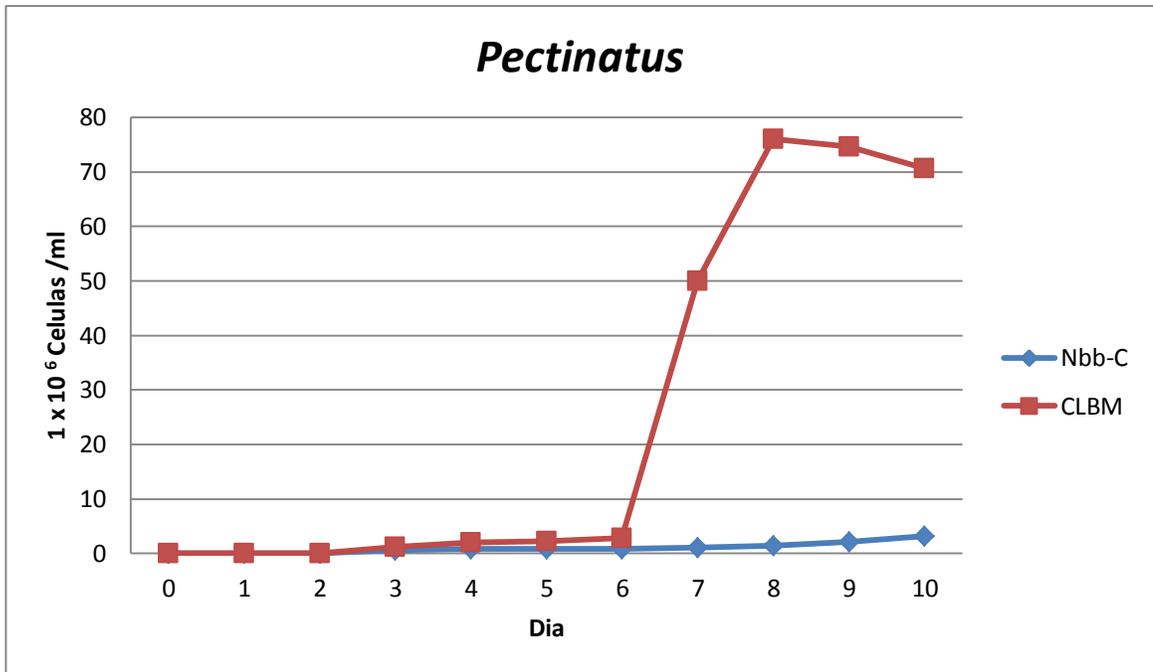


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Pectinatus* en medio MRS modificado (CLBM) y NBB-C/cerveza a 25 °C

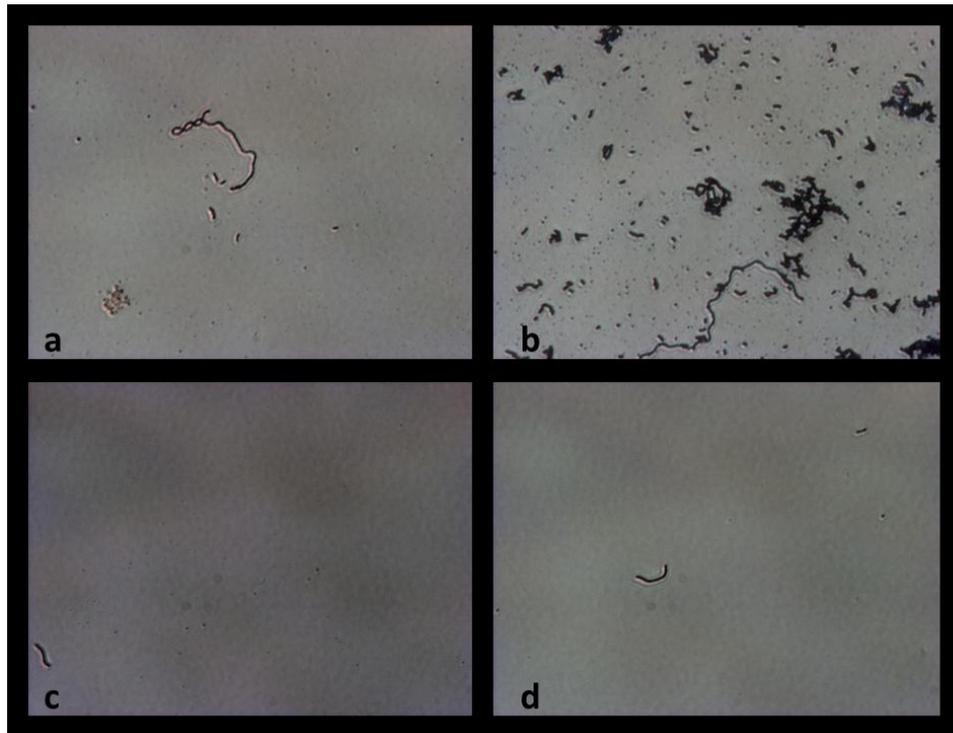


Figura 12. Observación microscópica a 40x de *Pectinatus*; a) cultivo en CLBM a 2 días, b) cultivo en CLBM a 10 días, c) cultivo en NBB-C a 2 días, d) cultivo en NBB-C a 10 días.

Estandarización de qPCR

Para conocer el número mínimo de células que podemos detectar con el método utilizado, realizamos el qPCR a cultivos con número de células conocidos de *Lactobacillus* y *Pediococcus*. En donde encontramos que 100 células/ml es la concentración mínima de bacterias en la que el equipo nos reporta un diagnóstico positivo (Tabla IV, Figs. 13 - 14).

Seguido a esto, realizamos el qPCR a las cepas de referencia para conocer las gráficas de Tm específicas para cada bacteria (Figs. 15-18) y compararlas con las reportadas en el manual del estuche comercial utilizado para la detección e identificación de las bacterias (Tabla V).

Tabla IV. Detección de *Pediococcus* y *Lactobacillus* por qPCR a distintas concentraciones de células

<i>Pediococcus</i> (células/ml)	CP	<i>Lactobacillus</i> (células/ml)	CP
1×10^7	26.89	1×10^7	19.88
1×10^6	25.79	1×10^6	26.69
1×10^5	20.98	$1 \times 10^{5*}$	ND
1×10^4	27.55	$1 \times 10^{4*}$	ND
1×10^3	32.05	1×10^3	30.45
1×10^2	33.31	1×10^2	31.26
$1 \times 10^{1*}$	ND	1×10^1	-
Control +	25.90	Control +	25.90

*, Concentraciones no utilizadas.

ND, Resultado no disponible.

-, resultado negativo.

Control +, este control es el control positivo incluido en el estuche comercial.

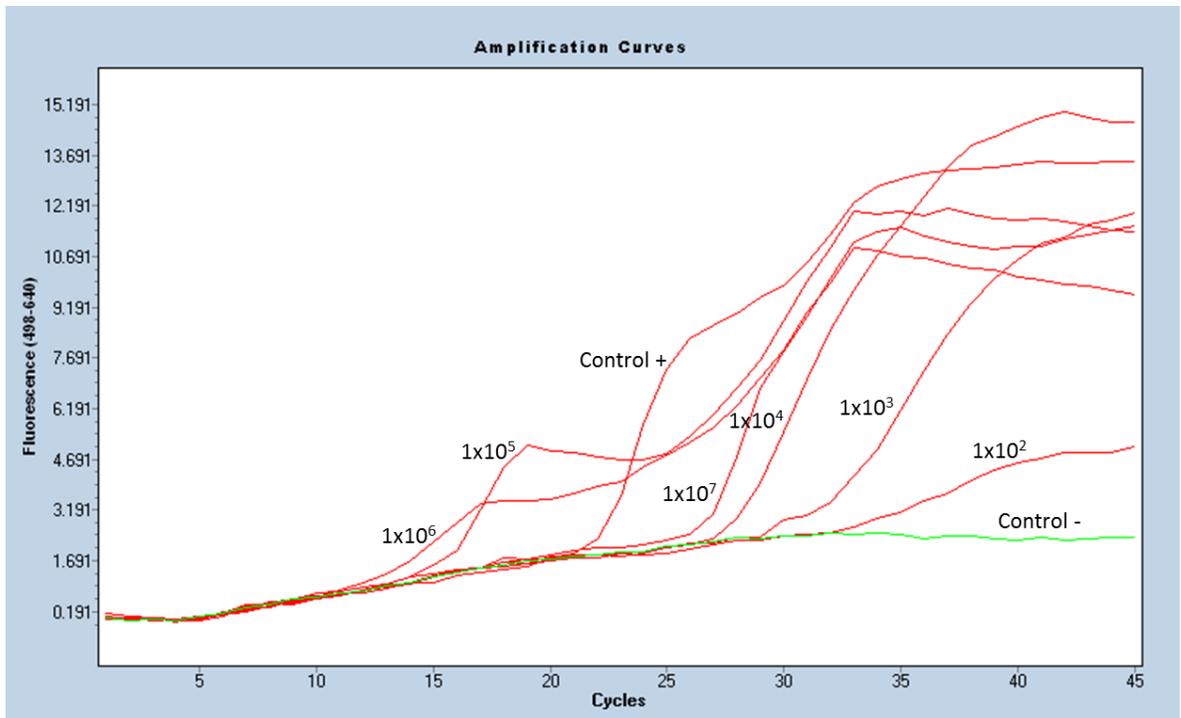


Figura 13. Curva de amplificación de cepa control para *Pediococcus*

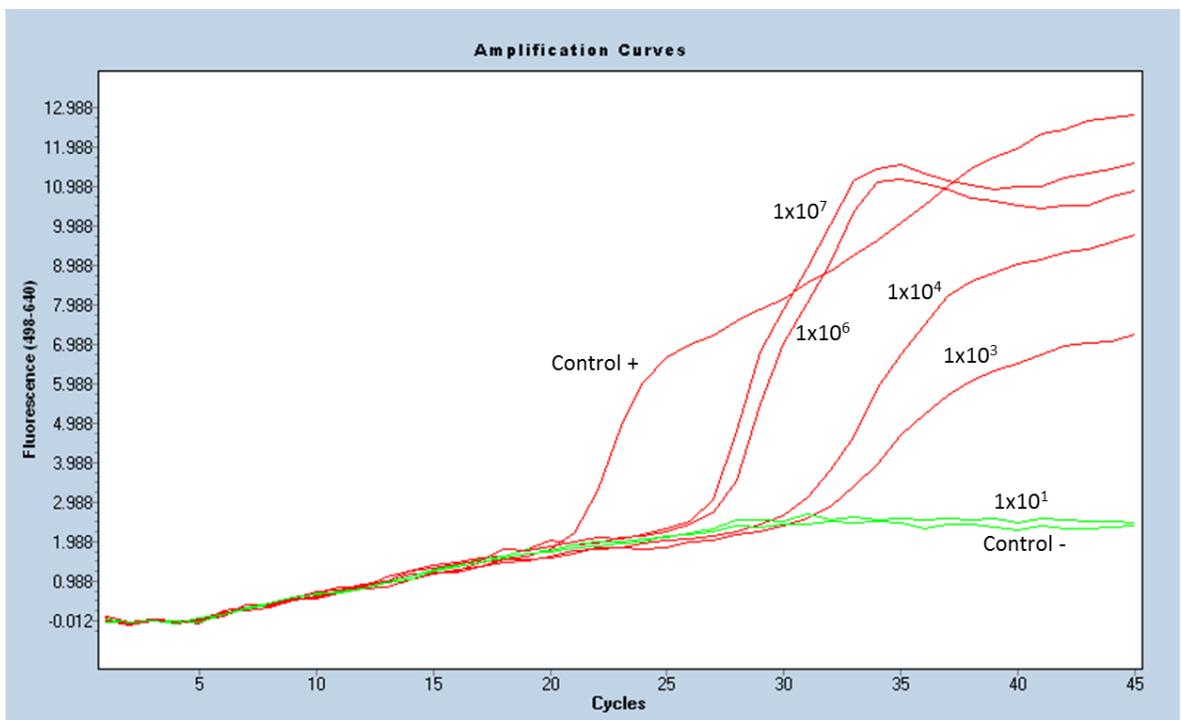


Figura 14. Curva de amplificación de cepa control para *Lactobacillus*

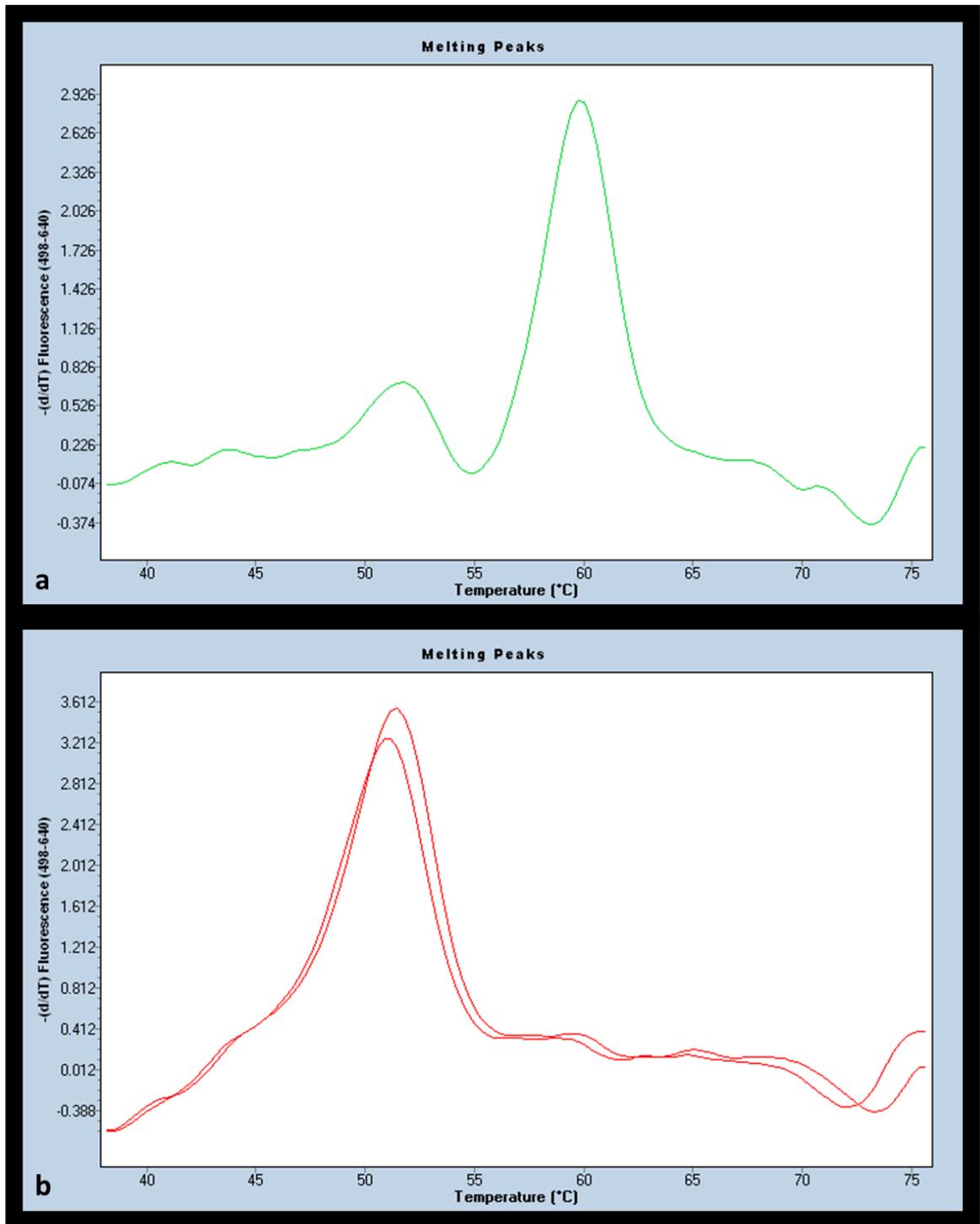


Figura 15. Temperatura de fusión (T_m) para la cepa de referencia de *Pediococcus*; a) T_m de muestras con menos de 1×10^5 células/ml, b) T_m de muestras con más de 1×10^6 células/ml.

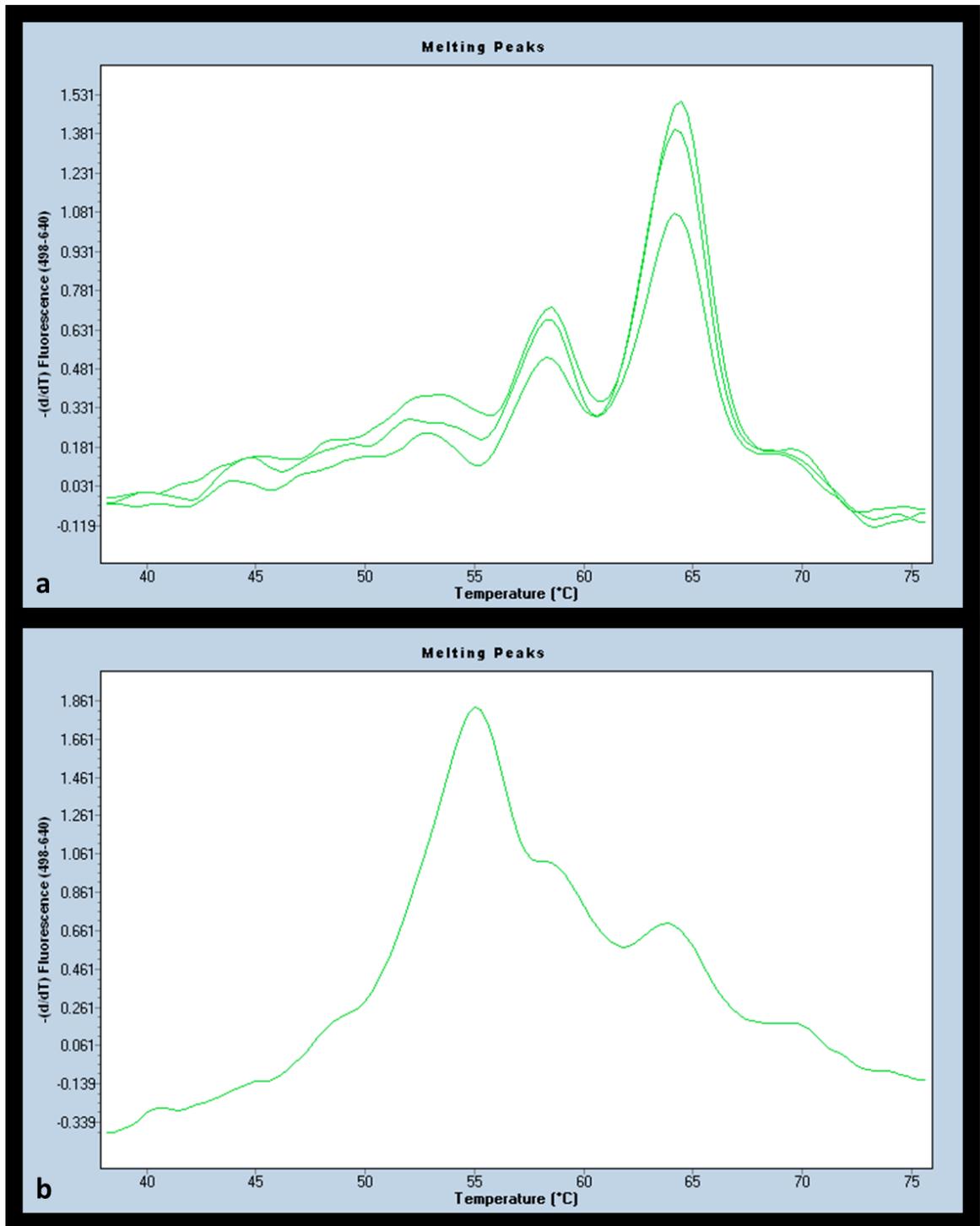


Figura 16. Temperatura de fusión (T_m) para la cepa de referencia de *Lactobacillus*; a) T_m de muestras con menos de 1×10^6 células/ml, b) T_m de muestras con más de 1×10^7 células/ml.

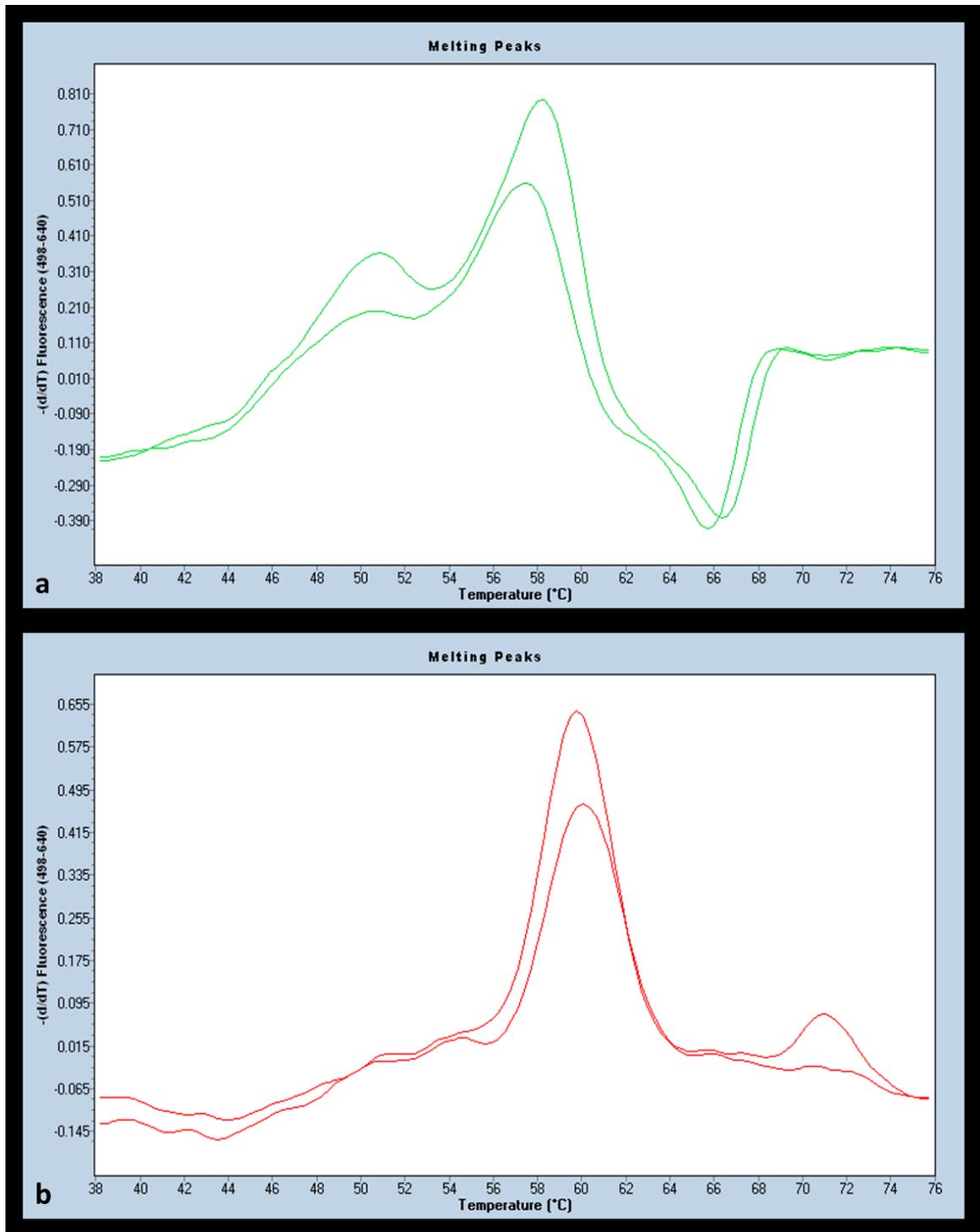


Figura 17. Temperatura de fusión (T_m) para la cepa de referencia de *Megasphaera*; a) T_m de muestras con menos de 1×10^5 células/ml, b) T_m de muestras con más de 1×10^6 células/ml.

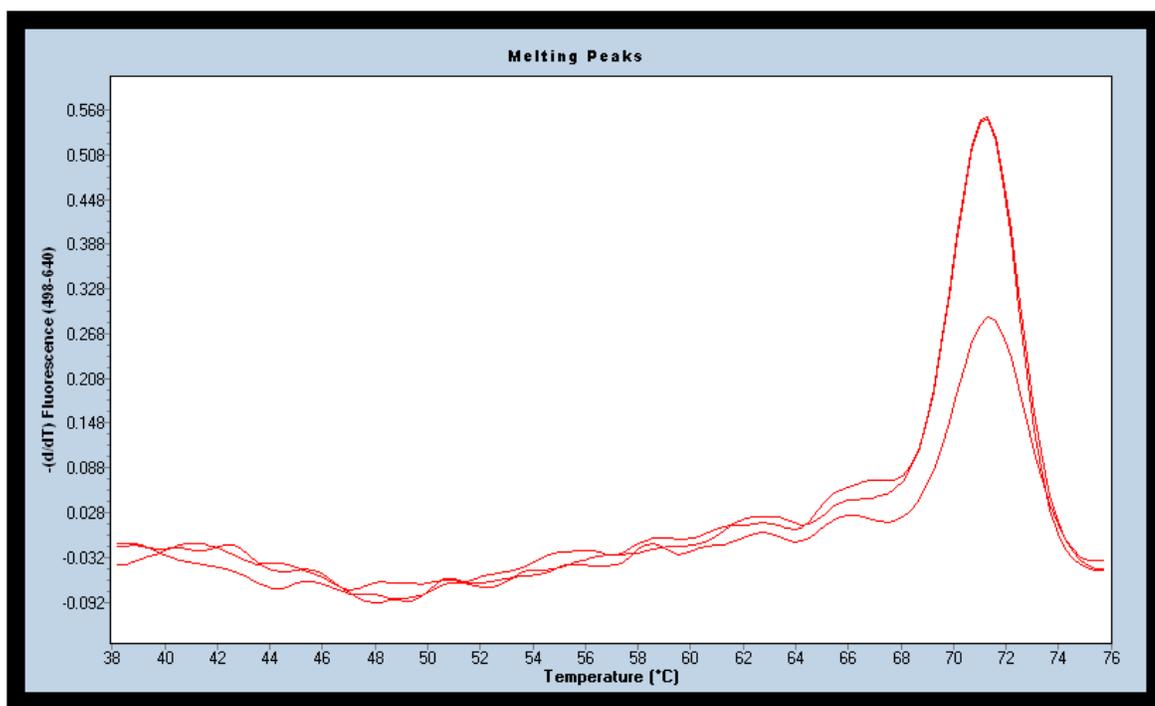


Figura 18. Temperatura de fusión (T_m) para la cepa de referencia de *Pectinatus*

Tabla V. Comparación del T_m de las cepas de referencia con el T_m reportado para las mismas

Cepa de referencia	T_m 640 observado	T_m 640 reportado ^a	Bacteria
<i>Pediococcus</i> sp.	53/60	53/59	<i>Pediococcus damnosus</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	55/58/64	55/60/65	<i>Lactobacillus</i> sp.
<i>Megasphaera</i> sp.	58	58	<i>Megasphaera cerevisiae</i>
<i>Pectinatus</i> sp.	70	56/65/69	<i>Pectinatus</i> sp.

a, Datos obtenidos del suplemento: Differentiation of groups and species via Melting curves Analysis in Channel 640/Back 530 and 705/Back 530, para el estuche de detección Foodproof® Beer Screening Kit de Bioteccon Diagnostics.

Análisis de muestras del ambiente cervecero

Las muestras obtenidas del ambiente cervecero se enriquecieron en medio CLBM y NBB-C a 25 y 30 °C respectivamente, durante 10 días, seguido se hizo la extracción de DNA a 10 ml de la muestra enriquecida para realizar el qPCR (Tabla VI).

De las 36 muestras analizadas, 29 dieron un diagnóstico positivo (Tabla VII), siendo *Lactobacillus* la bacteria encontrada con mayor frecuencia (Tabla VIII).

Tabla VI. Resultados de qPCR para las muestras del ambiente cervecero

Muestra	Medio	Resultado (CP 640)	Tm (640)	Bacteria
1	CLBM	+ (33.77)	53.16/59.25/64.51	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
2	CLBM	+ (34.12)	52.90/59.66/64.15	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
3	CLBM	+ (34.13)	52.84/59.20/64.80	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
4	CLBM	+ (31.80)	53.33/60.11	<i>P. damnosus</i>
	NBB-C	Negativo		
5	CLBM	+ (32.44)	52.77/59.35/64.70	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
6	CLBM	+ (28.82)	60.16	<i>P. damnosus</i>
	NBB-C	+ (22.82)	60.41	<i>P. damnosus</i>
7	CLBM	+ (33.01)	53.06/59.55/64.83	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
8	CLBM	+ (32.92)	53.09/60.36/64.40	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
9	CLBM	+ (32.47)	53.40/59.86/64.65/71	<i>Lactobacillus/Pectinatus</i>
	NBB-C	Negativo		
10	CLBM	+ (22.00)	52.99/59.96/64.91	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
11	CLBM	Negativo		
	NBB-C	+ (30.06)	53.33/60.11	<i>P. damnosus</i>
12	CLBM	+ (32.40)	53.13/59.78/65.08	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	+ (23.79)	53.60/58.56/65	<i>Lactobacillus</i>

Continúa Tabla VI

Muestra	Medio	Resultado (CP 640)	Tm (640)	Bacteria
13	CLBM	+ (33.51)	52.52/59.42/64.49	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
14	CLBM	+ (31.95)	52.75/60.11/64.55	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
15	CLBM	+ (23.78)	53.23/58.76/64.27	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	+ (15.63)	60.41/65.61	<i>Lactobacillus</i>
16	CLBM	+ (19.89)	53.21/58.95/64.15	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
17	CLBM	+ (22.27)	52.55/58.42/63.52	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	+ (19.63)	54/59.46/65.40	<i>Lactobacillus</i>
18	CLBM	+ (25.71)	52.35/59.09/63.96	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
19	CLBM	+ (19.89)	52.42/60.19/64.26	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	+ (19.59)	60.51/65.67	<i>Lactobacillus</i>
20	CLBM	+ (32.93)	53.48/59.51/64.67	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
30	CLBM	+ (32.49)	53.55/59.56/64.56	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
22	CLBM	+ (33.67)	60.23	<i>P. damnosus</i>
	NBB-C	Negativo		
23	CLBM	+ (31.70)	53.16/59.40/64.92	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	+ (34.51)	58.69/64.98/70.90	Indefinido
24	CLBM	+ (33.12)	53.16/59.82/64.31/71	<i>Lactobacillus/Pectinatus</i>
	NBB-C	Negativo		
25	CLBM	+ (33.01)	59.61	<i>P. damnosus</i>
	NBB-C	Negativo		
26	CLBM	+ (26.10)	59.20	<i>P. damnosus</i>
	NBB-C	+ (25.94)	62.07	<i>P. damnosus</i>
27	CLBM	+ (32.17)	53.27/60.25/64.57	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	Negativo		
28	CLBM	+ (32.75)	52.70/60.07/64.46	<i>Lactobacillus</i>
	NBB-C	+ (12.84)	52.49/60.07/64.74	<i>Lactobacillus</i>
29	CLBM	+ (33.08)	53.32/60.62	<i>P. damnosus</i>
	NBB-C	Negativo		
30	CLBM	+ (33.12)	60.38/65.55	Indefinido
	NBB-C	Negativo		

Continúa Tabla VI

Muestra	Medio	Resultado (CP 640)	Tm (640)	Bacteria
31	CLBM	Negativo		
	NBB-C	Negativo		
33	CLBM	Negativo		
	NBB-C	Negativo		
34	CLBM	Negativo		
	NBB-C	Negativo		
35	CLBM	Negativo		
	NBB-C	Negativo		
36	CLBM	Negativo		
	NBB-C	Negativo		

Tabla VII. Total de muestras positivas para cualquiera de las cuatro bacterias de interés en cada uno de los medios de cultivo

Muestras	(+)	CLBM (+)	NBB-C (+)	CLBM (+) y NBB-C(+)
36	29	21	1	7

Tabla VIII. Porcentaje de muestras positivas para cada bacteria detectada

Bacteria	Muestras +	CLBM	NBB-C	%
<i>Lactobacillus</i> sp.	22	22	5	75.9
<i>P. damnosus</i>	7	6	3	24.1
<i>Pectinatus</i> sp.	2	2	0	6.9
<i>M. cerevisiae</i>	0	0	0	0

En estos resultados podemos observar una mejor recuperación de bacterias contaminantes en las muestras enriquecidas en medio CLBM, ya que solo 8 muestras fueron positivas en NBB-C, mientras que 28 resultaron positivas en CLBM.

La bacteria encontrada con mayor frecuencia fue *Lactobacillus* sp., seguida de *P. damnosus* y *Pectinatus* sp. No encontramos ninguna muestra contaminada con *Megasphaera*. Por el otro lado, dos muestras que mostraron resultado positivo para la presencia de microorganismos, no pudimos identificar al microorganismo debido a que sus curvas de Tm no correspondían con ninguna de las reportadas en el estuche comercial ni en las obtenidas en nuestras cepas de referencia

DISCUSIÓN

En la observación bajo el microscopio de las cepas de referencia para *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* comprobamos que la morfología microscópica las cepas concuerda con las características esperadas para cada uno. Esto es indicio de la correspondencia con la literatura. Por lo tanto, podemos asumir que las cepas de referencia están correctamente identificadas. La cepa de *Lactobacillus* presentó morfología de bastón y con una tinción Gram positivo (Fig. 1). *Pediococcus* mostro células en forma de cocos, agrupadas en pares y tétradas con tinción Gram positivo (Fig. 2). La cepa de *Megasphaera* presento células en forma de cocos con un diámetro pequeño de 1 a 1.5 μm , las células se encontraron en pares o de manera individual y con tinción Gram negativo (Fig. 3). Para *Pectinatus* observamos células en forma de bastón curvo con longitudes de hasta 30 μm y tinción Gram negativo (Fig. 4). Estas características corresponden a cada uno de los géneros (Holt *et al.*, 1994). Posteriormente, realizamos el qPCR a las cuatro cepas de referencia con el estuche comercial Foodproof® Beer Screening con el cual pudimos identificar la especie de cada una de las cepas (Tabla V).

Para seleccionar un medio de enriquecimiento adecuado para la detección de bacterias en muestras de proceso de elaboración de cerveza, comparamos un medio MRS modificado (CLBM) y NBB con temperatura de incubación de 25 °C, los cuales son dos de los medios de cultivo más recomendados y utilizados para *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* en la industria cervecera (EBC. 2005; Susuki. 2011).

La comparación del crecimiento de las cepas en los dos medios de cultivo, nos mostró que las cuatro cepas mostraron un aumento en el número de células más rápido en el medio CLBM (Figs. 5, 7, 9, 11). Era de esperarse que *Lactobacillus* y *Pediococcus* tuvieran mejor crecimiento en el CLBM ya que el MRS está específicamente desarrollado para su uso BAL (De Man *et al.*, 1960) y además, las modificaciones realizadas al CLBM incluyen la adición de maltosa y extracto de malta, así como un

ajuste de pH de 5.7 a 4.8 para simular de mejor manera el ambiente natural de las bacterias que crecen en cerveza. Se ha observado que este tipo de modificaciones, como la adición de cerveza al medio MRS, favorecen el crecimiento de bacterias adaptadas al ambiente cervecero (Storgårds *et al.*, 1998; Susuki. 2008). Además, anteriormente ya habíamos observado en la tesis de licenciatura (García. 2010) que el medio CLBM funciona para el cultivo de bacterias adaptadas a la cerveza hasta en condiciones de alta presión selectiva por los ácidos del lúpulo presentes en la cerveza.

Al igual que con *Lactobacillus* y *Pediococcus*, observamos un aumento en el número de células más rápido de *Pectinatus* y *Megasphaera* en el medio CLBM. Esto puede ser causa, en parte, por la diferencia de pH entre el medio NBB y la cerveza, el medio NBB, como todos los medios recomendados para el aislamiento de bacterias que crecen en cerveza, es mayor a 5.4 (Barney *et al.*, 1990; Crumplen *et al.* 1991; EBC, 2005), mientras que en la cerveza, los pH más altos son de 4.7 (Susuki. 2011). Además, es posible que el crecimiento de *Megasphaera* se haya visto beneficiado en el medio CLBM ya que este medio contiene extracto de malta el cual incluye varios azúcares, entre ellos fructosa, y debido a que esta bacteria no puede metabolizar glucosa, se recomienda la adición de fructosa para alcanzar un mejor crecimiento (Engleman y Weiss. 1985).

En la estandarización de la técnica de qPCR utilizando el estuche Foodproof® Beer Screening encontramos que el número mínimo de células que podemos detectar es de 100 células/ml realizando la extracción a 10 ml de muestra. Otros estudios muestran que los límites inferiores de detección de microorganismos con qPCR pueden variar, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* en carne puede ser detectado en 500 UFC/2 g (Alarcon *et al.*, 2006), en comida de bebé se pueden detectar 60 UFC/ml de *Bacillus cereus* (Martinez-Blanch *et al.*, 2009) y en vino se han detectado cantidades de 31 UFC/ml de *Brettanomyces* (Tessonnière *et al.*, 2009). Ahora, si tomamos en cuenta el enriquecimiento de las muestras, podemos detectar bacterias en muestras con cantidades muy bajas de microorganismos contaminantes. En nuestro caso, observamos comenzando con un muestras con 10 UFC/ml, *Lactobacillus* y *Pectinatus* solo necesitan un día de enriquecimiento en medio CLBM o NBB-C para alcanzar el número de células

necesario para su detección por qPCR con el método utilizado (Fig. 5, 7). En cuanto a *Pectinatus* y *Megasphaera*, al tercer día de enriquecimiento en CLBM ya tenemos células suficientes para la detección (Fig. 9, 11).

De esta manera, obtuvimos un método de detección e identificación que consiste de un enriquecimiento de muestras del ambiente cervecero en un solo medio de cultivo (CLBM) incubado a una sola temperatura de 25 °C, en el cual logramos obtener células suficientes para el análisis de qPCR de los cuatro géneros de bacterias más importantes en las contaminaciones cerveceras en menos de 3 días.

La detección e identificación de bacterias que alteran la cerveza se realizó en 36 muestras del ambiente cervecero (Tabla VI), de las cuales 29 resultaron positivas para alguna de las cuatro cepas de interés. Es importante notar que de las 29 muestras positivas, 21 de ellas fueron en medio CLBM, 1 en NBB-C y 7 en los dos medios de cultivo (Tabla VII), lo que concuerda con nuestros resultados en las cinéticas de crecimiento que mostraron un mayor crecimiento de las cuatro cepas de referencia en el medio CLBM.

La bacteria encontrada con mayor frecuencia fue *Lactobacillus* sp. con 75.9% de muestras contaminadas, seguido de *P. damnosus* con 24.1% y por último *Pectinatus* sp. con 6.9%. Ninguna muestra se encontró contaminada con *Measphaera* (Tabla VIII). Según estudios anteriores, *Lactobacillus* es el género encontrado con mayor frecuencia en incidentes de contaminación de cerveza con 40 a 70%, seguido de *Pediococcus* con 3 a 30% y finalmente *Pectinatus* y *Megasphaera* con 5 a 10 % (Back, 1994; Back, 2003; Susuki, 2011).

La especie del *Lactobacillus* encontrado no se determinó ya que las curvas de temperatura de fusión para *L. brevis*, *L. linderi* y *L. buchneri* son muy similares. Por lo que en este caso, la especie encontrada podría ser cualquiera de estas tres ya que en los reportes de contaminación muchas bacterias se agrupan en *L. brevis* en donde se encuentran diversos tipos de bacterias con diferentes perfiles de fermentación, utilización de arginina y características morfológicas, incluyendo a *L. linderi* y *L. buchneri*, las cuales son muy similares a *L. brevis* (Back. 1994; Back. 2003; Susuki.

2011), además, con los avances en las técnicas moleculares, se han estado reclasificando cepas de *L. brevis* como nuevas especies (Vanacanneytet *al.*, 2006). La especie encontrada para *Pediococcus* fue la más común, *P. damnosus*. El estuche utilizado no muestra diferencia entre especies de *Pectinatus*. También es de notar, que no se pudieron identificar a los microorganismos de dos muestras que resultaron positivas, debido a que las curvas de Tm de estas dos muestras no correspondían a ninguna de las reportadas en el manual del estuche o a las curvas obtenidas con las cepas de referencia. Esto se puede deber a un resultado falso positivo o a errores en la preparación de la reacción de qPCR.

En las muestras analizadas se encontraron frecuencias de contaminación muy similares a reportes anteriores (Back. 1994; Back. 2003; Susuki. 2011), salvo que no se encontró ningún caso de contaminación por *Megasphaera*, esto se puede deber a que en muchas etapas del proceso existe oxígeno disuelto en el ambiente y debido a que *Megasphaera* y *Pectinatus* son bacterias anaerobias estrictas no pueden desarrollarse en estos lugares (Holtet *al.*, 1994; Susuki, 2011). Otro dato importante, es que en las muestras analizadas, *Pectinatus* siempre se detectó junto a *Lactobacillus* sp., con el cual podría estar formando biopelículas en donde *Lactobacillus* elimina el oxígeno del ambiente, permitiendo el desarrollo de *Pectinatus*. Las contaminaciones combinadas de *Pectinatus* con BAL son comunes en la industria cervecera (Back. 2005), esto se debe a que el ácido láctico producido por las BAL puede ser metabolizado por *Pectinatus* (Back. 1994).

Encontramos tres de las cuatro cepas más importantes en las contaminaciones de cerveza en las muestras analizadas, estas contaminaciones pueden ser provenientes de materia prima, de la levadura, pero debido a que estas bacterias han sido aisladas casi exclusivamente de ambientes cerveceros (Back. 2005; Haikara y Helander. 2006), lo más probable es que estén formando nichos ecológicos en diferentes etapas del proceso, causando contaminación de equipos, instrumentos y hasta el aire, que finalmente transfieren la contaminación a la cerveza en producción. Estos nichos se crean cuando las bacterias forman biopelículas con poblaciones diversas de microorganismos. En estas biopelículas, levaduras y bacterias aerobias consumen el oxígeno creando un ambiente anaerobio donde las BAL como *Lactobacillus* y *Pediococcus* producen ácido láctico el

cual puede ser utilizado como fuente de energía por *Pectinatus* y *Megasphaera*. Además, estas comunidades están protegidas de la desecación y hasta de procedimientos de desinfección por una cubierta de material extracelular producida por las bacterias aeróbicas de la biopelícula (Back. 1994; Lee *et al.*, 1994, Storgårds *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

1. Las cuatro cepas de referencia mostraron las características morfológicas y las curvas de temperatura de fusión correspondientes a los géneros de interés, siendo estas *Lactobacillus* sp., *P. damnosus*, *M. cerevisiae* y *Pectinatus* sp.
2. El medio MRS modificado (CLBM) mostró un aumento más rápido en el número de células en los cultivos las cepas de referencia de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* que el medio NBB-C.
3. El enriquecimiento de muestras de proceso en medio MRS modificado (CLBM) nos proporciona un mejor rendimiento en la detección con el método de qPCR utilizado.
4. Con el método de extracción de DNA automatizado y el qPCR con el estuche Foodproof® Beer Screening de BioteconDiagnostics se logró detectar e identificar un mínimo de 100 células/ml o, realizando un enriquecimiento de la muestra en CLBM durante máximo 3 días, se pueden detectar hasta 10 UFC/ml.
5. Se encontraron tres de los cuatro géneros de bacterias más importantes en la contaminación de cerveza en las muestras analizadas del ambiente de cervecerías, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Pectinatus*.
6. En las muestras analizadas, se encontró que al igual que en reportes de contaminación anteriores, *Lactobacillus* es el género más común de contaminaciones en cervecerías.
7. *Lactobacillus* sp. fue la bacteria detectada con mayor frecuencia, seguida de *Pediococcus damnosus* y *Pectinatus* sp. No se encontró a *Megasphaera*.

8. La incidencia de *Pectinatus* se encontró en muestras que también presentaban contaminación por *Lactobacillus*, lo que sugiere que *Pectinatus* se encuentra formando nichos ecológicos en el ambiente de las cervecerías junto con otros microorganismos.

LITERATURA CITADA

1. Alarcon, B., B. Vicedo, y R. Aznar. 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J. Appl. Microbiol.* **100**:352 – 364.
2. Andersson, D.I. y D. Hughes. 2009. Gene amplification and adaptive Evolution in Bacteria. *Annu Rev Genet.* **43**:167-95.
3. Back, W. 1981. Bierschädliche Bakterien. Taxonomie der bierschädlichen Bakterien. Grampositive Arten. *Monatsschr. Brau.* **34**: 267–276.
4. Back, W., M. Leibhard y I. Bohak. 1992. Flash pasteurization – membrane filtration. Comparative biological safety. *Brauwelt Int.* **1**:42-49.
5. Back, W. 1994 Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt Int.* **4**:326 – 333.
6. Back, W. 1995. Technological preconditions for 'cold aseptic' bottling of beer. *Brauwelt Int.* **13**:396–400.
7. Back, W., I. Bohak, M. Ehrmann, W. Ludwig y K. H. Schleifer. 1996. Revival of the species *Lactobacillus linderi* and the design of a species specific oligonucleotide probe. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**:322-325.
8. Back, W. 1997. Technical and technological prerequisites for 'cold sterile' bottling. *Brauwelt Int.* **15**:192-201.
9. Back, W. 2003. Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie – 15 Jahre Praxiserfahrung. *Brauwelt online.* **24/25**:1-5.
10. Back, W. 2005. Brewery. En: Back, W. (ed). Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology. Nürnberg; Germany: Fachverlag Hans Carl, Germany. 10–112.

11. Barney, M. C., E. J. Kot y E. Chicoye. 1990. Culture medium for detection of beer spoilage microorganisms. US Patent 4,906,573.
12. Barney, M., A. Volgyi, A. Navarro y D. Ryder. 2001. Riboprinting and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:553-560.
13. Behr, J., M. G. Gänzle y R. F. Vogel. 2006. Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6483 – 6492.
14. Bohak, I., K. Thelen y C. Beinfohr. 2006. Description of *Lactobacillus backisp.* nov., an obligate beer-spoiling bacterium. *Monatsschr. Brauwiss.* **59**:78 – 82.
15. Crosa, J.H., S. Falkow. 1981. Plasmids. En: P. Gerhardt. 1st ed. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. pp. 269 – 270.
16. Crumplen, R., D. Bendiak, C. Curran, L. DeBruyn, T. Dowhanick, P. Hedges, B. Hjortshøj, S. Holmay, G. Jansen, E. Van Engel y J. Müller. 1991. Media for lactobacilli. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **49**:174 – 176.
17. De Man, J. C., M. Rogosa y M. E. Sharpe. 1960. A médium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130 – 135.
18. DiMichele, L. y M. J. Lewis. 1993. Rapid, species specific detection of lactic acid bacteria from beer using the polymerase chain reaction. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **51**:63-66.
19. Doyle, L. M., J. O. Mclenerney, J. Mooney, R. Poewll, A. Haikara y A. P. Moran. 1995. Sequence of the gene encoding the 16S rRNA of the beer spoilage organism *Megasphaera cerevisiae*. *J Indst Microbiol.* **15**:67-70.
20. Dobson, C. M., H. Deneer, S. Lee, S. Hemmingsen, S. Glaze y B. Ziola. 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus*

clausseniisp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:2003 – 2010.

21. Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer y E. Stackebrandt. 2006. The Prokaryotes: Bacteria: firmicutes, cyanobacteria. 3^a ed. Editorial Springer, pp. 242, 243 y 348.
22. EBC, European Brewery Convention. 2005. Detection of contaminants. En: Analytica-Microbiologica-EBC Second Edition, EBC Microbiology Subcommittee, Eds., Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany. Section 4.
23. Engelmann, U. y N. Weiss. 1985. *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: A new Gram-negative obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. *System. Appl. Microbiol.* **6**:287 – 290.
24. Fath, M.J. y R. Kolter. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995–1017.
25. Fernandez, J.L. y W.J. Simpson. 1993 Aspects of the resistance of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:315 – 319.
26. Funahashi, W., K. Suzuki. Y. Ohtake. y H. Yamashita. 1998. Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **56**:64–69.
27. García, J. H. 2010. Detección molecular de los genes *horA*, *horC* y ORF5 asociados a la resistencia de bacterias ácido lácticas a iso-alfa-ácidos presentes en el lúpulo del proceso cervecero. UANL.
28. Gavini, F., J. Mergaert, A. Beji, C. Mielcarek, D. Izard, K. Kersters y J. De Ley. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersasp. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:337–345.

29. Haakensen M., C.M. Dobson, H. Deneer y B. Ziola. 2008. Real-Time PCR detection of bacteria belonging to the *Firmicutes* Phylum. *Int. J. Food Microbiol.* **125**:236-264.
30. Haikara, A. 1984. Beer spoilage organisms. Occurrence and detection with particular reference to a new genus *Pectinatus*. *Technical Research Centre of Finland, Publications.* **14**:47 app. 58.
31. Haikara, A. 1991. The genus *Pectinatus* and *Megasphaera*. In: The Prokaryotes, vol II, 2rid edn (Balows A, HG Triiper, M Dworkin, W Harder and K-H Schleifer, eds), Springer-Verlag, New York, Pp 1993-2004.
32. Haikara, A. 1992. Microbial contaminants in maltings and breweries. In: Korhola, M. and Backström, V. Proc. COMETT course on Microbial Contaminants, Helsinki 1991, 1992. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. **7**:229–242.
33. Haikara, A. y I. Helander. 2006. *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. En: The Prokaryotes Vol. 4, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer y E. Stackebrandt, Eds., Springer-Verlag: New York. pp. 965 – 981.
34. Helander, I. M., A. Haikara, I. Sadovskaya, E. Vinogradov y M. Salkinoja-Salonen. 2004. Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:543 – 552.
35. Henriksson, E. y A. Haikara. 1991. Airborne microorganisms in the brewery filling area and their effect on microbiological stability of beer. *Monatsschr. Brauwiss.* **44**:4-8.
36. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H. Sneath, J.T. Staley y S.T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9^a ed. Editorial Williams and Wilkins. pp. 71, 201, 299, 530 y 566.

37. Hough, J. S., D.E. Briggs, R. Stevens y T.W. Young. 1982. Microbial contamination in breweries. *Malting and Brewing Science*, Chapman & Hall, London. **2**:741-775.
38. Iijima, K., K. Suzuki, S. Asano, H. Kuriyama y Y. Kitagawa. 2007. Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer-spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* gene clusters. *J. Inst. Brew.* **113**:96–101.
39. Iijima, K., S. Asano, K. Suzuki, T. Ogata y Y. Kitagawa. 2008. Modified multiplex PCR methods for comprehensive detection of *Pectinatus* and beer-spoilage cocci. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**:2764-2766.
40. Ingledew, W. M. 1979. Effect of bacterial contamination on beer. A review. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **37**:145–150.
41. Jespersen, L. Y M. Jakobsen. 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* **33**:139-155.
42. Johnson, J.L. 1981. Genetic characterization En: P. Gerhardt. 1st ed. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. pp. 451 – 453.
43. Juvonen, R. Y M. L. Suihko. 2006 *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera suciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:695-702.
44. Kashket, E.R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev.* **46**:233-244.
45. Lee, S. Y., M. S. Mabee y N. O. Jangaard. 1978. *Pectinatus*, a new genus of the family bacteroidaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**:582-594.
46. Lee, S. Y. 1994. SMMP - A medium for selective isolation for *Megasphaera* and *Pectinatus* from the brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**:115-119.

47. Malette, M.F. 1969. Evaluation of growth by physical and chemical means. En J.R. Norris and D.W. Ribbons, *Methods in Microbiology*, vol. 1. Academic Press, London. p. 521-566.
48. Martinez-Blanch, J.F., G. Sanchez, E. Garay y R. Aznar. 2009. Development of a realtime PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* **135**: 15 – 21.
49. Nakagawa, A. 1978. Beer-spoilage lactic acid bacteria – Principal characteristics and simple methods of their selective detection. *Bull. Brew. Sci.* **24**:1 – 10.
50. Oriet, P. y H. Pfenninger. 1998. Keimgehaltsbestimmungen von Umgebungsluftmittels Air Sampler in mikrobiologischsensiblen Bereichen der Bierproduktion in Schweizer Brauereien. *Monatsschr. Brauwiss.* **51**:161–164.
51. Paier, H. J. y R. Ringhofer. 1997. Biologische Betriebskontrolle in der Praxis. Teil 3: *Schwachstellenmitihren Gegenmassnahmen.* *Brauind.* **82**:628–634.
52. Paulsen, I.T., M.H. Brown y R.A. Skurray. 1996. Proton dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575-608.
53. Poolman, B., A.J.M. Driessen y W.N. Konings. 1987. Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values. *Microbiol Rev.* **51**:498-508.
54. Postollec, F., H. Falentin, S. Pavan, J. Combrisson y D. Sohier. 2011. Recent Advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* **28**:848-861.
55. Priest, F.G. 1996. Gram-positive brewery bacteria. En: Priest, F.G. and Campbell, I. *Brewing Microbiology*. 3rd ed. Chapman & Hall, London. pp. 195–194.
56. Richards, M y MacRae, R.M. 1964. The significance of the use of hops in regard to the biological stability of beer. II. The development of resistance to hop resins by strains of lactobacilli. *J. Inst. Brew.* **70**:484 – 488.

57. Sakamoto, K., A. Margolles, H. W. van Veen y W. N. Konings. 2001. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *J. Bacteriol.* **183**:5371–5375.
58. Sakamoto, K., H.W. van Veen, H. Saito, H. Kobayashi y W.N. Konings. 2002. Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5374–5378.
59. Sakamoto, K. y W.N. Konings. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* **89**:105 – 124.
60. Sambrook, j., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2^a ed. Cold spring harbor laboratory press, pp. 1.25 – 1.28.
61. Sami, M., H. Yamashita, T. Hirono, H. Kadokura, K. Kitamoto, K. Yoda, y M. Yamasaki. 1997. Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *J. Ferment. Bioeng.* **84**:1–6.
62. Sami, M., K. Suzuki, K. Sakamoto, H. Kadokura, K. Kitamoto y K. Yoda. 1998. A plasmid pRH45 of *Lactobacillus brevis* confers hop resistance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**:361–363.
63. Schleifer, K. H., M. Leuteritz, N. Weiss, W. Ludwig, G. Kirchhof y H. Seidel-Rüfer. 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:19 – 27.
64. Seidel, H., W. Back, y N. Weiss. 1979. Isolation and systematic classification of beer spoilage, Gram-negative bacteria. Part III. What dangers do the Gram-negative cocci and rods described in parts I and II represent for beer? *Brauwissenschaft.* **32**:262-270.

65. Simpson, W.J. 1993. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Inst. Brew.* **99**:405-411.
66. Sneath, P.H., M.E. Sharpe, N.S. Mair y J.G. Holt. Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2. Editorial Williams and Wilkins. 1^a edición, 1986. pp. 1075 y 1212.
67. Stackebrandt, E., H. Pohla, R. Kroppenstedt, H. Hippe y C. R. Woese. 1985. 16S rRNA analysis of *Sporomusa*, *Selenomonas* and *Megasphaera*: On the phylogenetic origin of Gram-positive eubacteria. *Arch. Microbiol.* **143**:270 – 276.
68. Storgårds, E., O. Pihlajamäki y A. Haikara. 1997. Biofilms in the brewing process – a new approach to hygiene management. Proceedings of the 26th Congress of European Brewery Convention, Maastricht, 24– 29 May 1997. Pp. 717–724.
69. Storgårds, E., B. Pot, K. Vanhonacker, D. Janssens, P. L. E. Broomfield J. G. Banks y M. Suihko. 1998. Detection and identification of *Lactobacillus lindneri* from brewery environments. *J. Inst. Brew.* **104**:47 – 54.
70. Suzuki, K., M. Sami, H Kadokura, H. Nakajima y K. Kitamoto. 2002. Biochemical characterization of *horA*-independent hop resistance mechanism in *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* **76**:223–230.
71. Susuki, K., M. Koyanagi y H. Yamashita. 2003. Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45c. *J. Appl. Microbiol.* **96**:946–953.
72. Suzuki, K., M. Koyanagi, y H. Yamashita. 2004. Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45C. *J. Appl. Microbiol.* **96**:946–953.
73. Suzuki, K., K. Iijima, K. Ozaki, y H. Yamashita. 2005. Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers

for beer Spoilage ability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5089 – 5097.

74. Susuki, K., K. Iijima, K. Sakamoto, M. Sami y H. Yamashita. 2006. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* **112**:173–191.
75. Susuki, K. S. Asano, K. Iijima, H. Kuriyama y Y. Kitagawa. 2008. Development of detection médium for hard-to-culture beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **104**:1458 – 1470.
76. Susuki, K. 2009. Beer spoilage lactic acid bacteria. En: *Beer in Health and Disease Prevention*, V.R. Preedy y Watson, Eds. Elsevier Science: San Diego, USA. Pp. 150 – 164.
77. Susuki, K. 2011. 125th Anniversary Review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *J. Inst. Brew.* **117(2)**:131-155.
78. Taguchi, H., M. Ohkochi, H.Uehara, K. Kojima y M. Mawatari. 1990. KOT medium, a new medium for detection of beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **48**:72 – 75.
79. Tessonnière, H., S. Vidal, L. Barnavon, H. Alexandre y F. Remize. 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **129**:237 – 243.
80. Tsuchiya Y., H. Kaneda, Y. Kano y S. Koshino. 1992. Detection of beer spoilage organisms by polymerase chain reaction technology. *J AmerSoc Brew Chem.* **50**:64-67.
81. Tsuchiya, Y., Y. Kano, y S. Koshino. 1993. Detection of *Lactobacillus brevis* in beer using polymerase chain reaction technology. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51**:40–41.
82. Van Vuuren, H.J.J. 1996. Gram-negative spoilage bacteria. En: Priest, F.G. and Campbell, I. (eds.). *Brewing Microbiology*, 2nd ed. Chapman & Hall, London. pp. 163–191.

83. Vanacanneyt, M., S. M. Naser, K. Engelbeem, M. De Wachter, R. Van der Meulen, I. Cleenwerck, B. Hoste, L. De Vuyst y J. Swings. 2006. Reclassification of *Lactobacillus brevis* strains LMG 11484 and LMG 11984 as *Lactobacillus parabrevissp. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1553 – 1557.
84. Varnam, A.H. y J. P. Sutherland. 1994. Beverages. Technology, chemistry and microbiology (Food product series 2). Chapman & Hall, London. pp. 369 – 371.
85. Viegas, C. A., P. F. Almeida, M. Cavaco y I. Sá-Correia. 1998. The H⁺-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:779 – 783.
86. Whiting, M., M. Crichlow, W. M. Ingledew y B. Ziola. 1992. Detection of *Pediococci* spp. in brewing yeast by a rapid immunoassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:713-716.
87. Yasui, T., T. Okamoto y H. Taguchi. 1997. A specific oligo-nucleotide primer for the rapid detection of *Lactobacillus lindneri* by polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* **43**:157–163.
88. Ziola, B., M. Ulmer, J. Bueckert y D. Giesbrecht. 2000. Monoclonal antibodies showing surface reactivity with *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer spoilage bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **58**:63-68.