



**UNIVERSIDAD
TECNOLOGICA
NACIONAL**

FACULTAD REGIONAL ROSARIO

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

CATEDRA DE BIOTECNOLOGIA

Trabajo práctico n° 2
“Esterilización”

2009

- Jefe de Cátedra: *Ing. Eduardo Santambrosio*
- Jefe de Trabajos Prácticos: *Ing. Marta Ortega*
- Ayudante 1°: *Ing. Pablo A. Garibaldi*

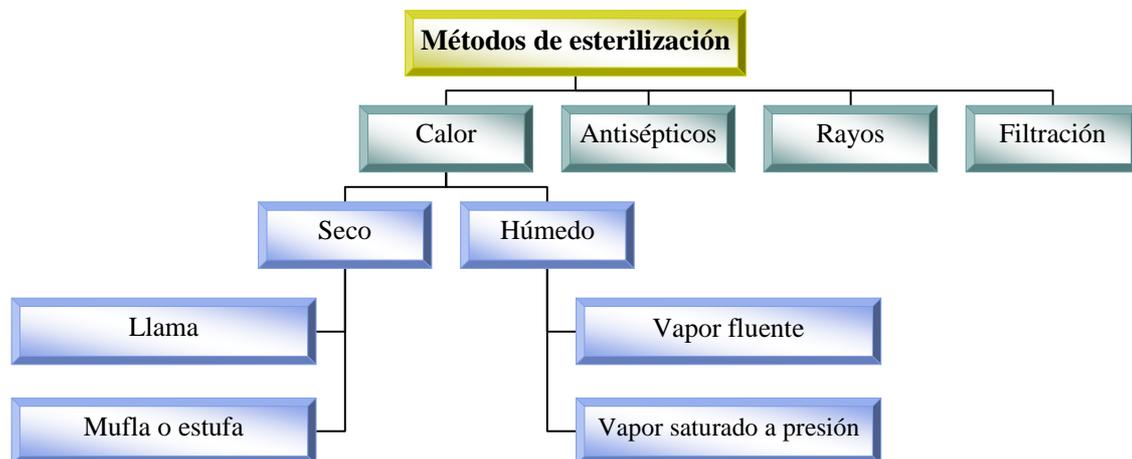
1. OBJETIVOS

Que el alumno desarrolle las habilidades para el manejo de equipos destinados a la esterilización de material de vidrio y diferentes medios de cultivo. Contribuir a distinguir las diferencias, de acuerdo al tipo de metodología a emplear según los casos que se presenten.

2. FUNDAMENTOS

2.1. Definición:

La esterilización consiste en la eliminación de los microorganismos existentes en un sistema. El objetivo es obtener materiales y medios aptos para la siembra de microorganismos a analizar. Existen diferentes métodos de acuerdo al objeto a esterilizar y el fundamento en el cuál se basan.



2.1.1. **Calor Seco:**

Como su nombre lo indica se transmite a través de un fluido seco caliente (aire). Presenta la desventaja, con respecto al calor húmedo, de que es poco penetrante. El aire húmedo es un conductor más eficiente del calor que el aire seco ya que el coeficiente de transmisión del calor del agua es mayor que el del aire ($K_{\text{agua}} > K_{\text{aire}}$).

La muerte de microorganismos en este caso se produce por deshidratación y por lo tanto hay que llegar a temperaturas elevadas (160 °C) durante tiempos altos (1 hora o más).

En el laboratorio se utiliza el calor seco para esterilizar material de vidrio y no para medios de cultivo, pues las altas



temperaturas usadas, pueden alterar la estructura (y la disponibilidad) de nutrientes tales como proteínas, hidratos de carbono, etc.

En el caso del calentamiento directo por llama, también llamado “flameado”, se utiliza especialmente para esterilizar agujas, ansas y otros elementos que no se deterioran con el tratamiento. Generalmente esta metodología es empleada para “repicar” células de un medio a otro.

2.1.2. Calor Húmedo:

Este tipo de calor es más conveniente porque el vapor de agua difunde por ósmosis a través de la membrana de los microorganismos, produciendo la muerte de los mismos por coagulación de su protoplasma y no por deshidratación, como en el caso del calor seco.

Los diferentes métodos utilizados son:

- **EBULLICIÓN:** se realiza a 100 °C, a esta temperatura se destruyen todas las células vegetativas, esporos de hongos y levaduras, y la mayor parte de las esporas bacterianas. Por lo tanto, cuando solo es necesario conseguir una esterilización “relativa”, puede recurrirse a este método. En el caso que deban esterilizarse líquidos, estos se llevan directamente a ebullición por tiempos variables, que dependen de diversos factores a considerar.

En caso de sólidos contenidos en recipientes, el material se sumerge en agua hirviente por tiempos variables.

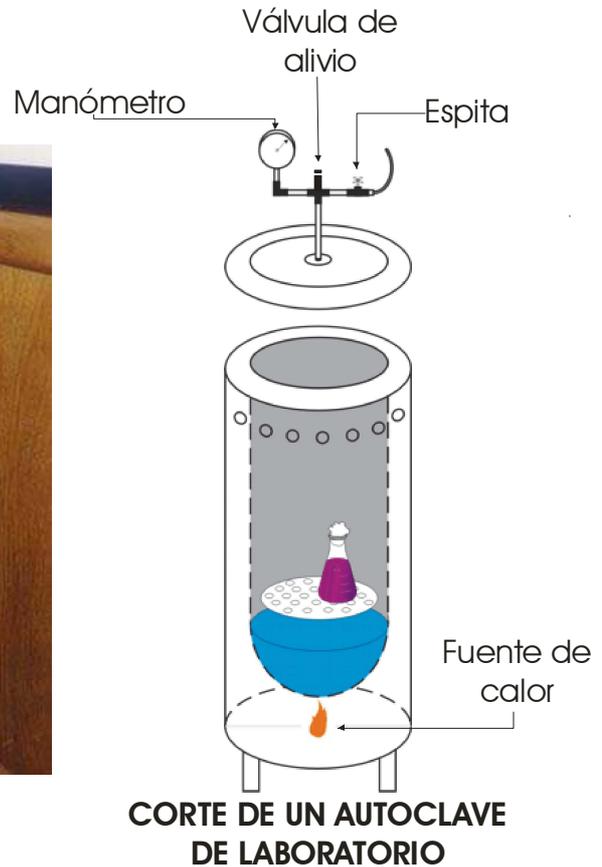
- **VAPOR FLUENTE:** consiste en un tratamiento con vapor de agua a presión atmosférica (o sea vapor saturado a 100 °C). Esta es una técnica útil para tratar sustancias que no admiten calentamientos superiores a 100 °C sin perder alguna de sus propiedades. Los equipos usados son sencillos y están constituidos por recipientes con falso fondo perforado, sobre el cuál se acomoda el material a esterilizar.

Este tratamiento se puede realizar también en el autoclave, trabajando con la espita abierta. El tiempo de calentamiento depende del material a tratar y su grado de contaminación.

- **VAPOR A PRESIÓN:** normalmente se realiza en el laboratorio la esterilización de medios de cultivo en un equipo denominado **autoclave**. Las condiciones de tiempo y temperatura dependen de la naturaleza del medio. Cabe destacar que a menudo la esterilización presenta dos aspectos a veces incompatibles, se quiere por un lado destruir todos los microorganismos presentes y por el otro evitar la alteración de los nutrientes. En realidad, el calor puede provocar la desnaturalización de vitaminas y otros factores de desarrollo, la separación de azufre coloidal (Cisterna, por ejemplo), caramelización de azúcares, etc. Por lo tanto se deben considerar para cada caso en particular las variables de la esterilización (esto es temperatura y tiempo).



En forma general se puede decir que a pH entre 4 y 5 es suficiente esterilizar durante 15 a 30 minutos a vapor fluyente; a un pH de 5 a 6,5 la temperatura asciende a 119 °C y a pH 6,5 a 7,5 se necesita una temperatura de 125 °C, todos durante el mismo tiempo.



2.1.3. Antisépticos:

Se denomina así a aquellas sustancias que son bactericidas (matan bacterias) y bacteriostáticas (inhiben su crecimiento y multiplicación).

Un mismo compuesto químico puede actuar como bactericida o bacteriostático, según la concentración de uso. Estos agentes pueden actuar coagulando proteínas, inactivando enzimas, produciendo modificaciones químicas en la superficie de las materias o modificando la permeabilidad de la membrana celular.

2.1.4. Rayos:

Uno de los más conocidos son los ultravioleta. Tienen acción fotoquímica directa sobre los constituyentes del protoplasma y núcleo, producen cambios estructurales en los cromosomas alterando las proteínas de las sustancias vitales, debido a su gran energía.

La acción depende de la intensidad, exposición, tipo de microorganismo y medio ambiente. Por ejemplo, los medios ricos en coloides protegen a los microorganismos de la acción de estos rayos. En caso de esporas, si son pigmentados resisten más que las células vegetativas.



2.1.5. Filtración:

Método utilizado para la esterilización de fluidos tales como aire, agua, etc., en el que los microorganismos están presentes en gran cantidad. Consiste en varios paños fibrosos empaquetados, por donde se obliga al aire a circular. Las partículas suspendidas en el fluido chocan con las fibras del paño, perdiendo energía cinética y deteniéndose finalmente en una de ellas donde queda adherida. Por recirculación de aire en sentido inverso, pueden regenerarse los filtros.



2.2. Esterilización con el calor

Tiempo de muerte térmica: es el tiempo necesario para destruir la totalidad de las células presentes de un microorganismo dado, a una determinada temperatura (relativamente elevada).

Varios factores tienen importancia sobre la acción destructiva del calor. Los más importantes son:

2.2.1. Relación Temperatura – Tiempo

La temperatura y el tiempo de esterilización son dos factores interdependientes y cuando se estudia la acción de uno de ellos, debe mantenerse el otro constante. Se obtiene el mismo resultado usando temperaturas altas durante tiempos breves que usando temperaturas bajas durante un tiempo más prolongado. La relación que los vincula es logarítmica.

2.2.2. Concentración inicial de células

Cuanto mayor sea el número inicial de células, tanto más largo debe ser el periodo de calentamiento o más alta la temperatura, para obtener la destrucción total. Cuanto más alto sea el número de células presentes, tanto mayor será la probabilidad de la presencia de células que tengan una resistencia mayor a la temperatura.

2.2.3. Cantidad de agua presente

Las proteínas del protoplasma son coaguladas en general, alteradas irreversiblemente por el calor. Además de la temperatura, tiene importancia la cantidad de agua presente, debido a su capacidad de conducción del calor. A modo de ejemplo, los esporos se destruyen a 110 °C - 120°C en 20 – 30 minutos, en presencia de agua, mientras que es necesario un tratamiento a 160 °C durante 3 horas para destruirlos mediante calor seco.

2.2.4. pH

A medida que el pH se aleja de la neutralidad, la acción del calor se vuelve más destructiva.

2.2.5. Tipo de microorganismo

No solo las células de microorganismos de especies diferentes tienen distinta resistencia hacia el calor, sino que células de la misma cepa pueden demostrar ciertas diferencias.

Los esporos son más resistentes al calor que las células vegetativas. En general, los esporos bacterianos tienen una extraordinaria resistencia al calor.

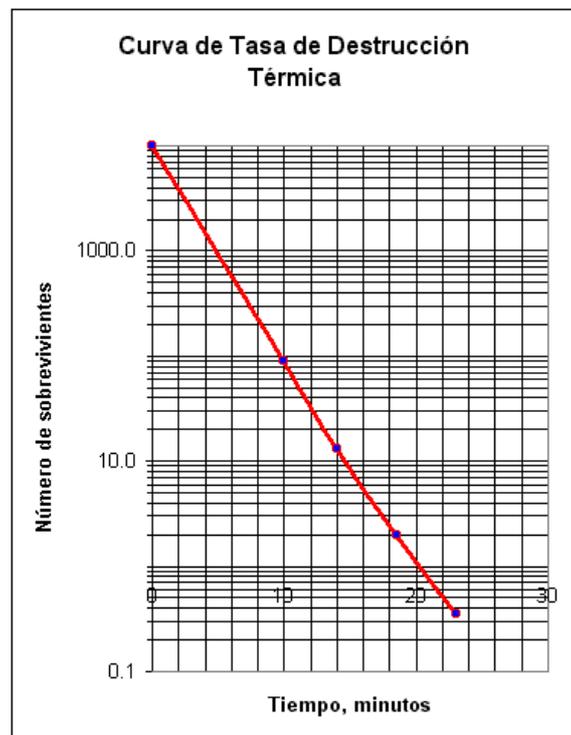
El calentamiento de esporos a una temperatura subletal estimula y acelera la germinación de los mismos.

La muerte térmica sigue una ley logarítmica, dado que en cada instante el número de células que mueren es proporcional al número de células vivas. Por lo tanto:

$$\frac{-d \cdot (V - M)}{dt} = k \cdot (V - M)$$

donde:

V = número de células vivas
M = número de células muertas
(V - M) = número de sobrevivientes
k = constante de velocidad
t = tiempo



3. DESARROLLO

El trabajo en laboratorio consiste en acondicionar material de vidrio, preparar diferentes tipos de medios de cultivo y esterilizarlos seleccionando el método óptimo para cada caso.

4. MATERIALES

- Pipetas de 1,5 y 10 ml
- Placas de Petri
- Erlenmeyers de 125 y 250 ml
- Tubos de ensayo
- Medios de cultivo sólidos y líquidos preparados
- Autoclave
- Estufa de 200 °C