



**Evaluación y determinación de reguladores de acidez competentes para el ajuste de pH en  
los medios de cultivo empleados en Postobón S.A.S.**

María Camila Uribe Duque

Ingeniera Bioquímica

Asesor

Rigoberto Ríos Estepa, PhD

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Bioquímica

Medellín

2023

<b>Cita</b>	(Uribe, 2023)
<b>Referencia</b>	Uribe Duque, M. (2023). <i>Evaluación y estimación de reguladores de acidez competentes para el ajuste de pH en los medios de cultivo empleados en Postobón SAS</i> [Ingeniería Bioquímica]. Universidad de Antioquia, Carepa Antioquia, Colombia
<b>Estilo APA 7 (2020)</b>	



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

**Rector:** John Jairo Arboleda Céspedes.

**Decano/Director:** Julio César Saldarriaga Molina.

**Jefe departamento:** Lina María González Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mis padres, porque siempre me apoyaron en todo el transcurso de mi carrera brindándome todo lo necesario para lograr llegar hasta este punto, especialmente quiero agradecer a mi mamá Liliana María Duque Tapias quien siempre me dio ánimos para seguir adelante y luchar por mis sueños. A Dios que siempre me mostro el mejor camino y me ha dado las mejores cosas de la vida, también quiero dedicar este trabajo a cada uno de mis amigos que en momentos difíciles estuvieron para ayudarme.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer primordialmente a la Universidad de Antioquia que abrió sus puertas para formarme como profesional y persona, también agradezco a todos los profesores que en el transcurso de la carrera me brindaron su conocimiento. Agradezco a mi asesor Rigoberto Ríos Estepa quien estuvo acompañando y apoyando mi proceso de prácticas para hacer el trabajo de la mejor forma posible. Finalmente agradezco a la empresa Postobón SAS y compañeros quienes permitieron culminar mi última etapa de la universidad brindándome la oportunidad de obtener grandes conocimientos y experiencias inolvidables.

## Tabla de contenido

Resumen	9
Abstract	9
Introducción	10
1 Objetivos	12
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos	12
2 Marco teórico	13
2.1. Medio de cultivo.	13
2.2. Control de pH en medios de cultivo	13
2.3. Selectividad de un medio de cultivo	13
2.4. Productividad de un medio de cultivo	13
2.5. Tipos de medios	14
2.5.1 Agar de man, rogosa y sharpe	14
2.5.2 Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol	14
2.5.3 Agar de suero de naranja	14
2.6. Ácidos orgánicos como estabilizantes de pH.	14
2.6.1. Ácido tartárico	15
2.6.2. Ácido fosfórico.	15
2.7. Normatividad	15
2.7.1. Norma EN ISO 11133	15
3 Metodología	16
3.1. Preparación de medios de cultivo	16
3.1.1 MRS (Agar de man, rogosa y sharpe) – Millipore	16

3.1.2	YGC (Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol) – Millipore	16
3.1.3	OSA (Agar de suero de naranja) – Millipore	16
3.2.	Ajuste de pH en el medio	16
3.2.1	Ajuste de pH del medio con ácido tartárico.	17
3.2.2	Ajuste de pH del medio con ácido fosfórico.	17
3.3.	Preparación de inóculo para siembra en medios de cultivo modificados	17
3.4.	Control de la calidad y ensayo del rendimiento de los medios de cultivo (ISO, 2014).	17
3.4.1.	Control de calidad física	17
3.4.2.	Medio de cultivo de referencia	18
3.4.3.	Método cuantitativo para medios de cultivo sólidos	18
3.4.4.	Cálculo e interpretación de los resultados	18
4	Resultados	21
4.1.	Uso de compuestos orgánicos para el control de pH	21
4.1.1.	Ácido tartárico	21
4.1.2.	Ácido fosfórico	22
4.2.	Diseño experimental	23
4.3.	Validación.	24
5	Análisis	27
5.1.	Análisis del crecimiento de levadura en los medios de cultivo.	27
5.2.	Análisis del crecimiento de bacteria esporulada en los medios de cultivo.	30
5.3.	Análisis de productividad de bacteria no específica.	31
6	Conclusiones	33
	Referencias	34

## Lista de tablas

Tabla 1. Ajuste de pH en Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol ( $6,6 \pm 0,2$ ).	21
Tabla 2. Ajuste de pH en Agar de man, rogosa y sharpe ( $5,6 \pm 5,9$ ).	21
Tabla 3. Ajuste de pH en Agar de suero de naranja ( $5,5 \pm 0,1$ ).	22
Tabla 4. Ajuste de pH en Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol ( $6,6 \pm 0,2$ ).	22
Tabla 5. Ajuste de pH en Agar de man, rogosa y sharpe ( $5,6 \pm 5,9$ ).	22
Tabla 6. Ajuste de pH en Agar de suero de naranja ( $5,5 \pm 0,1$ ).	23
Tabla 7. Recuperación de levadura en los medios de cultivo implementados.	23
Tabla 8. Recuperación de bacteria esporulada en los medios de cultivo implementados.	23
Tabla 9. Recuperación de bacteria en los medios de cultivo implementados.	23
Tabla 10. Recuperación de levadura en los medios de cultivo implementados.	24
Tabla 11. Recuperación de bacteria esporulada en los medios de cultivo implementados.	24
Tabla 12. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de levadura con ácido tartárico como regulador de pH.	24
Tabla 13. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de bacteria esporulada con ácido tartárico como regulador de pH.	25
Tabla 14. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de bacteria con ácido tartárico como regulador de pH.	25
Tabla 15. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de levadura con ácido fosfórico como regulador de pH.	25
Tabla 16. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de bacteria esporulada con ácido fosfórico como regulador de pH.	26

## Lista de figuras

Figura 1. Levadura específica para el crecimiento en todos los medios de cultivo. ....	28
Figura 2. Comparación de productividad en el medio de cultivo YGC .....	28
Figura 3. Comparación de productividad en el medio de cultivo MRS. ....	29
Figura 4. Comparación de productividad en el medio de cultivo OSA.....	29
Figura 5. Bacteria específica para crecimiento en el medio de cultivo OSA. ....	30
Figura 6. Comparación de productividad en el medio de cultivo OSA.....	30
Figura 7. Bacteria no específica para el crecimiento de alguno de los medios de cultivo. ....	31

## **Siglas, acrónimos y abreviaturas**

<b>MRS</b>	Agar de MAN, ROGOSA y SHARPE
<b>YGC</b> microbiología	Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (FIL-IDF) para
<b>OSA</b>	Agar suero de naranja
<b>UdeA</b>	Universidad de Antioquia
<b>HCL</b>	Ácido clorhídrico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio



---

## Resumen

La identificación de las condiciones óptimas en los medios de cultivo ha sido uno de los problemas más comunes en el proceso de verificación microbiológica de producto terminado en la empresa Postobón S.A. Dadas las condiciones presentadas, en el presente trabajo se decidió realizar análisis en los tres tipos de medios de cultivo más implementados en los análisis microbiológicos de Postobón, utilizando como regulador de acidez el ácido tartárico y fosfórico para obtener un pH óptimo. Para llevar a cabo la evaluación de los ácidos se tuvo en cuenta la norma ISO 11133, la cual garantiza la calidad de los medios de cultivo en el análisis de alimentos. Trabajando con las pautas que en esta norma se presenta, se llegó a la conclusión de que el ácido fosfórico presenta un mejor desempeño, productividad, y selectividad de los microorganismos correspondientes a cada medio de cultivo usado.

*Palabras clave:* pH, medios, ácido, promoción y crecimiento.

## Abstract

Stablishing the optimal conditions for culture media has been one of the main problems that have arisen in microbiological verification of the finished product in the company Postobón S.A. Given the conditions presented, it was decided to carry out analyzes in the three types of culture media most implemented in the microbiological analyzes of Postobón, using tartaric and phosphoric acid as acidity regulator to obtain an optimal pH. To carry out the evaluation of acids, the ISO 11133 standard was considered, which guarantees the quality of culture media in food analyses. Working with the guidelines presented in this standard, evidence of better behavior in phosphoric acid was observed, due to the fact that there is better productivity and selectivity of the microorganisms associated with the corresponding culture medium.

*Keywords:* pH, media, acid, promotion and growth.

---

## Introducción

Postobón es una de las empresas más grandes e importantes en Colombia con una amplia variedad de productos, dedicada a la fabricación y producción de bebidas azucaradas; también ha incursado en la producción de snacks. En toda empresa de alimentos se deben hacer análisis correspondientes de calidad en los productos elaborados, por ello, se realizan análisis fisicoquímicos y microbiológicos, desde tratamientos de aguas hasta el producto terminado. Para los análisis microbiológicos es necesario tener medios de cultivos aptos en la determinación de la presencia de ciertos microorganismos, como bacterias, hongos, entre otros; la mayoría de los medios de cultivo tienen definido que regulador de acidez es necesario usar en el mantenimiento estable. Sin embargo, muchos de estos reguladores pueden ser tóxicos o generan cambios físicos no adecuados durante la siembra.

El pH es un parámetro muy importante para el crecimiento de los microorganismos, ya que al no tener estabilidad puede inhibir el crecimiento o hacer cambios físicos en el medio como gelificación, entre otros (Sanz, 2011). Los reguladores de acidez mantienen un pH óptimo en el medio de cultivo; para cada microorganismo este valor es diferente ya que los nutrientes, entre otros factores, pueden variar en concentración. Aunque algunos microorganismos tienen la capacidad de adaptarse es recomendable controlar el pH; así, se hace necesario identificar otros reactivos que sin modificar física ni químicamente el medio, puedan regular el valor del pH.

La mayoría de las industrias requieren regulación de acidez ya sea el interés específico de cada una; para este propósito, muchas de ellas emplean HCl. Sin embargo, no es el único ácido empleado, ya que industrias como la farmacéutica y alimentaria se usa el ácido tartárico. Otros ácidos que son de gran uso incluyen el fosfórico y perclórico, dado su carácter de ácido fuerte.

El ácido tartárico tiene una presentación sólida granular color blanco, es un ácido fuerte que se mantiene estable al aire y a la luz, se solubiliza tanto en agua como en alcohol (Rojas, Ojeda, Bosch, & Ruiz, 2008). Es un gran acidificador para inhibir el crecimiento de bacterias manteniendo el crecimiento específico de los hongos, ya sea que se tenga un interés particular sobre el hongo. A

manera de ejemplo, el crecimiento de phytophthora en presencia de bacterias, es exequiblemente controlado mediante el uso de ácido tartárico; en muchos casos suelen usarse antibióticos lo que acarrea costos más elevados; el ácido tartárico es más económico y asequible (Solache, Rodríguez, Naranjo, Celaya, & Fernández, 2010).

En esta práctica Industrial se identificaron ácidos orgánicos útiles en el ajuste del pH en el medio de cultivo, sin modificarlo. De manera simultánea, se desarrolló un protocolo de validación que pueda ser usado en futuros trabajos relacionados. Se buscó evaluar algunos medios en los cuales se promueve el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas. Adicionalmente, se realizó una siembra de las cepas de interés que eventualmente crecen en bebidas azucaradas, con el propósito de verificar la viabilidad de los medios en cuanto a crecimiento, teniendo en cuenta el potencial efecto adverso de los reactivos suministrados.

## **1 Objetivos**

### **1.1 Objetivo general**

Diseñar y desarrollar una estrategia metodológica que, de manera segura y económica, permita el control del pH en los medios de cultivo empleados.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Identificar diferentes compuestos orgánicos, para el uso del control de pH en los medios de cultivo usados en los laboratorios de control de calidad microbiológica de Postobón S.A.
- Diseñar y desarrollar un arreglo experimental que permita evaluar la pertinencia, desde el punto de vista técnico, económico y de seguridad, en compuestos orgánicos sugeridos para el control del pH de los medios de cultivo.
- Validar experimentalmente el efecto de los compuestos orgánicos planteados sobre las actividades de control de calidad en la empresa Postobón S.A.

---

## **2 Marco teórico**

Postobón SAS genera productos para consumo humano, lo que requiere un gran énfasis en aspectos microbiológicos para evitar cualquier tipo de contaminación en las diferentes líneas de productos, y así evitar posibles daños a los consumidores. De esta manera, es necesario disponer de todos los medios en los que se determina la presencia de ciertos microorganismos que pueden causar daños severos durante la conservación de los alimentos. Los medios utilizados deben atender a normativas que avalen su inocuidad y eficiencia; un medio de cultivo es considerado apto si presenta estabilidad a condiciones establecidas de temperatura y pH, y sus componentes son los adecuados para promover el crecimiento de un grupo selecto de organismos. Establecer tales condiciones hace parte del diseño apropiado de medios de cultivo.

### **2.1. Medio de cultivo.**

Un medio de cultivo es una conformación de sustancias ya sea de manera líquida, sólida o semi-sólida que contiene nutrientes o constituyentes naturales o sintéticos para promover el crecimiento, conservación e identificación de ciertos microorganismos (norma ISO 11133).

### **2.2. Control de pH en medios de cultivo**

El pH en los medios de cultivo debe ser exacto, ya que este puede afectar el proceso de siembra. Los medios de cultivo deshidratados vienen con especificaciones del rango en pH para ser apto en su preparación; si el pH es muy ácido es posible controlarlo mediante la adición de una base y si es muy básico debe agregarse un ácido. Igualmente, antes y después de la esterilización debe verificarse el pH en estado sólido (Lopardo, 2016).

### **2.3. Selectividad de un medio de cultivo**

Se refiere a la capacidad de inhibir el crecimiento de un microorganismo no especificado o de interés, sobre un medio de cultivo selectivo en condiciones exactas (norma ISO 11133).

### **2.4. Productividad de un medio de cultivo**

La productividad se expresa por la recuperación que tiene un microorganismo definido en el medio de cultivo selecto para el mismo (norma ISO 11133).

## **2.5. Tipos de medios**

### **2.5.1 Agar de man, rogosa y sharpe**

Medio de cultivo adecuado para el crecimiento de bacterias ácido-lácticas específicamente, desde muestras clínicas o alimentos; tiene un color oscuro y hace parte de los medios sólidos para bacterias. Su incubación debe estar a una temperatura entre 33 a 37°C. La presentación en la que se trabaja el medio es deshidratado bajo condiciones específicas para sus diferentes parámetros. La verificación de crecimiento bacteriano en este medio sólido, requiere de 24 a 72 horas (Britania, 2021).

### **2.5.2 Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol**

El medio de cultivo YGC determina la presencia de mohos y levaduras en productos lácteos; para expresarse y mostrar crecimiento, el lapso mínimo de espera es entre 3 a 5 días, debido que es el tiempo que tarda comúnmente en crecer estos microorganismos. La temperatura más apropiada para este medio está entre 21 a 28°C para el debido crecimiento de levaduras y mohos. Su presentación es sólida (granulada), ya que es un medio deshidratado y su preparación para la propagación debe ser sólido (Microkit, 2020).

### **2.5.3 Agar de suero de naranja**

El agar suero de naranja permite el cultivo selectivo tanto de bacterias como levaduras; las temperaturas de incubación van desde 30 a 35°C, durante 48 horas. Este medio viene en presentación deshidratado granular. La siembra en este tipo de medio requiere que este en estado sólido, si es por superficie, y estado líquido si es por profundidad, permitiendo así que solidifique para el proceso de incubación (Scharlau, 2022).

## **2.6. Ácidos orgánicos como estabilizantes de pH.**

### **2.6.1. Ácido tartárico**

El ácido tartárico tiene múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, como reactivo de laboratorio, entre otras. Puede usarse como acidulante, antioxidante reforzador. Su presentación viene granulada color blanco; es soluble en agua y alcohol, por esta razón es comúnmente utilizado en la regulación de pH en vinos (QUIMIPUR, 2019).

### **2.6.2. Ácido fosfórico.**

El ácido fosfórico se encuentra en una presentación sólida incolora, es de fácil dilución en agua, pero requiere de gran cantidad. Es usado en el sector industrial específicamente en la industria alimentaria, bebidas, tratamiento de aguas, entre otras áreas. Su manejo demanda precauciones y cuidados especiales, como por ejemplo al contacto con los ojos, e igualmente ante una posible inhalación (Jersey, 2004).

## **2.7. Normatividad**

### **2.7.1. Norma EN ISO 11133**

La ISO es una organización sin ánimo de lucro, donde se promueve el desarrollo e implementación de normas internacionales de elaboración y servicios. Fue creada el 23 de febrero de 1947, su objetivo principal, es brindar la forma de llevar la información sobre bienes, servicios, entre otros temas de interés a nivel internacional (EAFIT, 2014). Una de las normas ISO que trata aspectos relacionados con la preparación de medios de cultivo para análisis en alimentos es la ISO 11133.

Esta norma está relacionada a la garantía de calidad en los medios de cultivo, especificando los requerimientos para la preparación de los medios que tienen como objetivo los análisis microbiológicos de productos alimenticios destinados a consumo humano y animal (norma ISO 11133).

### **3 Metodología**

Los medios de cultivo seleccionados para trabajar en los ajustes de pH fueron elegidos de acuerdo a su disponibilidad y eventual mayor influencia durante los diferentes análisis. A continuación se describen las diferentes actividades llevadas a cabo para atender los objetivos propuestos.

#### **3.1. Preparación de medios de cultivo**

##### **3.1.1 MRS (Agar de man, rogosa y sharpe) – Millipore**

Disolver 68,2 g en 1 litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviendo y agitar con frecuencia hasta la disolución completa. Autoclavar 15 minutos a 121°C, o trabajar con 118°C para conseguir un mejor crecimiento de *Bifidobacterium* spp.

pH:  $5,6 \pm 5,9$  a 25°C.

##### **3.1.2 YGC (Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol) – Millipore**

Disolver 40 g en 1 litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviendo y agitar con frecuencia hasta la disolución completa. Autoclavar (15 minutos a 121°C).

pH:  $6,6 \pm 0,2$  a 25°C.

##### **3.1.3 OSA (Agar de suero de naranja) – Millipore**

Disolver 42 g en 1 litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviendo y agitar con frecuencia hasta la dilución completa. Autoclavar (15 minutos a 121°C).

pH:  $5,5 \pm 0,1$  a 25°C.

#### **3.2. Ajuste de pH en el medio**

Después de hacer la preparación de cada medio de cultivo es necesario verificar el pH antes de ser esterilizado; se requiere dejar reposar un porcentaje pequeño del medio hasta solidificarse para posteriormente evaluar el pH con un pH-metro (Mettler Toledo) sobre el medio sólido. Si está por encima o por debajo del pH óptimo se agrega un ácido o una base para su ajuste, ya sea ácido tartárico o hidróxido de sodio, respectivamente.



### **3.2.1 Ajuste de pH del medio con ácido tartárico.**

“Para acidificar al 10% como lo indica la guía de pepsico, se debe pesar 10g de ácido tartárico y en un balón volumétrico de 100 ml aforar con agua destilada, disolver completamente y almacenar a temperatura ambiente” (Pepsico, 2018). Después de preparar debidamente el ácido tartárico y envasarlo, se agrega la cantidad correspondiente para ajustar el pH óptimo para el medio de cultivo en uso.

### **3.2.2 Ajuste de pH del medio con ácido fosfórico.**

El ácido fosfórico para el ajuste de pH se usa a una concentración de 0,9M. Su preparación (líquida) se lleva a cabo pesando 51,58g y se afora a un volumen de 500 mililitros. Para propósitos de ajuste se agrega hasta obtener un pH estable que este en el rango óptimo para el medio de cultivo.

## **3.3. Preparación de inóculo para siembra en medios de cultivo modificados**

Para preparar las diluciones en tubos de ensayo, se prepara agua peptonada al 0,1% llenando 7 tubos con 9 mililitros cada uno para posteriormente ser esterilizados; estas diluciones corresponden a 1 en 10, ya que para el tubo madre se toma 1 mililitro de medio quedando  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Al medir absorbancia en el espectrofotómetro se debe obtener valores entre 0,1 y 0,08 nm. La última dilución debe quedar en  $1,5 \times 10^2$  UFC/ml dado que es una cantidad adecuada para hacer el recuento respectivo.

## **3.4. Control de la calidad y ensayo del rendimiento de los medios de cultivo (ISO, 2014).**

### **3.4.1. Control de calidad física**

Los medios de cultivo se evaluarán físicamente de acuerdo con los resultados finales que deben ser obtenidos según su elaboración. Se debe verificar que el medio atienda a los requerimientos de solidificación, volumen, apariencia, contenido de agua y pH.

Teniendo en cuenta los parámetros a evaluar físicamente es necesario especificar cada uno de estos. Cuando se hace un análisis de solidificación se requiere tocar y mover el medio para tener

idea de que tan consistente esta; por ello, se tomaron 40 ml de muestra en un beaker, después de la esterilización, y así comprobar la homogeneidad. El volumen se evaluaa después de llevar las cajas Petri a una temperatura apta para el crecimiento de los microorganismos en cada medio de cultivo, verificando que después de ser sometido a ciertas condiciones de temperatura, su volumen se mantenga estable.

Seguidamente se evalúa la apariencia de los medios, para verificar si mantiene su color y la homogeneidad correspondiente; el contenido de agua que se verifica es para observar el cambio de fase, ya que no se validaría si esta una parte sólida y cierta parte líquida. Por último, se confirma que el pH después de todo el proceso no haya variado y siga en el valor correspondiente.

#### **3.4.2. Medio de cultivo de referencia**

El medio de referencia fue ajustado con ácido clorhídrico, evitando cualquier tipo de contaminación para tener una guía de a qué se debe llegar en la propagación y crecimiento. Este servirá como guía para los análisis, contando con los mismos aspectos que presente, tanto en apariencia física, como en el crecimiento que se deba soportar.

#### **3.4.3. Método cuantitativo para medios de cultivo sólidos**

Se toma la cepa aislada o el medio de cultivo con los microorganismos diana para hacer la siembra, la cual se lleva a cabo por siembra en superficie. Después se incuba en las condiciones requeridas para el crecimiento de los microorganismos dado que las bacterias requieren una temperatura de 35°C y los hongos de 25°C, para así comparar con el medio de referencia y hacer el recuento de colonias respectivo. Para la siembra se toman los microorganismos no diana y se hacen las respectivas diluciones que parten de  $1,5 \times 10^8$ , llegando a una dilución de  $10^2$  para tener un número de colonias contables.

#### **3.4.4. Cálculo e interpretación de los resultados**

Los ensayos cuantitativos, deben alcanzar 100 ufc. Se considera válido un resultado cuando el crecimiento es positivo. El rango de análisis normalizado está en 150 ufc por método de superficie; evaluar los resultados consta de valorar la productividad y la selectividad como se muestra a continuación:

- **Productividad:**

$$\text{Ecuación 1 } P_R = \frac{N_s}{N_o}$$

Donde:

$N_s$  = Número de colonias en la superficie o profundidad del medio en ensayo; es el recuento de colonias en las placas.

$N_o$  = Número de colonias obtenidas en superficie o profundidad del medio de cultivo de referencia, debe estar cerca 100 ufc.

El cálculo de  $P_R$  estará en un rango de  $\geq 0,50$  para definir una comparación entre un medio selectivo el medio de referencia.

- **Selectividad:** Se define de forma cualitativa debido que todos son medios de cultivo selectivos, pero se hace modificación de pH, varía en el cambio de ácido y de acuerdo con esto se estima si hay crecimiento del microorganismo en el medio definido, se toma como selectivo respecto a las modificaciones.
- **Taza de recuperación:** Para definir tanto la productividad de los medios de cultivo, se debe realizar un estimado de la tasa de recuperación en cada uno de la siguiente forma:

$$\text{Ecuación 2 } \frac{UFC}{ml} = \text{número de colonias} * \frac{\text{inverso de la dilución empleada}}{\text{cantidad de muestra inoculada}}$$

- **Porcentaje de recuperación:** Respecto al medio de referencia se debe hacer un estimado de la recuperación del mismo, según las diluciones después de sembrar en los medios modificación y para esto se realiza el siguiente calculo:

$$\text{Ecuación 3 } \%R = \frac{\text{TAZA DE RECUPERACIÓN} * 100}{1,5 \times 10^8}$$

En la validación de dicho ácido se emplean métodos cuantitativos. Los parámetros más importantes en este caso son productividad y selectividad, dado que estos definen la implementación de los posibles acidulantes en los laboratorios de Postobón. Cuantitativamente la productividad se calcula por el número de colonias que son formadas tanto en el medio modificado como en el de referencia, dando efectivo cuando  $P_R \geq 0,50$ . La selectividad se determina con la dilución en los medios modificados y de referencia en cuanto al crecimiento de los diferentes microorganismos, ya que en todos los medios se cultivan bacterias, hongos y levaduras verificando que después de que sea modificado siga siendo selectivo (ISO, 2014).

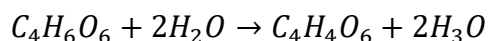
## 4 Resultados

El pH de los medios de cultivo, al ser un parámetro tan importante debe mantenerse siempre en un intervalo permitido; por lo anterior, fue necesario implementar la evaluación y potencial uso de ácidos fuertes para realizar ajustes. Para atender a los objetivos propuestos, se evaluaron dos ácidos de uso no controlado. El aspecto económico también hizo parte de los criterios de selección.

### 4.1. Uso de compuestos orgánicos para el control de pH

#### 4.1.1. Ácido tartárico

El uso de ácido tartárico para el ajuste de pH presentó resultados diversos. Entre ellos se debe resaltar la disminución relativa de pH, se presentó contaminación aparente durante la etapa de inoculación. En presencia del agua, el ácido tartárico da cuenta de la siguiente interacción:



El medio que tuvo inconveniente en el ajuste de pH fue el YGC (Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol). Al término de su preparación, éste siempre suele quedar en un pH básico que rebasa el límite. La adición controlada del compuesto orgánico permite llegar a un punto en el que, antes y después de esterilizar, el pH queda en el rango deseado, mediante la adición de un volumen de 0,3 ml, tomando en consideración su concentración y volumen de trabajo, como se muestra en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Ajuste de pH en Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol ( $6,6 \pm 0,2$ ).

DÍA	FECHA	pH PREPARACIÓN DESHIDRATADO	AJUSTE (ML)	pH	pH POS ESTERILIZACIÓN
1	03/11/2022	7,08	0,5	6,50	6,31
2	04/11/2022	7,06	0,25	6,81	6,46
3	10/11/2022	7,01	0,3	6,67	6,44
4	11/11/2022	7,03	0,3	6,71	6,53

Tabla 2. Ajuste de pH en Agar de man, rogosa y sharpe ( $5,6 \pm 5,9$ ).

DÍA	FECHA	pH PREPARACIÓN DESHIDRATADO	AJUSTE (ML)	pH	pH POS ESTERILIZACIÓN
1	03/11/2022	5,86	1	5,70	5,60

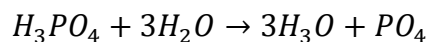
2	04/11/2022	5,87	0,5	5,80	5,63
3	10/11/2022	5,78	0,5	5,74	5,63
4	11/11/2022	5,79	0,5	5,74	5,63

Tabla 3. Ajuste de pH en Agar de suero de naranja ( $5,5 \pm 0,1$ ).

DÍA	FECHA	pH PREPARACIÓN DESHIDRATADO	AJUSTE (ML)	pH	pH POS ESTERILIZACIÓN
1	03/11/2022	5,58	0,6	5,43	5,41
2	04/11/2022	5,58	0,5	5,45	5,40
3	10/11/2022	5,56	0,5	5,42	5,39
4	11/11/2022	5,57	0,35	5,50	5,44

#### 4.1.2. Ácido fosfórico

El uso de ácido fosfórico para el control del pH de medios de cultivo también dio lugar a algunas situaciones adversas. A partir de los resultados se observó disminución relativa de pH, con mayor notoriedad después de la etapa de esterilización, generando una condición de alta acidez en el medio de trabajo. En presencia de agua, el ácido fosfórico se comporta de la siguiente manera:



Su baja de acidez y pH dependen de la dureza con la que cuente el agua; esta puede hacer que varíe en su regulación, ya sea porque deba aumentar o disminuir la cantidad de ácido usado. Tal como se muestra en las tablas 4, 5 y 6, la variación en el pH puede ser regulada lo que hace que cambie el volumen a agregar.

Tabla 4. Ajuste de pH en Agar extracto de levadura-glucosa-clorafenicol ( $6,6 \pm 0,2$ ).

DÍA	FECHA	pH PREPARACIÓN DESHIDRATADO	AJUSTE (ML)	pH	pH POS ESTERILIZACIÓN
1	20/12/2022	7	0,25	6,84	6,20
2	21/12/2022	6,97	0,3	6,68	6,16
3	22/12/2022	7,07	0,3	6,69	6,15
4	03/01/2023	7,04	0,15	6,84	6,62

Tabla 5. Ajuste de pH en Agar de man, rogosa y sharpe ( $5,6 \pm 5,9$ ).

DÍA	FECHA	pH PREPARACIÓN DESHIDRATADO	AJUSTE (ML)	pH	pH POS ESTERILIZACIÓN
1	20/12/2022	5,81	0,25	5,80	5,57
2	21/12/2022	5,86	0,5	5,82	5,60
3	22/12/2022	5,88	0,5	5,82	5,60
4	03/01/2023	5,91	0,15	5,87	5,77

Tabla 6. Ajuste de pH en Agar de suero de naranja ( $5,5 \pm 0,1$ ).

DÍA	FECHA	pH PREPARACIÓN DESHIDRATADO	AJUSTE (ML)	pH	pH POS ESTERILIZACIÓN
1	20/12/2022	5,61	0,25	5,59	5,50
2	21/12/2022	5,58	0,5	5,49	5,45
3	22/12/2022	5,59	0,5	5,47	5,42
4	03/01/2023	5,60	0,15	5,56	5,55

## 4.2. Diseño experimental

De acuerdo al diseño experimental planteado para el desarrollo de los diferentes análisis, se tuvo en cuenta la recuperación de los microorganismos en los correspondientes medios de cultivo en unidades de UFC/ml, para evaluar los resultados en comparación a la dilución madre de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Los resultados para el ácido tartárico se muestran en las tablas 7, 8 y 9.

Tabla 7. Recuperación de levadura en los medios de cultivo implementados.

Medios	Fecha	Recuperación (UFC/ml)
YGC	03/11/2022	$26 \times 10^6$
	04/11/2022	$15 \times 10^6$
	10/11/2022	$3 \times 10^6$
MRS	03/11/2022	$41 \times 10^6$
	04/11/2022	$67 \times 10^6$
	10/11/2022	$17 \times 10^6$
	11/11/2022	$7 \times 10^6$
OSA	03/11/2022	$49 \times 10^6$
	04/11/2022	$2 \times 10^6$
	11/11/2022	$17 \times 10^6$

Tabla 8. Recuperación de bacteria esporulada en los medios de cultivo implementados.

Medios	Fecha	Recuperación (UFC/ml)
OSA	03/11/2022	$1 \times 10^6$
	10/11/2022	$6 \times 10^6$
	11/11/2022	$8 \times 10^6$

Tabla 9. Recuperación de bacteria en los medios de cultivo implementados.

Medios	Fecha	Recuperación (UFC/ml)
OSA	03/11/2022	$3 \times 10^6$

El ácido fosfórico se evaluó sobre la misma dilución madre; los resultados en este caso fueron más positivos por la alta recuperación de microorganismos, contando que el ácido fosfórico tuvo un punto a favor y fue la nula contaminación de los medios. Los resultados obtenidos de la recuperación se presencian en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Recuperación de levadura en los medios de cultivo implementados.

Medios	Fecha	Recuperación (UFC/ml)
YGC	20/12/2022	35x10 <sup>6</sup>
	21/12/2022	112x10 <sup>6</sup>
	22/12/2022	150x10 <sup>6</sup>
	03/01/2023	23x10 <sup>6</sup>
MRS	21/12/2022	148x10 <sup>6</sup>
	22/12/2022	150x10 <sup>6</sup>
	03/01/2023	24x10 <sup>6</sup>
OSA	21/12/2022	38x10 <sup>6</sup>
	22/12/2022	150x10 <sup>6</sup>
	03/01/2023	20x10 <sup>6</sup>

Tabla 11. Recuperación de bacteria esporulada en los medios de cultivo implementados.

Medios	Fecha	Recuperación (UFC/ml)
OSA	22/12/2022	100 x10 <sup>6</sup>
	03/01/2023	150 x10 <sup>6</sup>

### 4.3. Validación.

Respecto a las evaluaciones experimentales que se hicieron sobre cada medio, tanto con el ácido tartárico, como con el ácido fosfórico, se tuvo en cuenta dos cosas principales para llevar a cabo este objetivo, la productividad y la selectividad. La selectividad en el ácido tartárico no fue del todo aceptable, debido que en algunos medios hubo crecimiento de una de las bacterias implementadas que no era propia de ninguno de los medios trabajados. De acuerdo a los medios planteados se tuvieron los resultados que se presentan en las Tablas 12,13 y 14.

Tabla 12. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de levadura con ácido tartárico como regulador de pH.

Medios	Fecha	Productividad	% Recuperación
YGC	03/11/2022	0,173	17,33%
	04/11/2022	0,1	10%



	10/11/2022	0,02	2%
MRS	03/11/2022	0,273	27,33%
	04/11/2022	0,447	44,67%
	10/11/2022	0,113	11,33%
	11/11/2022	0,047	4,67%
OSA	03/11/2022	0,327	32,67%
	04/11/2022	0,013	1,33%
	11/11/2022	0,113	11,33%

Tabla 13. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de bacteria esporulada con ácido tartárico como regulador de pH.

Medios	Fecha	Productividad	% Recuperación
OSA	03/11/2022	$6,67 \times 10^{-3}$	0,67%
	10/11/2022	0,04	4%
	11/11/2022	0,053	5,33%

Tabla 14. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de bacteria con ácido tartárico como regulador de pH.

Medios	Fecha	Productividad	% Recuperación
OSA	03/11/2022	0,02	2%

El ácido fosfórico a diferencia del tartárico, fue mucho más selectivo debido a que no se presentó crecimiento de la bacteria no específica para ninguno de los medios trabajados. De acuerdo a lo observado en las Tablas 15 y 16, la productividad se muestra mayor en el fosfórico, lo que sigue dejando en evidencia su superioridad.

Tabla 15. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de levadura con ácido fosfórico como regulador de pH.

Medios	Fecha	Productividad	% Recuperación
YGC	20/12/2022	0,233	23,33%
	21/12/2022	0,747	74,67%
	22/12/2022	1	100%
	03/01/2023	0,153	15,3%
MRS	21/12/2022	0,987	98,67%
	22/12/2022	1	100%
	03/01/2023	0,16	16%
OSA	21/12/2022	0,253	25,33%
	22/12/2022	1	100%
	03/01/2023	0,133	13,33%

Tabla 16. Resultados de la viabilidad de los medios para crecimiento de bacteria esporulada con ácido fosfórico como regulador de pH.

Medios	Fecha	Productividad	% Recuperación
OSA	22/12/2022	0,667	66,67%
	03/01/2023	1	100%

## 5 Análisis

De acuerdo con su disponibilidad se trabajó con ácido tartárico y ácido fosfórico como compuestos orgánicos útiles en el control del pH de medios de cultivo. Ambos ácidos son usados en la regulación del pH, no necesariamente en medios de cultivo. El ácido fosfórico es usado para disminuir el pH en agua, como también en algunos productos para la industria farmacéutica. El ácido tartárico es más usado como regulador de pH en la industria alimenticia.

En cuanto a los objetivos por cumplir, se hizo el planteamiento de una estrategia basada en la información adquirida por la norma ISO 11133, donde paso a paso se realizó para lograr cada uno de los objetivos. En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de cada medio, los cuales se ajustaron ya fuera el caso, si era con ácido tartárico o fosfórico; los resultados de la variación en los pH se presentan en las Tablas 1 a la tabla 6. Se infiere que el ácido fosfórico tiene mayor influencia en el ajuste de pH; el pka del ácido tartárico es 3.036 y es considerado un ácido débil. En presencia de agua, el tartárico solo dona dos protones ( $H^+$ ) en forma lenta, mientras que el fosfórico dona tres protones ( $H^+$ ), casi instantáneamente.

Según lo mencionado cuando el ácido fosfórico tiene contacto con el agua, y de acuerdo a la dureza que esta tenga, el ion fosfato reacciona con el calcio haciendo que se liberen los protones respectivos  $H^+$  generando así una disminución de pH y, en consecuencia, mayor acidez en el medio. Como se muestra en las Tablas 3, 4 y 6 de los resultados, la disminución del pH al usar ácido fosfórico, es mayor por lo que se debe controlar principalmente su concentración y volumen de adición. Por el contrario, con el ácido tartárico no se promueve un cambio drástico en el valor de pH, lo que demanda un mayor volumen de adición. Desde el punto de vista económico, al ser menor la adición de ácido fosfórico, no tendría que suplirse en grandes cantidades, por lo que su gasto es menor.

### 5.1. Análisis del crecimiento de levadura en los medios de cultivo.

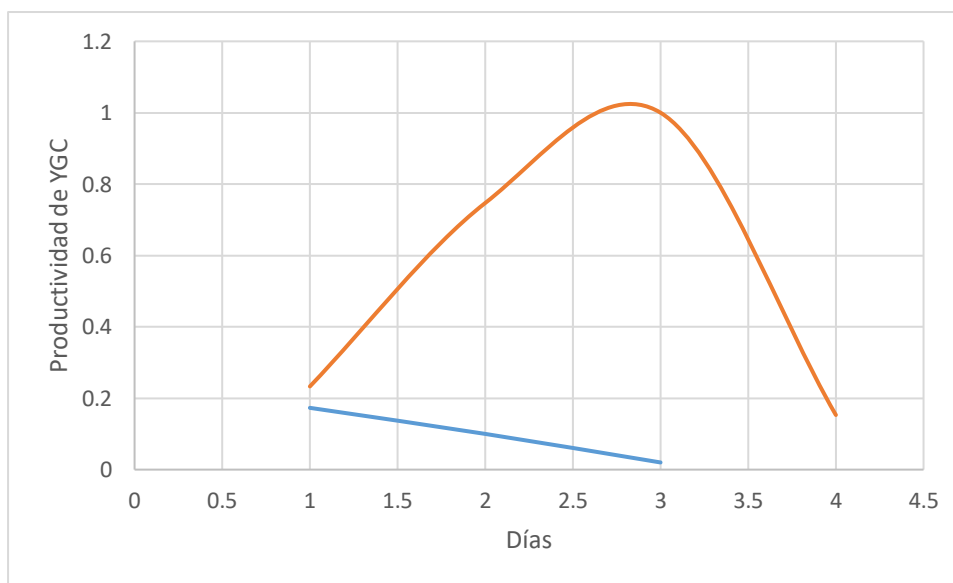
El medio de cultivo YGC es específicamente para el crecimiento de hongos y levaduras. Se decidió trabajar con levaduras y hacer caso omiso de los hongos por la alta contaminación que se estaba generando en las siembras, además de ser tan complicada la dilución para conseguir una siembra por profundidad.

Figura 1. Levadura específica para el crecimiento en todos los medios de cultivo.



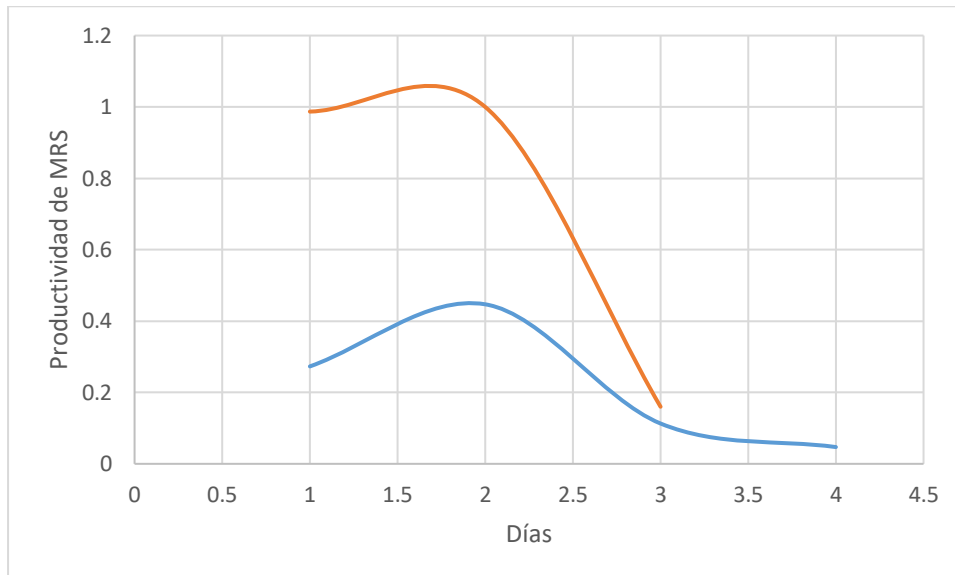
Las levaduras tienen la posibilidad de crecer en los tres tipos de medios trabajados, dado su composición y requerimientos de ajuste de pH. Si bien se reporta que los medios más selectivos para su crecimiento son el YGC y, el OSA, el crecimiento en el medio MRS mostró los mejores resultados, dado que este medio, no solo cuenta con los mismos nutrientes del medio YGC, sino también contiene otros nutrientes que también podían aportar a un mejor crecimiento.

Figura 2. Comparación de productividad en el medio de cultivo YGC



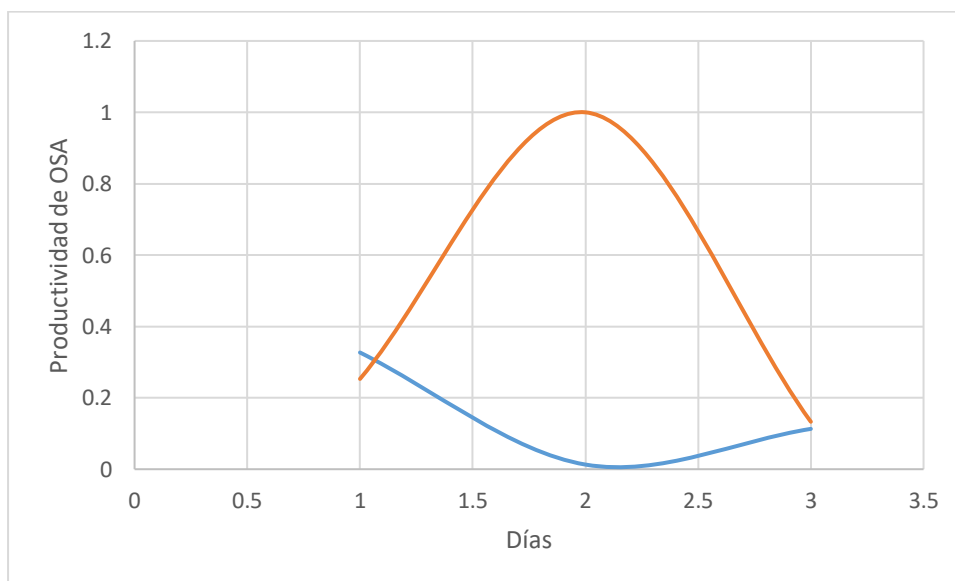
La Figura 2 muestra el cambio de la productividad en el tiempo que se presentó en el medio YGC. La línea roja representa la productividad con ácido fosfórico, y la azul con ácido tartárico.

Figura 3. Comparación de productividad en el medio de cultivo MRS.



En la Figura 3 se observa el cambio de la productividad en el tiempo, según el ácido. La línea roja pertenece al ácido fosfórico y la azul al tartárico. Esta comparación se presenta en el medio MRS donde es evidente que se produjo más al ajustar el pH con ácido fosfórico.

Figura 4. Comparación de productividad en el medio de cultivo OSA.



En el medio de cultivo OSA, como se muestra en la Figura 4, es más bajo el crecimiento de levaduras, pero de igual manera presenta mejores resultados en el ácido fosfórico (ver línea roja).

## 5.2. Análisis del crecimiento de bacteria esporulada en los medios de cultivo.

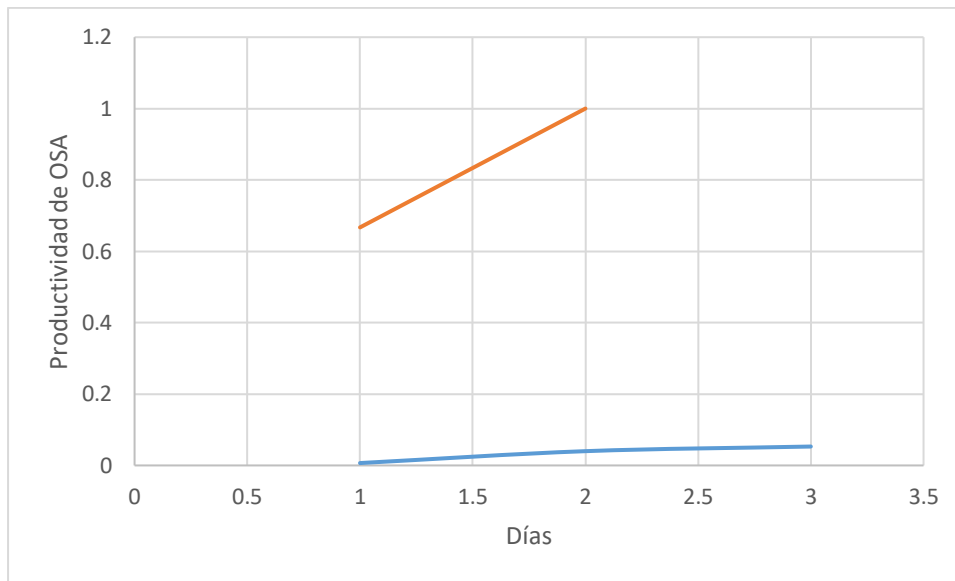
En la siembra de esta bacteria, se seleccionó una bacteria crecida de una contaminación, verificada por tinción de Gram e identificada como una bacteria esporulada, mediante microscopia. Después de realizar la réplica se hicieron las respectivas diluciones para las siembras llevadas a cabo por profundidad.

Figura 5. Bacteria específica para crecimiento en el medio de cultivo OSA.



Las bacterias esporuladas presentaron un bajo crecimiento; su proliferación estuvo restringida por la selectividad del medio de cultivo OSA, el cual tiene los nutrientes requeridos para el crecimiento de este tipo de organismos, como se especifica en su ficha técnica.

Figura 6. Comparación de productividad en el medio de cultivo OSA.

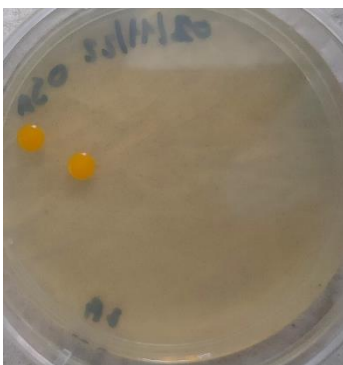


Respecto a lo que se observa en la figura 6, representa la productividad en el medio de cultivo OSA de la bacteria esporulada; se observó mayor productividad en los análisis con ácido fosfórico, haciendo que sea el más selectivo para los ajustes de pH.

### 5.3. Análisis de productividad de bacteria no específica.

Esta bacteria fue elegida después de una siembra de productos Postobón, donde se hizo la réplica y se identificó mediante la tinción de Gram. De acuerdo a su apariencia no es perteneciente al grupo de bacterias ácido-lácticas y tampoco a las bacterias esporuladas.

Figura 7. Bacteria no específica para el crecimiento de alguno de los medios de cultivo.



La Figura 7 muestra la proliferación de una bacteria no identificada; por esta razón se le realizó la prueba de tinción de Gram para confirmar que si fuese una bacteria. A partir de un análisis microscópico se determinó que no era perteneciente a las bacterias ácido-lácticas y tampoco era a una bacteria esporulada. Este tipo de bacterias no debía presentar crecimiento en ninguno de los medios de cultivo, pero, en presencia de ácido tartárico, creció en el medio de cultivo MRS. En este sentido, es posible inferir que la adición de ácido tartárico, como regulador de pH, produce cambios en los medios de cultivo alterando su selectividad. El crecimiento de este tipo de bacterias no es aceptable en este medio.

Uno de los parámetros más importantes evaluados para la validación de la metodología es la productividad, la cual constituye una medida del crecimiento de microorganismos en los diferentes medios. Es necesario aclarar que se presentaron dificultades por el aislamiento de los microorganismos, debido a la baja concentración celular obtenidas por las condiciones térmicas de trabajo, y por problemas de contaminación, principalmente durante las primeras siembras con ácido tartárico. Esta situación afectó el crecimiento celular, considerando las diferentes diluciones, y se presentó mayormente en los medios ajustados con ácido fosfórico, porque la siembra se hizo mucho tiempo después de tener las cepas aisladas, y para conservarlas se habrían refrigerado. Sin embargo, en comparación con los medios ajustados por ácido tartárico el crecimiento fue mejor en el fosfórico.



---

## 6 Conclusiones

En este trabajo se tuvieron ciertas dificultades relacionadas con el ambiente del laboratorio, falta de algunos reactivos, y tiempo, entre otros factores que dificultaron el desarrollo del trabajo experimental.

No obstante, se cumplió con los objetivos propuestos, no fue posible considerar más de dos reactivos dada la limitada disponibilidad en el laboratorio. De acuerdo con el primer objetivo, se identificaron los compuestos orgánicos más favorables y disponibles que permiten el ajuste de pH en los diversos medios de cultivo usados.

En relación con el segundo objetivo, se consideró que el ácido fosfórico es el mejor regulador dada su eficiencia en el control y su economía. Se resalta además la disponibilidad con la que cuentan las plantas de la compañía.

Finalmente se realizaron ensayos de ajuste con cada ácido, para propósitos de la validación; como se mencionó, el ácido fosfórico se seleccionó como el mejor regulador respecto a los ácidos evaluados, dado que no solo genera un ajuste inmediato, sino también que hace los medios más selectivos para el aislamiento y caracterización de los diferentes organismos

## Referencias

- Britania. (03 de 2021). *M.R.S Agar*. Recuperado el 06 de 12 de 2022, de <https://acortar.link/9qpJHJ>
- EAFIT, U. (2014). Organización Internacional de Estandarización. *Normas ISO y su cobertura*, 10.
- ISO, N. E. (2014). *Microbiología de los alimentos para el consumo humano, alimentación animal y agua*. MADRID - España: AENOR.
- Jersey, N. (abril de 2004). *Hoja informativa sobre sustancias peligrosas*. Obtenido de Ácido fosfórico: <https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1516sp.pdf>
- Lopardo, H. A. (2016). *Intriducción a la microbiología clínica*. Buenos Aires: Edulp.
- Microkit, L. (03 de 2020). *Chloramphenicol Glucose Agar (Y.G.C)*. Recuperado el 07 de 12 de 2022, de <https://acortar.link/BAggib>
- Pepsico, I. (2018). *MICROBIOLOGY GUIDEBOOK*.
- QUIMIPUR. (30 de 12 de 2019). *Ficha de datos de seguridad*. Obtenido de Ácido L(+)- tartárico: <http://quimipur.com/pdf/acido-tartarico-rev-1.pdf>
- Rojas, F. S., Ojeda, C. B., Bosch, M. E., & Ruiz, A. J. (2008). *Diseño experimental para la calibración y validación de ácido cítrico y ácido tartárico por espectrofotometría uv-visible normal y derivada*. Real sociedad Española de Química.
- Scharlau. (18 de 10 de 2022). *Orange Serum Agar*. Recuperado el 07 de 12 de 2022, de <https://acortar.link/ZpG39J>
- Solache, E., Rodríguez, G., Naranjo, A. E., Celaya, M., & Fernández, S. P. (2010). *Técnicas de purificación de aislamientos de Phytophthora contaminados por bacterias*. San Nicolás de Hidalgo: Biológicas.