

## 3.3: Métodos físicos

### Temperatura

Los microorganismos viven dentro de rangos amplios de temperatura, variable para cada especie microbiana, distinguiéndose dos límites (superior e inferior) denominados **temperatura máxima**, y **temperatura mínima**, respectivamente. La actividad máxima de los sistemas enzimáticos de los seres vivos se alcanza a una temperatura óptima que determina la velocidad de crecimiento. La velocidad de crecimiento desciende bruscamente después del límite superior de temperatura. El descenso rápido a temperatura elevada es debido a la desnaturalización térmica de las proteínas enzimáticas y de las estructuras celulares con constituyentes proteicos (membrana). Por ello, el calor es el agente letal más ampliamente utilizado en la esterilización. Su acción esterilizante depende de su naturaleza, intensidad y tiempo de aplicación; del grado de humedad y del pH del medio y de la susceptibilidad diferencial a la temperatura, de cada microorganismo en particular.

### Calor húmedo

El calor húmedo requiere menos tiempo como agente esterilizante con respecto al calor seco debido a que el agua es un buen conductor del calor, de esta manera el calor penetra mejor y se distribuye más uniformemente. Las proteínas enzimáticas y estructurales son estables en parte, por puentes hidrógeno y enlaces disulfuro. En presencia de humedad se establecen puentes H con las moléculas de agua. Se reorganizan las nuevas cadenas peptídicas con formación de complejos proteicos no funcionales. De esta manera, el calor húmedo mata los microorganismos por desnaturalización de las estructuras proteicas.

La esterilización confiable con calor húmedo requiere temperaturas superiores a la de la ebullición del agua. Estas temperaturas elevadas se alcanzan con más frecuencia mediante vapor **de agua saturado a presión** y su aplicación requiere de un aparato llamado **AUTOCLAVE** (Figura 3.3.1).

Dicho aparato, consiste de un recipiente metálico de doble pared, con una tapa que ajusta a presión por medio de tornillos, un manómetro que indica la presión a la que llega el vapor, una espita que regula la salida del vapor, una válvula de seguridad, una rejilla de bronce donde se coloca el material a esterilizar, un depósito de agua y una fuente de calor. La duración y temperatura del tratamiento usado, para lograr una esterilización adecuada es: 121° C (1 atmósfera) durante 15 minutos o 115° C (3/4 atmósfera) durante 20 minutos.

Para lograr una **correcta** esterilización en autoclave es necesario cumplir con los siguientes requisitos:

- Controlar el nivel de agua
- La espita debe permanecer abierta hasta lograr que salga un flujo constante de vapor, lo cual indica que todo el aire ha sido sustituido por vapor de agua. Si queda atrapado aire, la temperatura disminuirá, siendo inferior a la que se consigue con vapor saturado a la misma presión. La presión no es la que causa la muerte de los microorganismos, sino la temperatura del vapor a presión.
- El autoclave no debe cargarse excesivamente, ya que se forman bolsas de aire que disminuyen la temperatura de esterilización.
- El tiempo de esterilización depende de la naturaleza del material, del recipiente que lo contiene y del volumen a esterilizar.
- Los objetos voluminosos requieren un tiempo de tratamiento mayor para que el calor penetre hasta el centro del material.
- Deberá leerse, siempre que sea posible, la temperatura y la presión.

Las principales **fallas** en la esterilización por autoclave se deben a:

- mal funcionamiento del equipo.
- selección de un programa inadecuado (tiempo de exposición o temperatura).

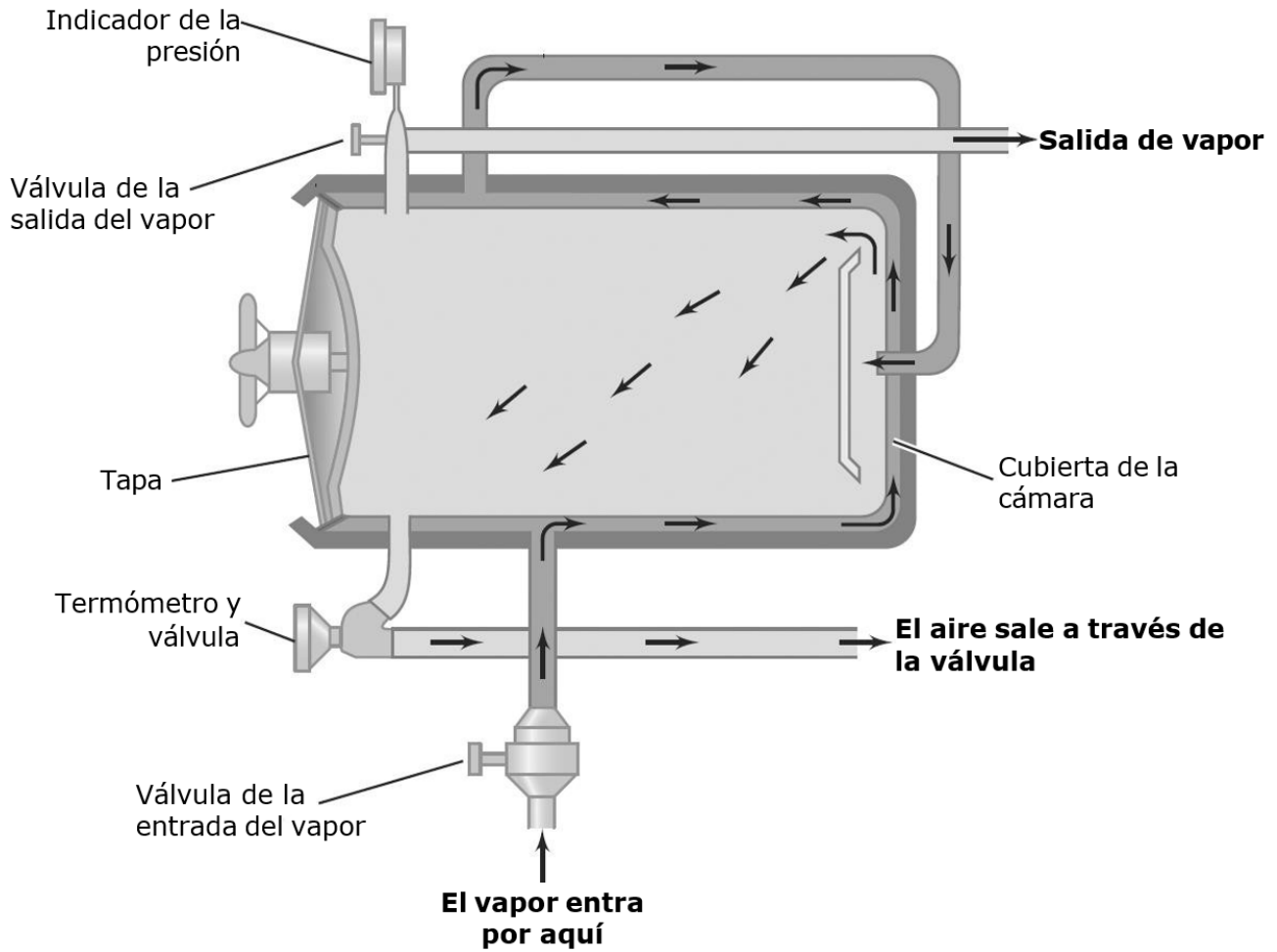


Figura 3.3.1: Esquema de un autoclave (Fuente: Ingraham J & Ingraham C. Introducción a la Microbiología. Ed Reverté SA, España, 1998)

Las principales **aplicaciones** del calor húmedo son:

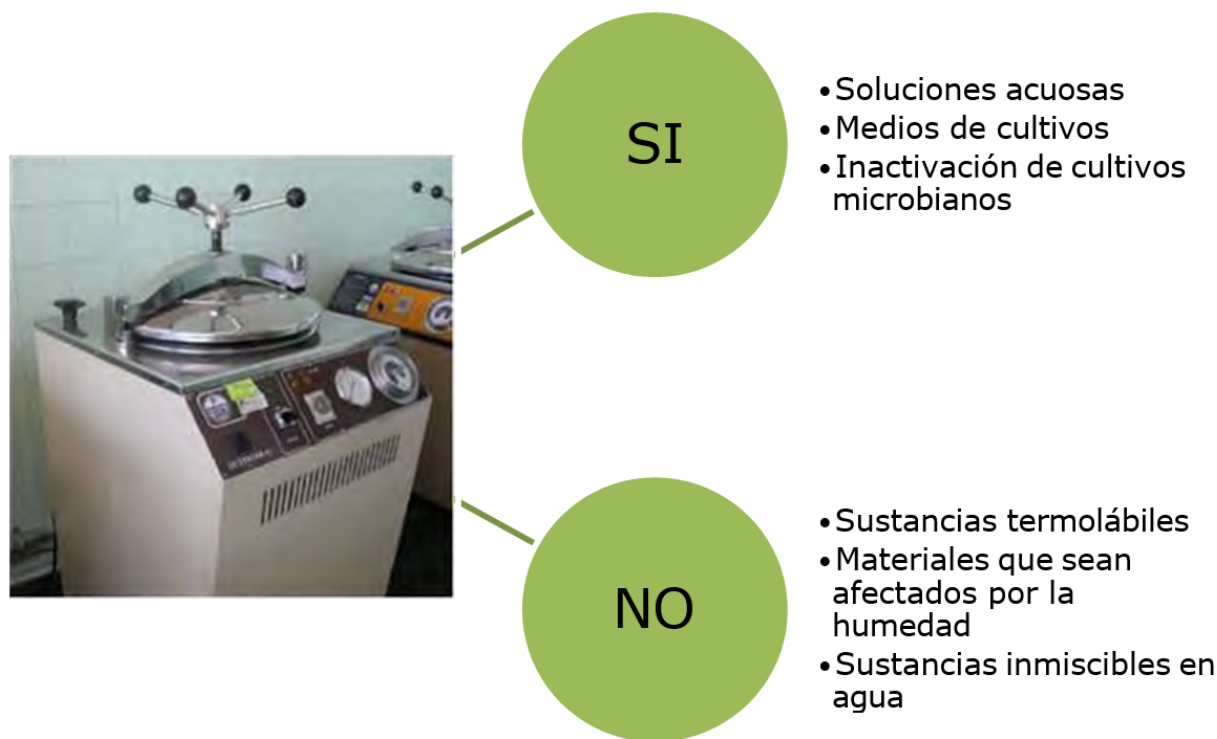


Figura 3.3.2: Las principales **aplicaciones** del calor húmedo son: (CC-BY; Este libero)

### Calor seco

El calor seco requiere mayor duración e intensidad, con respecto al calor húmedo, cuando es empleado como agente esterilizante, porque la conducción del calor es menor en el aire que en el vapor. Además, en ausencia de agua, la estructura nativa de una proteína está estabilizada por puentes hidrógeno y enlaces disulfuro. En este estado, la resistencia al calor de las células bacterianas y de las endosporas en estado de desecación es mayor. El calor seco destruye los microorganismos por oxidación de sus constituyentes intracelulares.

La tabla 3.3.1 muestra los distintos métodos de esterilización por calor seco y la utilidad de los mismos en las prácticas de laboratorio. Entre los métodos descritos y para poder aprovechar el poder esterilizante del aire caliente es necesario el empleo de ciertos aparatos conocidos con el nombre de **ESTUFAS**. Una estufa de esterilización consta de una cabina metálica de doble pared, con resistencia eléctrica; un termostato, un termómetro y estantes para colocar el material a esterilizar. El aire caliente circula por el espacio existente entre la doble pared transmitiendo el calor a los objetos que se encuentran en los estantes de la estufa.

Generalmente, el tiempo y la temperatura del tratamiento para lograr una correcta esterilización es: 180 – 160° C durante 1 h – 1 ½ h, respectivamente. Los tiempos y la temperatura pueden variar según las condiciones de trabajo, tales como cantidad y calidad del material.

**Tabla 3.3.1. Métodos de esterilización por calor seco**

Método	Comentario	Uso
<b>Incineración</b>	Se utiliza cuando se puede destruir o alterar la naturaleza de los materiales contaminados, sin que ello revista demasiada importancia. Se logra por combustión directa o mediante el uso de un horno crematorio.	Recipientes de cartón, apósitos, ropas, cadáveres de animales.

Método	Comentario	Uso
<b>Flameado o calor directo</b>	Los materiales se calientan a la llama de un mechero Bunsen. El procedimiento se realiza a temperaturas mayores de 200° C durante minutos o segundos. Causa deterioro del material tratado.	Boca de tubos, agujas, ansas, puntas de bisturí, varillas de vidrio, espátula de Drigalsky, tijeras, pinzas y demás instrumentos metálicos.
<b>Cono de esterilidad</b>	El mechero Bunsen genera un cono de esterilidad debido a una corriente ascendente de aire caliente que evita el descenso de las partículas en suspensión del aire.	La extracción de muestra o la siembra de un cultivo microbiano deben realizarse en el área que abarca el cono de esterilidad, para evitar la contaminación ambiental.
<b>Estufa u horno de aire caliente</b>	La acción letal resulta del calor transmitido por el material con el cual los organismos están en contacto y no desde el aire caliente que los rodea.	Este procedimiento debe utilizarse para esterilizar materiales termoestables, deshidratados y que deban estar secos en el momento de su uso.

Para lograr que el procedimiento sea adecuado se deben considerar los siguientes factores:

- El tiempo de precalentamiento de la estufa y de los materiales.
- El grado de conductividad del calor de los materiales. Se recomienda dejar espacios entre los materiales que permitan la circulación de aire caliente entre los mismos.

El fracaso de la esterilización puede atribuirse a:

- Control defectuoso de la temperatura.
- Pérdida de penetración del calor.
- Presencia de organismos con una resistencia superior frente a la temperatura aplicada.

Las principales **aplicaciones** del calor seco son:

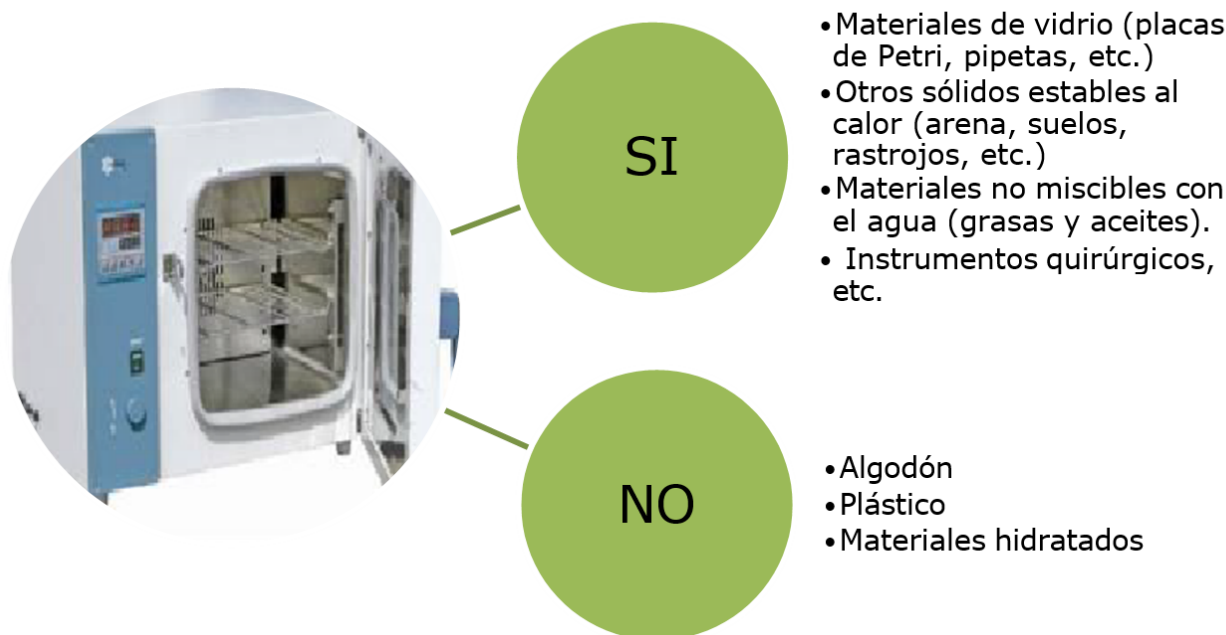


Figura 3.3.3: Las principales **aplicaciones** del calor seco. (CC-BY; Este libero)

## Radiaciones

Se puede definir **radiación** como la propagación de energía por el espacio. Los principales tipos de radiaciones que pueden tener efectos sobre los seres vivos son:

Radiación electromagnética	$\lambda$ (longitudes de onda, en nm)
Radiación infrarroja (IR)	800-106
Radiación visible	380-800
Ultravioleta (UV)	13,6-380
Rayos X	0,14-13,6
Rayos $\gamma$	0,001-0,14
Rayos cósmicos	< 0.001

A medida que disminuye la longitud de onda, aumenta la energía de la radiación y causa alteraciones (ruptura, ionización) de las macromoléculas celulares (ADN y proteínas).

Las radiaciones ionizantes tienen corta longitud de onda. Las fuentes de radiaciones ionizantes son los aparatos de rayos X, los rayos gamma ( $\gamma$ ) y los radioisótopos, como el Co60 o el Cs137.

Los efectos de las radiaciones ionizantes dependen de la **dosis de exposición**, o sea, de la cantidad de radiación a que se somete un material. En la práctica, la unidad que se emplea en biología es el megarad (Mrad), equivalente a un millón de rads, y que es el rango de la dosis requerida para esterilizaciones. También se emplea el Gray (1Gy equivale a 100 rads).

En general, los microorganismos son más resistentes a las radiaciones ionizantes que los seres superiores. Por ejemplo, la dosis de reducción decimal (D10) para las endosporas de ciertas especies de *Clostridium* es de 2000-3000 Gy. Las células vegetativas de la bacteria *Deinococcus radiodurans* es de 2.200 Gy. Otras especies más "normales" poseen una dosis de reducción decimal en torno a 200-600 Gy. Compare estos datos con el valor de sólo 10 Gy como dosis *letal* para humanos.

Los **efectos** de las radiaciones ionizantes son letales, tanto directos como indirectos, así como mutagénicos. Los efectos letales directos se logran a altas dosis de radiación, mientras que los letales indirectos y mutagénicos se consiguen a menores dosis.

**1. Efecto letal directo:** por impacto de cuantos de radiación ionizante sobre alguna molécula esencial para la vida. Los estudios cuantitativos demuestran que debe existir una molécula vital única que, al ser alterada, provoca la muerte. Esta molécula debe ser el ADN (ya que obviamente es absolutamente esencial y suministra una sola copia de la mayoría de los genes microbianos), y no las proteínas, de las que existen muchas copias en la célula, y que podrían regenerarse. Los daños al ADN son, principalmente: roturas en ambas cadenas, y entrecruzamiento entre dichas cadenas, que no puedan repararse.

**2. Efecto mutagénico:** deriva de la producción de daños menores al ADN que pueden repararse por mecanismos propensos a error.

**3. Efecto letal indirecto:** este tipo de efecto es el más importante, y deriva de la **radiólisis del agua** que provoca la aparición de radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y radical H libre ( $\text{H}\cdot$ ). El radical H libre es un potente reductor, y el radical hidroxilo es un potente oxidante. El radical hidroxilo reacciona fácilmente con macromoléculas, sobre todo con ADN, provocando roturas en ambas cadenas, lo cual se traduce en efectos de letalidad. Si, además, el microorganismo está expuesto al oxígeno mientras se lo está irradiando, el efecto es aún más intenso, debido a que el  $\text{O}_2$  reacciona con los radicales libres, originando cadenas de reacciones de **autooxidación**, muy destructivas y promoviendo la **formación de peróxidos y epóxidos**, asimismo letales:



La dosis de esterilización por radiación se suele establecer en 12 veces la dosis de reducción decimal (12 D10) requerida frente a las endosporas de *Clostridium botulinum*. Debido al gran poder penetrante de las radiaciones hay que mantener unas normas y controles de seguridad muy estrictos en su manipulación: planchas protectoras de plomo y revisiones periódicas de los manipuladores.

Las principales **aplicaciones** de las radiaciones ionizantes son la esterilización de:



Figura 3.3.4: Las principales **aplicaciones** de las radiaciones ionizantes . (CC-BY; Este libero)

Las radiaciones ionizantes no pueden ser utilizadas para esterilizar soluciones proteicas sujetas a desnaturalización ni para materiales que se oxidan o termolábiles. Las vendas y gasas de algodón pueden sufrir daño en sus fibras.

This page titled [3.3: Métodos físicos](#) is shared under a [not declared](#) license and was authored, remixed, and/or curated by [María M. Reynoso](#), [Carina E. Magnoli](#), [Germán G. Barros](#) y [Mirta S. Demo](#).