



ORIGINAL

Incidencia de microorganismos deteriorantes de la calidad de cerveza en microcervecerías de Buenos Aires

Juan I. Eizaguirre^{a,*}, Clara Bruzone^b, Ignacio Duhourq^a, Diego Libkind^b
y Pablo S. Aguilar^a

^a Laboratorio de Biología Celular de Membranas (LBCM), Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET), FCEN-UBA, CABA, Argentina

^b Laboratorio de Microbiología Aplicada, Biotecnología y Bioinformática de Levaduras, Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), Universidad Nacional del Comahue, CONICET, CRUB, San Carlos de Bariloche, Argentina

Recibido el 27 de abril de 2024; aceptado el 20 de septiembre de 2024

Disponible en Internet el 12 de noviembre de 2024

PALABRAS CLAVE

Cerveza;
Contaminantes
microbianos;
Control de calidad;
Cervecerías;
Buenos Aires

Resumen Las contaminaciones microbianas representan una preocupación significativa para la industria cervecera porque impactan negativamente en la calidad organoléptica del producto y generan pérdidas económicas sustanciales. El desarrollo de las cervecerías artesanales en Argentina ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años, lo que requirió mejoras continuas en los procesos para garantizar la excelencia en la producción cervecera. No obstante, la rigurosidad en los controles de calidad microbiológicos sigue siendo un área vulnerable. Este estudio evaluó la incidencia de contaminantes cervenceros en muestras de cerveza provenientes de 10 fábricas ubicadas en la Ciudad de Buenos Aires (CABA) y Gran Buenos Aires (GBA). Se detectaron microorganismos en el 70% de las muestras analizadas. Se logró el aislamiento de 15 bacterias y 19 levaduras; las primeras se identificaron como pertenecientes a los géneros *Acetobacter* y *Staphylococcus*, las levaduras como miembros de los géneros *Saccharomyces*, *Lodderomyces*, *Candida* y *Pichia*. La precisa identificación de estos microorganismos proporciona a los productores la información necesaria para desarrollar un plan de acción dirigido a mejorar los protocolos de limpieza y sanitización en sus instalaciones. Este enfoque proactivo no solo tiene el potencial de mitigar las pérdidas económicas asociadas con la contaminación microbiana, sino que también contribuye a mantener o elevar los estándares de calidad en la producción de cervezas artesanales en la región.

© 2024 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la CC BY-NC-ND licencia (<http://creativecommons.org/licencias/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ji.eizaguirre@tum.de (J.I. Eizaguirre).

KEYWORDS

Beer;
 Spoilage
 microorganisms;
 Quality control;
 Breweries;
 Buenos Aires

Incidence of beer spoilage microorganisms in Buenos Aires microbreweries

Abstract Microbial contaminations pose a significant concern within the brewing industry, exerting negative effects on the organoleptic quality of the product and leading to substantial economic losses. The exponential proliferation of craft breweries in Argentina in recent years has heightened the demand for constant improvements in processes to ensure excellence in beer production. However, the stringency of microbiological quality controls remains a vulnerable area. This study assesses the prevalence of beer contaminants in samples from 10 breweries located in Buenos Aires City (CABA) and Greater Buenos Aires area (GBA). The results revealed the presence of microorganisms in 70% of the analyzed samples. Fifteen bacteria and 19 yeasts were successfully isolated, with bacteria belonging to the genera *Acetobacter* and *Staphylococcus*, and yeasts to the genera *Saccharomyces*, *Lodderomyces*, *Candida*, and *Pichia*. Accurately identifying these microorganisms provides producers with the necessary information for formulating action plans to improve cleaning and sanitization protocols in their facilities. This proactive approach not only has the potential to mitigate economic losses associated with microbial contamination but also contributes to maintaining and elevating quality standards in regional craft beer production.

© 2024 The Author(s). Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La producción de cerveza artesanal en Argentina es parte de un sector productivo emergente y ha experimentado un continuo crecimiento durante los últimos 20 años^{24,46}. Este aumento sin precedentes obliga al sector a incorporar nuevas tecnologías que permitan generar productos de mayor calidad y estabilidad en el tiempo. Se ha demostrado que la contaminación microbiana es uno de los factores más importantes que afectan la calidad de la cerveza^{2,28}.

La Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y el Gran Buenos Aires (GBA) conforman la región más poblada de Argentina, y, por lo tanto, no son territorios ajenos al auge del sector cervecero. Este crecimiento genera un gran impacto en la economía regional, ya que, además de producir múltiples puestos de trabajo, ayuda a diversificar las matrices productivas e impacta positivamente en otros sectores económicos, como el gastronómico². Actualmente, la región cuenta con más de 230 cervecerías (que representan el 30% de las del país), más otro centenar de pequeños productores que están a la espera de dar el salto y lograr consolidar sus emprendimientos (Cámara de Cervecerías Artesanales de Argentina [CCAA]). Con la crisis económica existente, es importante minimizar las pérdidas de producción y, por lo tanto, es vital aplicar metodologías de control de calidad. Tan importante es que, en los últimos años, las microcervecerías comenzaron a contratar personal calificado para que realicen dichos controles en laboratorios internos.

La mayoría de las cervezas son fermentadas por un monocultivo, si bien existen algunos estilos donde se pueden usar combinaciones de cepas de levaduras, o, incluso, inoculaciones con bacterias para generar cultivos mixtos⁷. Debido a que durante la elaboración de la cerveza se realiza un hervor prolongado, cualquier microorganismo que no sea agregado por el cervecero se considera un contaminante¹⁹. Asimismo,

a diferencia de otras bebidas fermentadas, la cerveza es un ambiente hostil para el desarrollo de microorganismos. El porcentaje de etanol, la escasa cantidad de azúcares después de la fermentación, el bajo pH, el alto contenido de CO₂ y la presencia de lúpulo dificultan el crecimiento de muchos microorganismos^{19,40}. Sin embargo, existen algunos capaces de crecer en la cerveza^{7,38}, por lo que su correcta y pronta identificación en el proceso de elaboración es crucial, ya que permite anticiparse tanto a problemas organolépticos en el producto final como a cambios en los parámetros fisicoquímicos y rendimientos del proceso en general^{28,34}.

Por el interés que reviste el tema, en este trabajo se efectuó un primer relevamiento de la incidencia de contaminantes microbianos en la producción de cerveza artesanal en CABA y GBA. El objetivo fue realizar un estudio integral que incluyera el análisis microbiológico y fisicoquímico de las cervezas seleccionadas, aislar posibles contaminantes, identificar por técnicas de biología molecular y bioinformática los contaminantes aislados, evaluar la existencia de correlación entre las propiedades fisicoquímicas de la cerveza y la presencia de contaminantes, y, por último, contribuir con los microorganismos contaminantes identificados a la consolidación de un banco nacional de contaminantes cerveceros en el marco del Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC-CONICET).

Materiales y métodos**Toma de muestras**

Se estudiaron un total de 10 fábricas de cerveza en diferentes localidades de CABA y del área metropolitana de la Provincia de Buenos Aires aledaña a CABA (GBA). De cada cervecería, en envases estériles se colocaron muestras de 500 ml a partir de 3 barriles de 50 l de capacidad pertenecientes a un mismo lote de producción no pasteurizado.

Cada barril se consideró como una muestra independiente debido a posibles episodios de contaminación secundaria, de modo que se reunieron en total 30 muestras. Los muestreos se realizaron entre enero y octubre de 2019, las muestras se conservaron a 4 °C hasta su análisis, efectuado dentro de las 24 h posteriores.

La participación de cada fábrica en este estudio fue voluntaria; los productores participantes tuvieron que completar una encuesta con datos relevantes del establecimiento en lo referente a la elaboración del producto (manejos del control de calidad en el proceso productivo, limpieza del establecimiento) y la capacidad productiva, así como del lote específico del producto muestreado (fig. S1). Se analizaron parámetros relacionados con la fabricación de la cerveza en general, como tamaño de lote, producción anual, agentes de limpieza y sanitización utilizados, y se evaluó la detección de contaminantes microbianos, el control de las propiedades fisicoquímicas en la elaboración (temperatura, pH, medición de densidad inicial y final), las condiciones de almacenamiento de barriles y la información de la levadura utilizada (cepa y formato) (tabla S1). Se comparó el grado de amargor (*International Bitterness Units* [IBU]) declarado por el productor con el IBU medido analíticamente en este estudio aplicando la siguiente fórmula: $[\Delta\text{IBU} = (\text{IBU}_{\text{dec}} - \text{IBU}_{\text{med}}) / \text{IBU}_{\text{med}}]$

También se compararon las mediciones de densidad final (DF) aportadas por el productor con respecto a las medidas en laboratorio (ver «Análisis fisicoquímico»). Se procuró seleccionar lotes con menos de un mes de elaboración y barriles almacenados en cámaras frías por debajo de los 4 °C.

Análisis microbiológico

El análisis de la prevalencia de microorganismos contaminantes constó de un análisis de observación directa de la muestra con microscopio óptico y un análisis cualitativo y cuantitativo utilizando distintos medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Se realizaron preparados frescos de una alícuota de 5 μl en condiciones de esterilidad y se observaron en un microscopio óptico OLYMPUS CX-31 utilizando aumentos de 400x y 1000x con aceite de inmersión. Se registraron los tipos de morfología celular tanto de las levaduras como de las bacterias halladas. A partir de esa observación microscópica se juzgó la carga microbiana de cada muestra y, por tanto, la necesidad de diluir con agua desionizada estéril para proceder con el resto de los análisis.

El análisis cualitativo y cuantitativo utilizando distintos medios de cultivo incluyó la pesquisa de bacterias aeróbicas totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras contaminantes. La detección de bacterias totales se realizó en agar mosto con cicloheximida (AMC)²¹. Para la detección de BAL, se utilizó el medio de cultivo de Hsu semisólido para *Levilactobacilli*, *Lactobacilli* y *Pediococcus* (HLP Medium, Siebel Institute)¹¹. Para esta determinación, en tubos Falcon de 15 ml se colocó 14 ml del medio de cultivo y 1 ml de muestra, la incubación fue a 30 °C durante 48-72 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la presencia

o ausencia de colonias dentro del tubo. Cabe mencionar que la detección de BAL utilizando HLP no permite el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), por lo que el recuento de bacterias se realizó únicamente sobre el medio de cultivo agar mosto. El medio HLP tiene la particularidad que permite identificar, según el tipo de colonia generado en el tubo, si esta pertenece al género *Lactobacilli* (forma de gota invertida) o *Pediococcus* (forma de cometa). Para la detección de levaduras contaminantes, alícuotas de 100 μl de muestra se sembraron en superficie en placas con medio sulfato de cobre de Lin (LCSM) e incubaron durante 48 - 72 h a 25 °C, después se realizó el recuento de UFC/ml. Este es un medio selectivo para detectar levaduras salvajes, está diseñado para favorecer el crecimiento de levaduras no sacaromycéticas cerveceras por la presencia de sulfato cúprico²⁵.

Se consideró que la muestra de cerveza estaba contaminada cuando el recuento de UFC fue mayor o igual a 10 UFC/ml en al menos uno de los medios sólidos (AMC y LCSM), o cuando se registró crecimiento de colonias en el medio semisólido HLP. Este límite fue definido según lo sugerido por Hill¹⁴ para la detección de bacterias y se extrapoló para la detección de levaduras, según Latorre et al. (2022).

Análisis fisicoquímico

Se utilizaron los métodos de análisis propuestos por la *American Society of Brewing Chemists* (ASBC), en sus *Methods of Analysis* (MOA), para medir los parámetros fisicoquímicos de cada muestra. Estos fueron pH, azúcares residuales, color, turbidez y amargor. El pH de las muestras se midió según el MOA-Beer 9 (1, después de su descarbonatación). El valor de azúcares residuales (°Plato) se determinó por medio de un refractómetro (Alla France-ATC), y se utilizó para calcular el porcentaje de atenuación según el MOA-Beer 6. El color y la turbidez se determinaron según el MOA-Beer 10, las muestras se descarbonataron y filtraron (0,45 μm) y luego se registró la absorbancia a 430 nm para calcular los *Standard Reference Method* (SRM), y a 700 nm para evaluar la presencia o ausencia de turbidez. El amargor se estimó mediante espectrofotometría según el MOA-Beer 23¹; para ello, los iso-alfa ácidos se extrajeron utilizando iso-octano en medio ácido como solvente y luego se midió la absorbancia a 275 nm. Cada ppm de iso-alfa ácido es equivalente a 1 IBU.

Aislamiento y conservación de microorganismos contaminantes

Las bacterias y levaduras obtenidas a partir de los cultivos selectivos fueron conservadas a -80 °C utilizando glicerol (20% v/v) como crioprotector. Las muestras que contenían más de una morfología de bacterias o levaduras se aislaron como cepas independientes mediante la técnica de estriado en placa. Estos microorganismos contaminantes fueron ingresados al banco de contaminantes del CRELTEC, perteneciente al Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET-UNComahue.

Identificación molecular

Se estudiaron los aislamientos mediante técnicas moleculares de secuenciación de genes ribosomales (ARNr). Para extraer el ADN total de bacterias y levaduras se realizó el protocolo de lisis básica sobre colonia aislada. Se realizó un primer paso de lisis en NaOH 20 mM (20 µl para levaduras y 50 µl para bacterias), seguido de una agitación en vórtex. Posteriormente, se realizó una incubación en un baño a 95 °C por 10 min. Como paso final, se precipitaron las impurezas centrifugando 12.000 rpm por 30 segundos.

Se efectuó la amplificación de la región espaciadora interna transcrita (*internal transcribed spacer* [ITS]) del ARN ribosomal por PCR utilizando los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (*forward*) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (*reverse*) para identificar las levaduras⁴⁴. Las bacterias se identificaron amplificando por PCR el ARN de la subunidad ribosomal 16s con los cebadores 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')¹⁶. Los productos de PCR se revelaron en geles de agarosa al 0,8% y purificaron por precipitación con polietilenglicol (PEG 8000), con el posterior lavado con etanol al 70%. El producto final se resuspendió en H₂O milliQ.

Una vez purificados, los productos de PCR fueron enviados a la empresa MACROGEN Inc. (Corea) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron manualmente con el programa MEGA X¹⁸ y se compararon con las secuencias equivalentes disponibles en bases de datos públicas (GenBank) utilizando la herramienta computacional BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La identificación preliminar de los aislamientos obtenidos se realizó mediante el análisis de las secuencias de ADN obtenidas empleando el cebador *forward* para bacterias (27F) y levaduras (ITS1). Manualmente se extrajeron de las secuencias las regiones de buena calidad ($Q \geq 16$) con las cuales, finalmente, se llevaron a cabo los *blastn*. La asignación a nivel de especie se realizó únicamente en los casos en que hubo solo una especie con la identidad máxima y la similitud de aquella con especies de referencia fue $\geq 99\%$. En los casos donde la similitud fue inferior al 99% o el largo de las secuencias fue bajo (< 400 pb en levaduras, < 700 pb en bacterias), la identificación se hizo a nivel de género. Las secuencias obtenidas y curadas fueron depositadas en el GenBank bajo los códigos de acceso PP218124:PP218132 y PP229526:PP229532.

Caracterización de las levaduras aisladas mediante ensayos bioquímicos

Screening preliminar de levaduras en medios de cultivo especializados

De la totalidad de levaduras contaminantes aisladas y preservadas en el banco de contaminantes, se seleccionaron representantes de cada grupo morfológico mediante ensayos de crecimiento de colonias con el uso de medios de cultivo microbiológicos especializados. Para ello, las levaduras fueron cultivadas en medio YPD agar 48 h antes del experimento a 28 °C. Se suspendió una colonia en 100 µl de solución fisiológica al 0,9% (p/v) de NaCl. Para cada aislado se cultivaron gotas uniformes de 5 µl en dos medios

selectivos y un medio genérico, utilizado como control de carga. Estos ensayos fueron realizados por duplicado. Se utilizaron como medios selectivos agar almidón (AA) y medio LCSM²⁵. Como medio de control de carga de levadura, se utilizó el medio genérico agar mosto. Como controles, se cultivaron dos cepas comerciales: *Brettanomyces clausenii* (White Labs, WLP645), asociada a contaminaciones en la industria cervecera, y *Saccharomyces cerevisiae* (White Labs, WLP 008), especie cervecera utilizada para la producción de cerveza Ale. Se observó el crecimiento y el aspecto de las colonias en los días 1, 2 y 5 de cultivo. Se consideraron relevantes y se seleccionaron aquellas levaduras que presentaron en LCSM crecimiento acelerado en los primeros dos días y las que generaron mayor biomasa en AA.

Ensayo de asimilación de almidón

Con las cepas de levaduras contaminantes seleccionadas en el experimento detallado en la sección anterior se realizó un ensayo cuantitativo del potencial de crecimiento en medios selectivos para levaduras salvajes y de crecimiento en medio rico con almidón como única fuente de carbono. Además de las cepas control mencionadas en la sección anterior, se utilizó una cepa control adicional, *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (PIBA-109, BLQ Weihenstephan), como ejemplar de un contaminante superatenuante de azúcares residuales en cerveza¹⁷. Se utilizaron 5 diferentes diluciones de células para cada cepa seleccionada. Para ello, se suspendieron colonias aisladas en solución fisiológica y se realizaron recuentos mediante cámara de Neubauer a fin de ajustar luego la concentración de las suspensiones madre a 2×10^7 cel/ml, para tener en 5 µl un total de 1×10^5 células. De esta suspensión se realizaron 4 diluciones seriadas de 1:10 para obtener 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 y 1×10^1 células. Estos inóculos se sembraron en medio LCSM, AA y agar mosto para obtener el control de carga. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se realizó un seguimiento a las 24 y 48 h y se registró el crecimiento final de cada cepa.

Ensayo de fermentación a pequeña escala de mosto cervecero

El mismo grupo de aislamientos fue utilizado para evaluar el potencial fermentativo del mosto cervecero en pequeña escala. Para ello, se colocaron 20 ml de mosto estéril de densidad 10,4 °Brix en tubos de tipo Falcon estériles de 50 ml de capacidad. La tasa de inóculo se determinó por recuentos en cámara de Neubauer, ajustando el número de células a 1×10^6 cel/ml x °Brix x volumen de mosto (ml). Las fermentaciones se incubaron a 25 °C por 7 días, la densidad actual del mosto se midió cada 24 h, para luego calcular el porcentaje de atenuación de azúcares. Como control se utilizaron las cepas *B. clausenii* (White Labs, WLP645), *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (PIBA-109) y *S. cerevisiae* (White Labs, WLP008). Cada cepa se evaluó por duplicado.

Resultados

Análisis microbiológico

Por microscopía, el 70% de las muestras evidenciaron la presencia de microorganismos. En el 53% de las muestras se detectaron levaduras, con el aspecto morfológico típico del

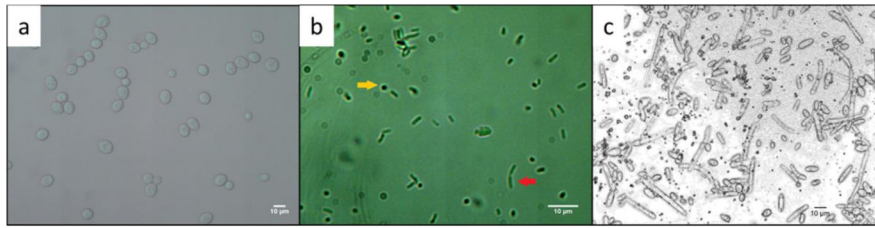


Figura 1 Observaciones microscópicas de muestras de cerveza contaminadas. a) 40x; se observan células con aspecto similar al de las levaduras de cervezas de tipo Ale (*Saccharomyces cerevisiae*). b) 100x; como morfologías bacterianas, se observan cocos (flecha amarilla) y bacilos (flecha roja). c) 40x; se observan células de levaduras diferentes a las levaduras cerveceras. El color de la figura solo puede apreciarse en la versión electrónica.

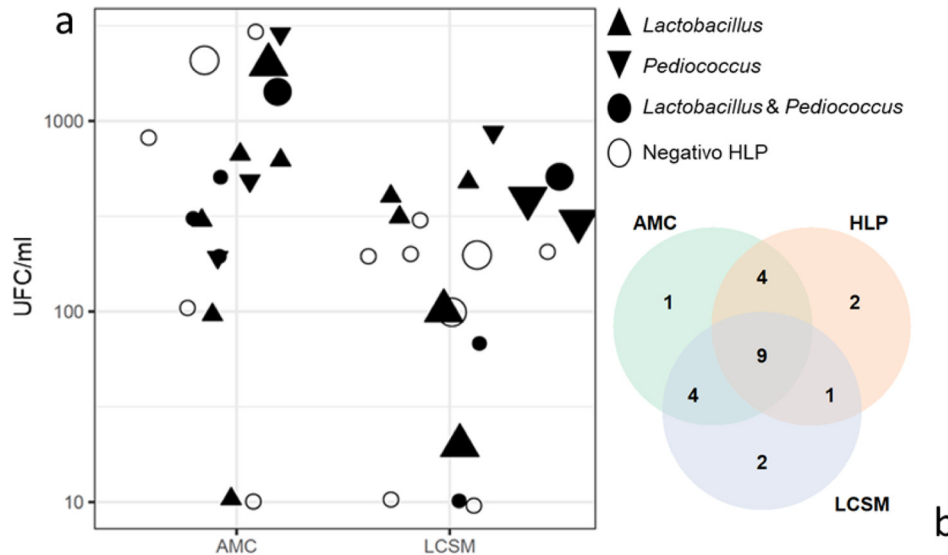


Figura 2 a) Resultado de recuentos en agar mosto con cicloheximida (AMC) y medio de sulfato de cobre de Lin (LCSM). Cada punto representa una muestra independiente, su tamaño está relacionado con el número de aislamientos obtenidos. No se graficaron las muestras con UFC/ml = 0. b) Diagrama de Venn donde se indica el número de muestras positivas para los medios de cultivos utilizados.

género *Saccharomyces* en el 75% de los casos (fig. 1a). En el 66% del total de muestras analizadas se pudieron detectar bacterias. En el 40% de estas muestras se observaron bacterias con morfología de cocos, en el 10% bacterias con morfología de bacilos y en el 50% restante se observaron ambas morfologías (fig. 1b). En el 25% de las levaduras restantes, la morfología fue variable: se observaron desde células pequeñas ovales hasta células alargadas con formación de pseudohifas (fig. 1c).

En cuanto al crecimiento de microorganismos en medios de cultivo específicos para la industria cervecera, los resultados fueron los siguientes: se obtuvieron 16/30 muestras positivas (53%) en medio HLP. Dentro de estos resultados positivos, en el 50% de los casos se observaron solo morfologías del tipo *Lactobacillus*, 19% solo morfología de tipo *Pediococcus*, y en el 31% de los casos positivos restantes se observaron ambos tipos de morfologías. En el medio AMC, donde esperamos únicamente el crecimiento de bacterias, de las 30 muestras totales, en el 60% de los casos se observó crecimiento (fig. 2). Integrando los resultados de este medio con los del HLP, se observó una alta correspondencia en la detección de bacterias entre ambos medios. De las 18 mues-

tras positivas en AMC, 13 (72%) también fueron positivas en HLP. En el medio LCSM, utilizado ampliamente en la industria cervecera para la detección de levaduras contaminantes, un 37% de las 30 muestras evaluadas arrojaron resultados negativos, es decir, no se observaron UFC/ml (fig. 2).

Análisis fisicoquímico

El pH medido estuvo en un intervalo de 3,71 a 4,61; con una media general de 4,18. Los azúcares reductores, en unidades de densidad específica (SG) y corregidos por el volumen de alcohol, oscilaron entre 1006 y 1015, con una media general de 1010. El color de las cervezas analizadas varió entre 3,8 y 12,7 SRM y en el 46,7% de las muestras analizadas se detectó turbidez.

Las medidas de amargor IBU variaron en el orden de 8,0 a 57,0. En conjunto con los valores de amargor proporcionados por las encuestas voluntarias, se pudo calcular el Δ IBU; los resultados se visualizan en la figura 3. Los puntos que se encuentran por encima del valor cero indican una sobreestimación del amargor calculado. Por el contrario, los que

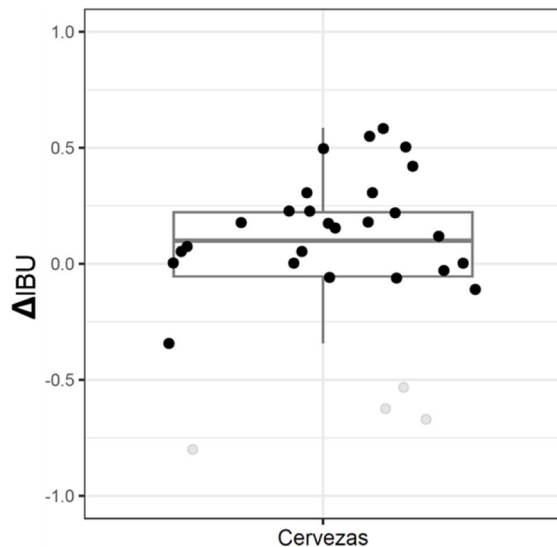


Figura 3 Diferencia entre los IBU esperados y los medidos. Los valores positivos revelan una sobreestimación de IBU, los valores negativos una subestimación. En gris se muestran los *outliers*. El color de la figura solo puede apreciarse en la versión electrónica.

se encuentran por debajo de cero corresponden a muestras en las que se subestimó el amargor de la cerveza. No se logró encontrar una correlación entre el Δ IBU y los estilos declarados por las cervecerías.

Aislamiento e identificación molecular de microorganismos

De las 30 muestras, se logró aislar un total de 15 cepas bacterianas; estos microorganismos se obtuvieron de una colonia representativa y fueron estriados y purificados en medio no selectivo agar mosto sin cicloheximida. De acuerdo a la microscopía óptica, se clasificaron como bacilos ($n=11$) o cocos ($n=4$). En cuanto a las levaduras, se lograron 19 aislamientos, que también se obtuvieron de una colonia singular y se purificaron en el medio no selectivo para el crecimiento de levaduras YPD. Según su morfología en la observación microscópica, las levaduras se clasificaron en tres grupos: grupo 1 - morfología circular ($n=11$), grupo 2 - morfología oval ($n=5$) y grupo 3 - morfología alargada ($n=3$).

Utilizando cebadores específicos para regiones del ARN ribosomal se logró amplificar las secuencias de las 34 cepas de contaminantes microbianos. Los productos de amplificación de los aislamientos de levaduras tuvieron 800 pares de bases (grupos 1 y 2) o 400 pares de bases (grupo 3); los de los aislamientos bacterianos tuvieron 1500 pares de bases. En la [tabla 1](#) se muestran los resultados del análisis en BLASTN de las secuencias obtenidas por amplificación de regiones ITS y codificantes de ARNr 16s de levaduras y bacterias, respectivamente. Frente a secuencias con porcentajes de cobertura e identidad superiores al 99% y un largo de secuencia de 400 pb (levaduras) o 700 pb (bacterias), se adjudicó al microorganismo aislado el género y la especie. Si las secuencias no cumplían con estos requisitos, solo se adjudicó el género.

Caracterización de levaduras mediante ensayos bioquímicos

Primero se realizó un *screening* con los 19 aislamientos de levaduras, en donde se observó el crecimiento diferencial en los medios de cultivo LCSM y AA. Pudimos notar una marcada diferencia en las levaduras del grupo 3, que presentaron un crecimiento excesivo en ambos medios de cultivo ([tabla S2](#)). A partir de esta información, se seleccionaron 7 aislamientos para realizar otros ensayos, 2 de cada grupo morfológico más un tercer aislamiento del Grupo 3).

En la [figura 4](#) podemos notar el crecimiento diferencial de los aislamientos seleccionados en los medios de cultivo mencionados, así como el de los controles PIBA-109 (levadura contaminante, *S. cerevisiae* var. *diastaticus*), WLP008 (levadura cervecera, *S. cerevisiae*) y WLP645 (levadura contaminante no sacaromycética, *B. clausenii*). La cepa control WLP008 mostró crecimiento solo en agar mosto. En cambio, las cepas PIBA-109 y WLP645 mostraron crecimiento en AA y LCSM.

Las cepas YI.006 e YI.101, del Grupo 1 mostraron crecimiento en las inoculaciones de 10^5 hasta 10^1 células en AA. El crecimiento fue leve y similar al crecimiento al control PIBA-109. En medio LCSM, se observó un crecimiento aún mayor, similar a lo observado en el control de carga, en el medio agar mosto. Dentro del Grupo 2, se observaron diferencias dentro del mismo grupo. En el medio AA, las cepas YI.015 e YI.016 mostraron un crecimiento similar al del control PIBA-109, como también se observó en el Grupo 1. Sin embargo, en el medio LCSM no hubo crecimiento de la cepa YI.015 a excepción de la inoculación con 10^5 células, en donde se observa un crecimiento leve en «spots». Este comportamiento coincide con el observado en el *screening* preliminar, en donde se marcó «sp» en LCSM ([tabla S2](#)). Consistentemente, YI.016 mostró crecimiento en este medio. Todas las cepas del Grupo 3 mostraron comportamientos similares. Las cepas YI.010, YI.021 e YI.102 mostraron un gran crecimiento en AA, mayor al observado en el control WLP645. En el medio LCSM, existió una leve diferencia para la inoculación con 10^1 células entre las cepas. Comparando con el control de carga, las cepas YI.010 e YI.021 mostraron un crecimiento menor, mientras que la cepa YI.102 mantuvo un alto crecimiento.

A fin de estudiar los parámetros cinéticos sobre el consumo de azúcares de las levaduras aisladas en este trabajo, se realizaron microfermentaciones en escala de 20 ml. Pasados los 7 días de fermentación, se calculó el perfil de atenuación de azúcares de todas las cepas de interés seleccionadas ([fig. 5](#)). Se obtuvieron resultados esperados para los controles utilizados en este ensayo. El control de WLP645 no mostró consumo de azúcares, ya que el género *Brettanomyces* tiene un proceso fermentativo más lento que lo esperado para *Saccharomyces*. Se observó una densidad final de 5 °Brix aproximadamente para el control WLP008 y una densidad final menor de 4 °Brix para la variante *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (PIBA-109).

Los resultados arrojan nuevamente comportamientos distintos para las cepas que integran los Grupos 1 y 2. Dentro del Grupo 2, y a partir del segundo día, el comportamiento de la cepa YI.101 se asemeja al comportamiento del con-

Tabla 1 Identificación de aislamientos microbianos provenientes de muestras de cerveza contaminadas a partir de secuencias de la región ITS (levaduras) y ARNr 16s (bacterias). Los porcentajes de cobertura y de identidad se obtuvieron usando la herramienta BLAST

Aislamiento	Grupo	Género/especie	% Cobertura	% Identidad	Secuencia (pb)
YI.001	1	<i>Saccharomyces</i> sp.	98	100	211
YI.002	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	99,4	691
YI.003	2	<i>Saccharomyces</i> sp.	100	97	419
YI.004	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	99,2	532
YI.006	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	99,4	650
YI.007	2	<i>Saccharomyces</i> sp.	100	96,9	302
YI.010	3	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100	99,8	455
YI.011	1	<i>Saccharomyces</i> sp.	98	96,4	176
YI.012	1	<i>Saccharomyces</i> sp.	100	98,4	236
YI.013	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	99,8	446
YI.014	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	97,4	401
YI.021	3	<i>Candida orthopsilosis</i>	100	99,8	461
YI.101	1	<i>Saccharomyces</i> sp.	100	86	111
YI.103	1	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	100	99,6	491
BI.001	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	99,9	739
BI.002	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	99,6	841
BI.003	Coco	<i>Staphylococcus</i> sp.	100	99,3	419
BI.004	Bacilo	<i>Acetobacter</i> sp.	96	98,3	188
BI.005	Bacilo	<i>Acetobacter fabarum</i>	100	99,2	732
BI.006	Coco	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	98	101
BI.007	Bacilo	<i>Acetobacter</i> sp.	99	99,8	455
BI.008	Bacilo	<i>Acetobacter</i> sp.	98	99,5	201
BI.009	Bacilo	<i>Acetobacter</i> sp.	100	99	97
BI.010	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	99,8	981
BI.011	Bacilo	<i>Acetobacter</i> sp.	98	97,6	221
BI.033	Bacilo	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	100	99,4	701

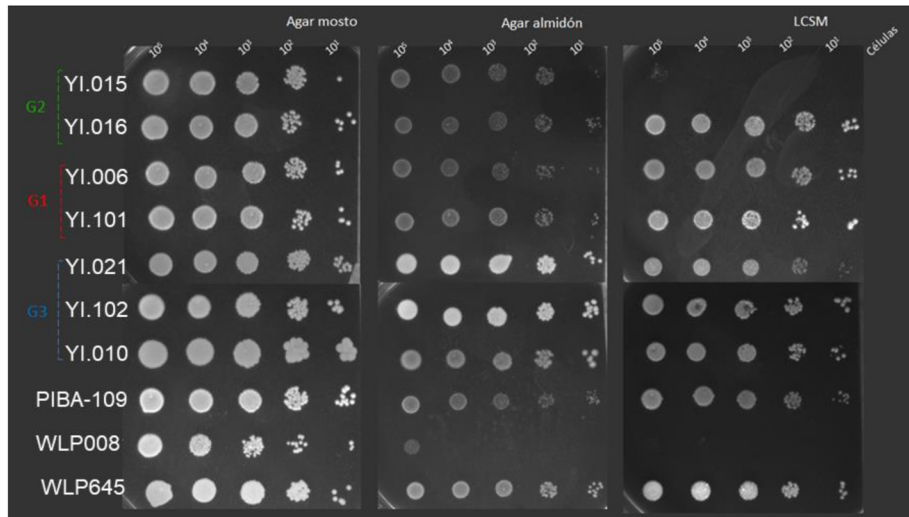


Figura 4 Crecimiento en gota en agar mosto, agar almidón y LCSM de las levaduras contaminantes seleccionadas luego de un primer *screening*. Las cepas PIBA-109, WLP008 y WLP645 fueron utilizadas como control.

rol de la variante *diastaticus*, mientras que la cepa YI.006 tiene un comportamiento fermentativo similar al del control WLP008, con una densidad final un poco más alta de 6 °Brix en promedio. Para las cepas del Grupo 1, también se logró observar una diferenciación similar a la del Grupo 2: la cepa

YI.015 tiene un comportamiento similar a la variante *diastaticus*, mientras que la cepa YI.016 se asemeja al control cervecero WLP008. Todas las cepas del grupo 3 presentaron un comportamiento similar, con poco o nulo consumo de azúcares luego de los 7 días.

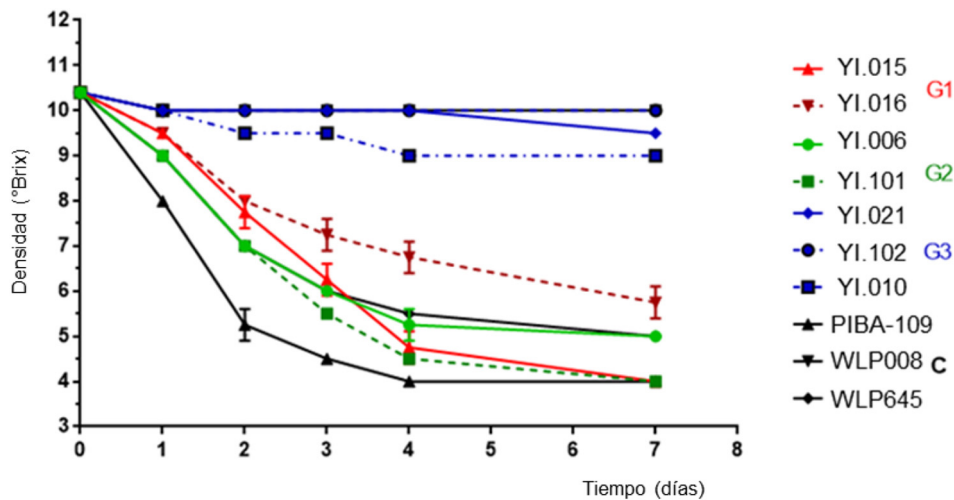


Figura 5 Cinética de fermentación de los aislamientos seleccionados en mosto de cerveza de 10,4 °Brix. Las cepas PIBA-109, WLP008 y WLP645 fueron utilizadas como control. Los grupos morfológicos G1, G2 y G3 se muestran en rojo, verde y azul, respectivamente. El color de la figura solo puede apreciarse en la versión electrónica.

Discusión

Este trabajo representa el primer estudio sobre la incidencia de microorganismos deteriorantes en la industria cervecera artesanal en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y GBA (Gran Buenos Aires), un sector productivo en pleno auge, que entre el 2013 y 2019 evidenció un 40% de crecimiento anual en promedio (comunicación personal, CCAA). Las muestras utilizadas en este estudio abarcan un amplio espectro de establecimientos cerveceros, con una capacidad productiva anual, que varió entre 50.000 hasta 850.000 litros (datos del año 2018). Todos los productores encuestados afirmaron realizar en el equipamiento de sus fábricas lavados con detergentes alcalinos y sanitización con ácido peracético. Estas prácticas ayudan a erradicar microorganismos de los equipos para la elaboración del mosto, fermentación, acondicionamiento y almacenamiento de la cerveza⁵. Hasta el momento, pocas fábricas utilizan vapor para la sanitización de sus bloques de cocción y barriles, aunque es una práctica que está tomando relevancia en el país con la adaptación de calderas al proceso productivo.

Es importante destacar que ninguno de los establecimientos que participaron del estudio cuentan con sistemas de pasteurización para sus cervezas. Esta práctica ha ganado popularidad en el sector artesanal debido a los cambios en los sistemas de venta y distribución que surgieron con la pandemia de COVID-19. Las cervecerías comenzaron a fraccionar sus productos en latas y/o botellas, permitiendo otra lógica de consumo sobre la cual no poseen un control total al salir de sus establecimientos. Por lo tanto, la pasteurización del producto terminado para eliminar microorganismos deteriorantes de la cerveza sumó adeptos en los últimos años⁴⁷. Sin embargo, tener bajos niveles de microorganismos contaminantes previo a la pasteurización es fundamental para disminuir las unidades de pasteurización que impactan organolépticamente sobre la cerveza^{3,27}.

Hasta el momento de realizar este estudio, solo se contaba con los datos obtenidos por Latorre y equipo, quienes analizaron los microorganismos contaminantes en cervezas

embotelladas de la región patagónica de Argentina²². Los mismos autores luego ampliaron sus estudios a Córdoba, Santa Fe y Costa Atlántica, tres de los polos cerveceros más importantes del país²¹. Este trabajo aporta información sobre la región productiva faltante, completando así los principales polos cerveceros de la Argentina. Los datos de incidencia de contaminantes obtenidos en este estudio para muestras de CABA y GBA (66,7%) se conciden con lo encontrado en la región patagónica, donde alrededor de dos tercios de las muestras revelaron presencia de microorganismos²². Sin embargo, el promedio de UFC/ml fue menor en CABA y GBA que en la región patagónica: bacterias, $8,9 \times 10^2$ vs. $7,3 \times 10^5$ UFC/ml; levaduras contaminantes, $2,5 \times 10^2$ vs. $2,7 \times 10^3$ UFC/ml. Esto puede deberse a las diferencias en el tipo de muestras analizadas, ya que en el estudio realizado en Patagonia las muestras se tomaron de botellas y en este trabajo directamente de barriles. Los sistemas de envasado de cerveza sean por enlatado o embotellado implican una manipulación adicional del producto, que aumenta la probabilidad de ingreso de microorganismos contaminantes, principalmente de aquellos que forman biofilms⁴¹.

El medio HLP para la detección de bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* es económico y requiere de muy bajo equipamiento para su aplicación en fábrica, por lo que es un gran aliado de las cervecerías artesanales¹⁰. Usando este medio, alrededor de la mitad de las muestras analizadas (53%) fueron positivas para estos microorganismos, lo que guarda relación con el dato del 45,3% del estudio realizado en cervezas embotelladas de Patagonia²². Estos datos difieren de los obtenidos en otras regiones en donde la industria de cerveza artesanal tiene mayor tiempo de desarrollo, como son los casos de Estados Unidos (15%), Australia (21%) e Italia (27%)^{30,43}.

La presencia de estas bacterias ácido lácticas en las cervecerías no es inusual, ya que poseen una larga historia asociada a la elaboración de cerveza^{32,37}. De hecho, es normal que se encuentren en ciertos estilos de cerveza, regionales o históricos, los cuales están ganando popularidad

en el mundo de las cervezas artesanales. Algunos ejemplos de cervezas donde podemos encontrar *Lactobacillus* son las Berliner Weisse o Gose alemanas, en American o Catharina sours, así como en cervezas de fermentación espontánea, aunque en estas últimas es más frecuente la presencia de *Pediococcus*⁷; sin embargo, no deberían estar presentes en el producto terminado de cervezas convencionales, como las analizadas en este estudio. *Pediococcus* suele encontrarse en ciertas plantas y frutas y forma parte del microbioma humano³⁷. Otra fuente posible de *Lactobacillus* es la malta de cebada, que normalmente posee una carga cercana a 10^4 UFC/g⁶, por lo que es importante separar los sectores de molienda del resto de los procesos de elaboración¹⁹. Cabe señalar que todas las fábricas muestreadas en este trabajo tenían implementada dicha compartimentalización, por lo que las contaminaciones con *Lactobacillus* observadas pueden deberse a otros factores o a una combinación de los mencionados, como una insuficiente limpieza y sanitización del equipamiento y de los espacios de fabricación.

Si bien no pudimos asociar ninguna variable fisicoquímica al número de contaminantes en las cervezas, ni siquiera en el caso del pH, como se describió previamente²², se encontraron diferencias en algunos parámetros entre las mediciones informadas por el productor y las determinaciones hechas en el laboratorio. En el caso de las unidades de amargor, encontramos una tendencia a sobreestimar dicho parámetro, lo que puede afectar el perfil organoléptico de las cervezas y la barrera de tolerancia para el crecimiento de ciertos microorganismos contaminantes. Un ejemplo son las bacterias del género *Lactobacillus*: estas lograron adaptarse a cervezas con alto IBU a través de la incorporación de los plásmidos de resistencia *horA* y *horC*⁴⁰. Asimismo en China, Yu et al.⁴⁸ aislaron a partir de botellas de cerveza artesanal una cepa de *Staphylococcus xylosus* con la capacidad de crecer en altas concentraciones de iso- α -ácidos ($> 200 \mu\text{M}$). En el mismo sentido, algunas cepas del género *Lactobacillus* han adaptado su metabolismo para crecer en condiciones de pH subóptimas para sus respectivas especies³⁹. Es importante destacar que estos errores en la medición o estimación de ciertos parámetros, que tienen influencia en la actividad microbiana, pueden hacer que el producto se vuelva más propenso a ser afectado por microorganismos deteriorantes. La tecnificación y profesionalización del sector cervecero artesanal es fundamental para lograr precisión al medir parámetros fisicoquímicos y evitar grandes pérdidas económicas por eventos de contaminación, así como para favorecer el crecimiento sostenible de la actividad. Diversos proyectos de asistencia técnica se vienen realizando desde el sector científico-académico con el fin de mejorar estos aspectos en las cervecerías artesanales argentinas⁸.

Los aislamientos logrados a partir del medio agar mosto con cicloheximida pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y *Acetobacter*. Si bien se cree que bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* no pueden crecer en la cerveza^{12,48}, en los últimos años y con el auge de distintas cervezas regionales, se han aislado especies del género adaptadas a este medio, como *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*^{12,26,48}. En este estudio, los aislamientos que se pudieron identificar a nivel de especie correspondieron a *S. epidermidis*, especie que, debido a su capacidad de formar biofilms en implantes médi-

cos, es considerada un patógeno oportunista³¹. Haakensen y Ziola¹³ encontraron el gen de resistencia *horA* en aislamientos ambientales de esta especie, el que le podría otorgar tolerancia a compuestos del lúpulo y, por ende, permitirle desarrollar en la cerveza.

El género *Acetobacter* se encuentra fuertemente relacionado con la elaboración de cerveza y es uno de los principales contaminantes³⁴. Estas bacterias gram negativas poseen una considerable capacidad de tolerar alcohol ($> 16\%$ v/v), aunque su condición aerobia hace que su aparición en la cerveza sea en focos puntuales, como puede ser la formación de biofilms en sistemas de servicio de cerveza en bares^{5,15}. *Acetobacter fabarum* ha sido reportada en muestras provenientes de sistemas de servicio de cerveza en Inglaterra¹⁵, en una muestra proveniente de fermentación en *coolship* en Estados Unidos y en mosto de cervezas lámbicas en Bélgica^{35,45}. Asimismo, en Argentina ha sido aislada de botellas de cerveza provenientes de la región patagónica²². En cuanto a *Acetobacter indonesiensis*, esta es una especie que no es considerada un contaminante tan común de cervezas, sin embargo, hay algunos registros en Bélgica, donde se la aisló de cervezas embotelladas de bajo contenido alcohólico ($1,5\%$ v/v)⁴⁵. *Acetobacter* ha perdido relevancia en los eventos de contaminación como consecuencia de una menor incorporación de oxígeno durante el proceso de envasado³⁴. Estos hallazgos y los reportados en estudios anteriores^{21,22} son de interés, ya que la aparición de este género en barriles y botellas de cervecerías argentinas es un indicador de que, probablemente, los procesos de envasado no sean lo suficientemente rigurosos con respecto a la incorporación de oxígeno²¹. Esta condición no solo puede predisponer a la aparición de estos contaminantes, sino que tiene un efecto deteriorante sobre las características organolépticas del producto; es por ello que el control de calidad enfocado en disminuir la incorporación de oxígeno es fundamental para mejorar la calidad del producto terminado.

En este estudio fue posible aislar levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Lodderomyces*, *Candida* y *Pichia* empleando el medio LCSM. La alta frecuencia de aislamiento de levaduras sacaromycéticas (84% del total de aislamientos) coincide con lo reportado en la literatura, ya que el mayor contaminante para la industria es *S. cerevisiae* var. *diastaticus*^{17,23,29}. Estas levaduras no solo poseen la capacidad de un rápido consumo de los azúcares del mosto, sino que su particularidad de consumir dextrinas las posiciona como el contaminante de mayor riesgo para la industria^{17,23}. El consumo de dextrinas está asociado al número de copias del gen *STA1*, cuya actividad está regulada por una delección específica en su región promotora¹⁷. La diversidad genética observada entre cepas de la variedad *diastaticus* repercute fenotípicamente en la velocidad de consumo de dichas dextrinas¹⁷. Dentro de los aislamientos obtenidos en este trabajo, YI.015 y YI.101 mostraron un fenotipo similar a la cepa de referencia PIBA-109 (fig. 5) y lograron atenuar un 98% de los azúcares del mosto cervecero. La detección temprana de estas variantes diastáticas es sumamente importante, ya que de exponer la cerveza a condiciones en las que aquellas puedan proliferar (como alta concentración de oxígeno disuelto o alta temperatura), el consumo de azúcares residuales no solo afectará la percepción organoléptica del producto, sino que podría generar

una sobreproducción de CO₂, con el consecuente riesgo de explosión de latas o botellas^{4,29}.

No se encontraron registros de la presencia de *Lodderomyces elongisporus* en muestras provenientes de cerveza o del ambiente cervecero. Sin embargo, esta especie ha sido encontrada en otras bebidas fermentadas, como la chicha⁹ y el vino³³. Las células de *L. elongisporus* se asemejan a las de *S. cerevisiae*; es por esto que se las asignó al G1 en la agrupación morfológica. No obstante, la forma elipsoidal de sus ascosporas la diferencian de las levaduras sacaromícéticas²⁰. Si hay registros de *Candida orthopsilosis* en agua de lavado en cervecerías de producción de cerveza Lager en Tailandia, así como en fermentaciones de vino de arroz en China⁴². El género *Pichia* se ha asociado a fermentaciones espontáneas de cerveza en numerosas oportunidades^{5,36}; *Pichia kudriavzevii*, en particular, es frecuente en la producción de cervezas lámbicas en Bélgica³⁶. Las especies no sacaromícéticas aisladas en este trabajo no fueron capaces de consumir la maltosa del mosto cervecero, en coincidencia con lo registrado en informes anteriores²⁰. Dado que este es el principal azúcar que compone el mosto de cerveza, cualquier levadura que pudiese consumirlo sería un directo competidor de las levaduras cerveceras (del género *Saccharomyces*). Sin embargo, estos microorganismos podrían afectar al mosto en sus primeras h de fermentación cuando en aquel hay glucosa o sacarosa, produciendo ciertos *off-flavors* que podrían permanecer en la cerveza terminada, pero el hecho de carecer de la capacidad de consumir maltosa los convierte en contaminantes de bajo riesgo.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten completar la relevancia de la incidencia de microorganismos deteriorantes en los principales polos cerveceros de la Argentina. Dos de cada tres cervecerías artesanales de CABA y Gran Buenos Aires mostraron presencia de microorganismos indeseados para la industria, lo que evidencia que aún hay deficiencias en la implementación de procesos efectivos de control de calidad. Mayormente, se aislaron microorganismos con antecedentes como contaminantes cerveceros, con la excepción de la levadura *L. elongisporus*. La correcta identificación de bacterias y levaduras contaminantes para la industria es de vital importancia a la hora de generar herramientas de detección temprana para evitar que estos microorganismos puedan dañar organolépticamente las cervezas artesanales. Los microorganismos obtenidos se incorporaron al banco de contaminantes del Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), actualmente la más grande de Sudamérica. Los resultados de esta investigación permiten establecer las bases para un mejor entendimiento de la incidencia microbiana en las cervezas artesanales del país y en el sector cervecero artesanal en general, contribuyendo a la mejora de los procesos y controles y, como fin último, a la calidad de los productos elaborados. Además, provee información e insumos (aislamientos) valiosos para la optimización de los procesos de pasteurizado, una práctica cada vez más difundida entre los productores cerveceros artesanales.

Financiación

Este estudio fue financiado con fondos provenientes del PICT-2017-0854 (P.S.A) y financiado parcialmente por subsidios de la UNComahue (04/B247), ANPCyT (PICT-2020-226) y CONICET (PIP-11220200102948CO).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos a los productores de cerveza artesanal de CABA y Gran Buenos Aires, quienes nos abrieron las puertas de sus emprendimientos y nos ayudaron a realizar este estudio. A la Dra. Mailén Latorre por su revisión y consejos sobre el manuscrito.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ram.2024.09.006](https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.09.006).

Bibliografía

1. American Society of Brewing Chemists. *Methods Of Analysis*. 14th ed. St. Paul MN (EE. UU.): American Society of Brewing Chemists; 2011 [en línea].
2. Back W. *Colour atlas and handbook of beverage biology*. Fachverlag Hans Carl.; 2005.
3. Back W, Forster C, Krottenthaler M, Lehmann J, Sacher B, Thum B. New research findings on improving taste stability. *Brauwelt Int*. 1999;394–405.
4. Begrow W. Fighting quality threats: notable microbiological contaminations of craft beer in the United States. *BBII*. 2017;5:10–3.
5. Bokulich NA, Bamforth CW. *Brewing Microbiology*. Caister Academic Press; 2017.
6. Booyesen C, Dicks LMT, Meijering I, Ackermann A. Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *Int J Food Microbiol*. 2002;76(1–2):63–73.
7. Brewers Association. *Brewers Association Beer Style Guidelines 2023 Edition*. [en línea]. [consultado 2 Feb 2024]. Disponible en: www.brewersassociation.org/resources/brewers-association-beer-style-guidelines/.
8. Britto FA, Carro AC, Lugones G, Lugones MJ, Monasterios CS, Quiroga JM. Vinculación y transferencia de conocimiento. El caso de la levadura andina. *Real Econ*. 2023;52:39–63.
9. Chang CF, Lin YC, Chen SF, Barriga EJC, Barahona PP, James SA, Bond CJ, Roberts IN, Lee CF. *Candida theae* sp. nov., a new anamorphic beverage-associated member of the *Lodderomyces* clade. *Int J Food Microbiol*. 2012;153(1–2):10–4.
10. Dos Santos ST, da Paz MF, Altemio ADC. Evaluation of two Brazilian native yeast strains (*Pichia kudriavzevii*) in craft beer. *Res Soc Dev*. 2022;11, e17311124783.
11. Fischborn T. HLP medium for the detection of lactic acid bacteria (international method). *J Am Soc Brew Chem*. 2009;67:247–8.

12. Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Taccari M, Aquilanti L, Clementi F. The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *J Food Sci.* 2015;80:M2845–52.
13. Haakensen M, Ziola B. Identification of novel horA-harboring bacteria capable of spoiling beer. *Can J Microbiol.* 2008;54:321–5.
14. En: Hill A, editor. *Brewing microbiology: Managing microbes, ensuring quality and valorising waste.* Woodhead Publishing; 2015.
15. Jevons AL, Quain DE. Identification of spoilage microflora in draught beer using culture-dependent methods. *J Appl Microbiol.* 2022;133:3728–40.
16. Kolbert CP, Persing DH, Ribosomal DNA. Sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:299–305.
17. Krogerus K, Magalhães F, Kuivanen J, Gibson B. A deletion in the STA1 promoter determines maltotriose and starch utilization in STA1+*Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103:7597–615.
18. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547.
19. Kunze W. *Technology Brewing & Malting.* Vlb, Berlin; 2004. p. 18–52.
20. En: Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T, editors. *The yeasts: a taxonomic study.* Elsevier; 2011.
21. Latorre MA. Contaminantes microbianos en cerveza artesanal: incidencia, factores de susceptibilidad y desarrollo de estrategias de control para el sector productivo. 2023. Disponible en: <https://rdi.uncoma.edu.ar/handle/uncoma/17194>
22. Latorre M, Bruzone C, Garcia VD, Libkind D. Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia Andina Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2022;55:11–20.
23. Latorre M, Hutzler M, Michel M, Zarnkow M, Jacob F, Libkind D. Genotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* spoilers in a community of craft microbreweries. *Monatsschrift Brauwiss.* 2020;73:51–7.
24. Libkind D, Bruzone C, Stanciu I. Estudio de mercado de la cerveza artesanal en Argentina. Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales. 2018.
25. Lin Y. Formulation and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection. *J Inst Brew.* 1981;87:151–4.
26. Lues JFR, Ikalafeng BK, Maharasoja M, Shale K, Malebo NJ, Pool E. *Staphylococci* and other selected microbiota associated with indigenous traditional beer. *Afr J Microbiol Res.* 2011;5:1691–6.
27. Lund MN, Hoff S, Berner TS, Lametsch R, Andersen ML. Effect of pasteurization on the protein composition and oxidative stability of beer during storage. *J Agric Food Chem.* 2012;60:12362–70.
28. Manzano M, Iacumin L, Vendrames M, Cecchini F, Comi G, Buiatti S. Craft beer microflora identification before and after a cleaning process. *J Inst Brew.* 2011;117:343–51.
29. Meier-Dörnberg T, Kory OI, Jacob F, Michel M, Hutzler M. *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe? Spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Res.* 2018;18, foy023.
30. Menz G, Andrighetto C, Lombardi A, Corich V, Aldred P, Vrieskoop F. Isolation, identification, and characterization of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *J Inst Brew.* 2010;116:14–22.
31. O’Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 2001;50:582–7.
32. Priest FG. The classification and nomenclature of brewing bacteria: a review. *J Inst Brew.* 1981;87:279–81.
33. Ruiz J, Ortega N, Martín-Santamaría M, Acedo A, Marquina D, Pascual O, Rozès N, Zamora F, Santos A, Belda I. Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations. *Int J Food Microbiol.* 2019;305:108255.
34. Sakamoto K, Konings WN. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int J Food Microbiol.* 2003;89:105–24.
35. Spitaels F, Li L, Wieme A, Balzarini T, Cleenwerck I, Van Landschoot A, De Vuyst L, Vandamme P. *Acetobacter lambici* sp. nov., isolated from fermenting lambic beer. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64:1083–9.
36. Spitaels F, Wieme AD, Janssens M, Aerts M, van Landschoot A, de Vuyst L, Vandamme P. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiol.* 2015;49:23–32.
37. Suzuki K. Gram-positive spoilage bacteria in brewing. *Brewing Microbiology.* 2015:141–73.
38. Suzuki K. Emergence of new spoilage microorganisms in the brewing industry and development of microbiological quality control methods to cope with this phenomenon: a review. *J Am Soc Brew Chem.* 2020;78:245–59.
39. Suzuki K, Asano S, Iijima K, Kitamoto K. Sake and beer spoilage lactic acid bacteria - a review. *J Inst Brew.* 2008;114:209–23.
40. Vrieskoop F, Krahl M, Hucker B, Menz G. 125th Anniversary review: bacteria in brewing: the good, the bad and the ugly: bacteria in brewing. *J Inst Brew.* 2012;118:335–45.
41. Wagner EM, Thalgueter S, Wagner M, Rychli K. Presence of microbial contamination and biofilms at a beer can filling production line. *J Food Prot.* 2021;84:896–902.
42. Wang J, Wang Z, He F, Pan Z, Du Y, Chen Z, He Y, Sun Y, Li M. Effect of microbial communities on flavor profile of Hakka rice wine throughout production. *Food Chem X.* 2024;21:101121.
43. White C. Analysis of the first large-scale testing of craft beer. *Tech Q MBAA Comm.* 2008.
44. White TJ, Bruns T, Lee SJW, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc Guide Methods Appl.* 1990;18:315–22.
45. Wieme AD, Spitaels F, Aerts M, de Bruyne K, van Landschoot A, Vandamme P. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int J Food Microbiol.* 2014;185:41–50.
46. Winkelman BI. Análisis del sector cervecero artesanal en San Carlos de Bariloche bajo el enfoque de sistemas agroalimentarios localizados [tesis de licenciatura]. Río Negro (Argentina): Universidad Nacional de Río Negro; 2018.
47. Wray E. Reducing microbial spoilage of beer using pasteurisation. En: *Brewing Microbiology.* Woodhead Publishing; 2015. p. 253–69.
48. Yu Z, Luo Q, Xiao L, Sun Y, Li R, Sun Z, Li X. Beer-spoilage characteristics of *Staphylococcus xylosum* newly isolated from craft beer and its potential to influence beer quality. *Food Sci Nutr.* 2019;7:3950–7.