



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Determinación de los parámetros de Resistencia
Térmica del *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953
bajo condiciones de Calentamiento No Isotérmico

Memoria presentada como parte de los
requisitos para optar al **Título de
Ingeniero en Alimentos.**

Alejandra Waleska Nitrigual Matamala

VALDIVIA – CHILE
2012

PROFESOR PATROCINANTE:

Elton Francisco Morales Blancas
Ingeniero en Industrias Alimentarias, M.Sc.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Universidad Austral de Chile

COPATROCINANTE:

Paola Recabarren Castro
Ingeniero en Alimentos
Laboratorio del Ambiente
SEREMI de Salud Región de los Ríos

PROFESOR INFORMANTE:

Marcia Costa Lobo
Ingeniero Civil Bioquímico
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Universidad Austral de Chile

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor Elton Morales Blancas por haber creído en mis capacidades, por su paciencia, por el gran aporte a mi formación académica y profesional y enseñanza durante todo el tiempo que duró la investigación.
- A la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile a través del Proyecto DID S-2007-16 por el soporte de la presente línea de investigación.
- Al laboratorio del Ambiente, SEREMI de salud de la Región de los Ríos por brindar las facilidades para el desarrollo la parte microbiológica experimental, en especial a la Señora Paola Recabarren, por su amabilidad, ayuda, preocupación y constante aliento para llevar a cabo la presente investigación.
- A todo el personal del Laboratorio del ambiente. Un especial reconocimiento a Don Oscar por compartir todos sus conocimientos y sus sabios consejos. Agradezco a Poli, Claudia, Doris y a Don Benito, quienes tuvieron siempre la disposición para ayudarme y facilitarme las herramientas necesarias para el cumplimiento de parte de los objetivos de la presente investigación.
- Al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), profesores y funcionarios, por la valiosa contribución a mi formación profesional. Mención especial a Gastón, Marcelo y Alex por tener siempre la mejor disposición para suministrar los requerimientos de Servicios de la Planta Piloto.
- A mi madre Iris por su invaluable apoyo, compañía incondicional, por toda la contención que necesité cuando creía que todo era imposible. A mi papá Sergio por entregarme todas las herramientas para ser quien soy. Espero algún día ser como tú.
- A mi hermano Joche por su cuidado y protección en la etapa más difícil de mi vida. A mi manita por creer siempre en mí, por ser mi más leal confidente, por buscar siempre lo mejor para mí. Agradezco en general a toda mi familia.
- A mi gran amiga Tania Carrasco, por su constante apoyo durante la ejecución de la investigación. Infinitas gracias.
- A mis amigas Pamelita, Vale, Nico y Silvanita por la paciencia, ayuda y compañía brindada durante mis estudios en la UACH.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
1	INTRODUCCIÓN	3
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1	Controles de esterilización	6
2.1.1	Indicadores Biológicos (BI)	6
2.1.2	Microorganismos utilizados como indicadores biológicos	8
2.1.2.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	8
2.1.2.2	<i>Bacillus subtilis</i>	9
2.1.3	Evaluación de los Indicadores Biológicos (BI)	10
2.2	Esterilización de alimentos	12
2.2.1	Esterilización de envases de hojalata	14
2.2.2	Esterilización de bolsas flexibles	14
2.2.3	Ventajas y desventajas entre los envases de hojalata y las bolsas esterilizables	14
2.3	Principios de procesamiento térmico	15

2.3.1	Esterilidad comercial	15
2.3.2	Esporulamiento económico	16
2.3.3	Parámetros cinéticos de inactivación térmica de microorganismos	16
2.3.3.1	Valor <i>D</i> o tiempo de reducción decimal	16
2.3.3.2	Valor <i>z</i> o constante de resistencia térmica	18
2.3.3.3	Tiempo de destrucción térmica o valor <i>F</i>	21
2.3.3.4	Número de reducciones decimales (<i>S</i>)	22
2.4	Teoría del cálculo de los procesos térmicos	23
2.5	Métodos de estimación de los parámetros de resistencia térmica	28
	<i>D y z</i>	
2.5.1	Métodos isotérmicos	28
2.5.1.1	Procedimiento de dos etapas	28
2.5.1.2	Procedimiento de una etapa	29
2.5.2	Método No Isotérmico	29
3	MATERIAL Y METODO	32
3.1	Desarrollo experimental en laboratorio de microbiología	32
3.1.1	Preparación de la solución madre	32
3.1.1.1	Determinación del pH de la solución madre	34
3.1.1.2	Determinación de la concentración de esporas de la solución madre	34
3.1.2	Confeción de Unidades Indicadoras Biológicas (BIU)	37

3.1.2.1	Determinación de la población inicial de las Unidades Indicadoras Biológicas (BIU)	39
3.1.2.2	Recuento de la cantidad de esporas contenidas en las BIU después del tratamiento térmico	39
3.2	Desarrollo experimental en Planta Piloto	40
3.2.1	Preparación del “carrier” de las BIU	40
3.2.2	Preparación del sistema de adquisición de datos tiempo-temperatura	44
3.2.3	Experiencias de esterilización	45
3.3	Determinación de la influencia de la BIU en la distribución de temperatura durante el tratamiento térmico	47
3.4	Determinación de los parámetros de resistencia térmica D_0 y z	48
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	50
4.1	Concentración de la solución madre y concentración inicial de la BIU	50
4.2	Estudio de la influencia de la BIU en la distribución de temperatura durante el tratamiento térmico	51
4.3	Recuento de esporas después del tratamiento térmico aplicado	54
4.4	Determinación de los parámetros resistencia térmica D_0 y z	54
5	CONCLUSIONES	62
6	BIBLIOGRAFÍA	63
9	ANEXOS	71

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Microorganismos utilizados como indicadores biológicos	8
2	Valores D y z para <i>Geobacillus stearothermophilus</i> correspondiente a distintas cepas	21
3	Valores D y z para <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953	24
4	Especificaciones técnicas de las termocuplas Kapton®	44
5	Tratamientos térmicos aplicados en el autoclave	47
6	Recuentos (ufc/mL) obtenidos para solución madre	51
7	Recuentos iniciales (ufc/mL) obtenidos para las BIU	51
8	Valores de RMSE considerando temperaturas exterior e interior del BIU con importancia letal ($T > 100$ °C)	53
9	Valores de F_0 y S obtenidos para los datos tiempo-temperatura de las BIU	53
10	Número de microorganismos sobrevivientes (N_f), número de reducción decimal experimental (S_m) y predicho (S_f) para los tratamientos térmicos aplicados	55
11	Valores mínimos de SSQ para los parámetros D_0 y z utilizados	59

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curva típica de esterilización	13
2	Representación esquemática de una curva de supervivencia	17
3	Representación esquemática de una curva TDT	19
4	Esquema de desarrollo experimental para determinar los parámetros de resistencia térmica D_0 y z	33
5	Bioindicador Sterikon® plus marca MERCK	34
6	Esquema de siembra para obtener la concentración de la solución madre	36
7	Equipamiento utilizado en el Laboratorio del Ambiente de la Seremi de Salud de la Región de los Ríos	37
8	Colonias típicas de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> sobre agar dextrosa caseína peptona	37
9	Pipetas Pasteur Hirschmann® LABORGERÄTE	38
10	BIU elaboradas con suspensión de esporas de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	39
11	Esquema de siembra para obtener la concentración inicial de las BIU	41
12	Esquema de siembra directa de las BIU después del tratamiento térmico aplicado	42

13	Esquema de siembra mediante diluciones de las BIU después del tratamiento térmico aplicado	42
14	Selladora al vacío Plaspak modelo KVP-650T	43
15	Bolsa esterilizable con las BIU adheridas a la superficie	43
16	Equipamiento utilizado para la medición de temperaturas	45
17	Sistema de esterilización. Autoclave vertical DIXIE (1). Termómetro TRERICE (2). Manómetro USG (3). Adaptador de Bronce (4a y 4b). Compresor Hydrovane (5).	46
18	Termocuplas al interior y exterior de la BIU	48
19	Perfiles de temperaturas de las termocuplas ubicadas al exterior e interior de la BIU	52
20	Microorganismos sobrevivientes de <i>G. stearothermophilus</i> obtenidos para los tratamientos térmicos TT1 (a) y TT2 (b)	57
21	Microorganismos sobrevivientes de <i>G. stearothermophilus</i> obtenidos para los tratamientos térmicos TT3 (a) y TT4 (b)	58

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Análisis estadístico para determinar la concentración de la solución madre y las BIU	71
2	Perfiles tiempo - temperatura de acuerdo a los tratamientos térmicos preestablecidos	72
3	Recuentos de la cantidad de esporas sobrevivientes al tratamiento térmico	76
4	Detalle agrupado de los valores de $\sum(S_f - S_m)^2$, denotado como SSQ, por tratamiento (SSQTT1, SSQTT2, SSQTT3, SSQTT4), y para todos los tratamientos (SSQTTm)	78

RESUMEN

El principal objetivo de la presente investigación fue determinar los parámetros de resistencia térmica del *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, a través de la fabricación de Unidades Indicadoras Biológicas (BIU) con una determinada población inicial, elaboradas a partir de ampollas comerciales que contienen esporas del citado microorganismo.

La metodología consistió en someter las BIU a tratamientos de esterilización aplicados a nivel industrial. En este sentido los perfiles de temperatura mostraron un período de calentamiento transiente seguido de un período de calentamiento constante, y finalmente una etapa de enfriamiento transiente. Así, para determinar los parámetros de resistencia térmica se utilizó un método no isotérmico. Esto implicó un proceso iterativo de cálculo, en donde su aplicación consistió en la suposición de valores iniciales de D_0 y z , luego mediante el uso de un método no lineal de mínimos cuadrados, los valores de D_0 y z fueron iterados hasta obtener la menor suma de los cuadrados de las diferencias entre las reducciones decimales predicha (S_f) y experimental (S_m). Los valores de S_f para cada ensayo se obtuvieron de los datos tiempo-temperatura respectivo, y los valores de S_m se obtuvieron con el número de microorganismos sobrevivientes (N) para cada tratamiento térmico realizado y con la concentración inicial de las BIU (N_0).

Los valores obtenidos en esta investigación para D_0 y z fueron 1,7 min y 8,8 °C, respectivamente. Ambos valores están dentro de los rangos que se reportan en la literatura especializada, y son característicos para el *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad del uso de las Unidades Indicadoras Biológicas (BIU) en el diseño de procesos térmicos cuando se busca disminuir el sobreprocesamiento típico (mayor tiempo de proceso) de los alimentos poco ácidos envasados al vacío ya sea en envases de hojalata o en bolsas flexibles esterilizables.

SUMMARY

The main objective of this research was to determine the thermal resistance parameters of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, by manufacturing Biological Indicator Units (BIU) with a given initial population, manufactured from commercial ampoules which contain these spores.

The methodology consisted in subjecting the BIU to sterilization treatments applied at industrial level. In this sense the temperature profiles showed a transient heating period followed by a period of constant heating, and finally a transient cooling step. Thus, a non-isothermal method was used to determine the thermal resistance parameters. This involved iterative calculation process, where its application consisted in the supposition of initial values of D_0 and z , then by using a non-linear method of least squares, the values of D_0 and z were iterated to get the least sum of the square differences between the predicted (S_f) and experimental (S_m) decimal reductions. The S_f values for each assay were obtained from time-temperature data, and S_m values were obtained from surviving microorganism number (N) for each thermal treatment performed and the initial microorganism number of the BIU (N_0).

The obtained values to D_0 and z in this research were 1,7 min and 8,8 ° C, respectively. Both values are within the reported ranges in the specialized literature, and they are characteristic for the *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. The obtained results demonstrate the feasibility of using Biological Indicator Units (BIU) in thermal processes design when it seeks to reduce the typical over processing, longer time process, of low-acid food packaged either in can or in retortable pouch.

1 INTRODUCCION

En investigaciones anteriormente realizadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile se ha propuesto la factibilidad del uso de Unidades Indicadoras Biológicas (BIU) para la validación microbiológica de tratamientos de esterilización de alimentos pocos ácidos ($\text{pH} > 4,5$) envasados al vacío ya sea en envases de hojalata o en bolsas flexibles esterilizables. El uso de estas Unidades Indicadoras Biológicas (BIU) tiene como principal ventaja el evitar la inoculación directa de los microorganismos al alimento, eliminando el factor de interacción microorganismo-sustrato la cual podría influenciar su resistencia al calor.

La incorporación de indicadores biológicos (BI) para evaluar procesos térmicos en la industria alimentaria, surgen de la necesidad de reducir los factores de seguridad utilizados en los tratamientos térmicos para alcanzar la Esterilidad Comercial. La excesiva aplicación de calor afecta las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos, siendo ambas características cada vez más apreciadas por consumidores más informados y exigentes respecto a los atributos y riesgos de los alimentos que consumen.

Los indicadores biológicos son preparados de esporas no patógenas y altamente resistentes a los procesos de esterilización (e.g. *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*), y por tanto son útiles y eficaces para establecer la capacidad del tratamiento de esterilización, ya que su “muerte” indicaría la destrucción de los patógenos de interés que son menos termorresistentes como es el caso del *Clostridium botulinum*.

Los indicadores biológicos actualmente disponibles comercialmente, son utilizados para el control de autoclaves durante la esterilización de materiales e instrumentos de laboratorio así como de medios de cultivo. La información que proporcionan las fichas técnicas resulta ser muchas veces limitada, en cuanto a los parámetros de resistencia térmica de los microorganismos. Los parámetros de interés son el tiempo de reducción decimal (D) y la constante de resistencia térmica (z), siendo esta última uno de los

parámetros más importantes para el indicador biológico utilizado. Un valor exacto del parámetro z , permitiría cuantificar en forma correcta la influencia de las temperaturas letales del tratamiento térmico sobre la inactivación de la población microbiana contenida en el indicador.

La literatura especializada reporta parámetros de resistencia térmica para algunas cepas de *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953, ATCC 12980, NCIB 8923, NCIB 8919, NCIB 8924, NCA 1518 y NCTC 10339) siendo la ATCC 7953 la más utilizada comercialmente. Para este último caso, la amplia variabilidad de los parámetros encontrados, $0,12 \text{ min} < D < 14,4 \text{ min}$ y $5,7 \text{ °C} < z < 23,7 \text{ °C}$, dificulta la elección de los valores apropiados para que sean utilizados en forma confiable. Valores inadecuados de D y z , afectarían tanto el cálculo de la letalidad del proceso térmico así como en la estimación de los tiempos de esterilización requeridos para alcanzar el número de reducciones decimales pre-establecidos para el microorganismo considerado.

Tradicionalmente, los parámetros de resistencia térmica de microorganismos, D y z , han sido determinados en condiciones de calentamiento isotérmico. Sin embargo, durante los procesos térmicos de conservas de alimentos, que se aplican en la industria alimentaria, los microorganismos son sometidos a condiciones no-isotérmicas. Algunos estudios realizados dan cuenta que durante la penetración de calor en la conserva, esencialmente transientes, los diferentes fenómenos que tienen lugar pueden afectar la resistencia al calor de esporas, por lo que debe ser considerado en el cálculo de los parámetros de resistencia de los microorganismos.

De la evidencia surge la necesidad de conocer con exactitud los parámetros de resistencia térmica D y z para poder establecer la relación tiempo-temperatura que permitirán evitar la sub o sobre estimación de los valores de letalidad (valor F) requeridos para alcanzar la esterilidad comercial de un tratamiento térmico dado. De esta manera se podría proporcionar un alimento seguro, de calidad y con sus propiedades nutricionales y organolépticas adecuadas.

Basándose en los antecedentes expuestos, el objetivo general y los objetivos específicos de la presente investigación se mencionan a continuación:

Objetivo General:

Determinar los parámetros de resistencia térmica de una cepa de *Geobacillus stearothermophilus*, disponible comercialmente como bioindicador, para ser utilizada en la validación de los tratamientos de esterilización de alimentos poco ácidos envasados al vacío.

Objetivos Específicos:

- Confeccionar Unidades indicadoras biológicas (BIU) de una determinada población de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa ATCC 7953, para ser utilizada en los tratamientos de esterilización de alimentos envasados.
- Aplicar sobre las BIU programas de tratamientos térmicos de esterilización en donde la temperatura de la suspensión de esporas es función del tiempo.
- Determinar los parámetros de resistencia térmica D y z para la suspensión de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* cepa ATCC 7953.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controles de esterilización

Los controles de esterilización se realizan mediante monitoreos que permiten inspeccionar si el proceso de esterilización funciona correctamente. En la actualidad no es suficiente someter los materiales al proceso de esterilización, sino que además se requiere cierto grado de seguridad en la eficiencia del procedimiento. Los controles de esterilización se pueden clasificar en físicos – químicos y biológicos (BERNAL *et al.*, 2008).

2.1.1 Indicadores Biológicos (BI). Son dispositivos preparados de esporas no patógenas y altamente resistentes a los procesos de esterilización y, por lo tanto, son útiles y eficaces para establecer la capacidad del ciclo de esterilización para destruir microorganismos específicos, que se sabe que son más resistentes al proceso que se está probando (RUTALA *et al.*, 1996).

BERNAL *et al.* (2008) señalan que se utilizan en la verificación periódica de tratamientos de esterilización validadas de un equipo que incluyen materiales y componentes de empaque que se empleen en procedimientos asépticos, y en programas de verificación periódica de ciclos de esterilización previamente establecidos y documentados.

Los indicadores biológicos pueden presentarse principalmente en dos formas, en las cuales se utiliza un cultivo de un microorganismo de una especie conocida. En una de las presentaciones, las esporas se adicionan a un soporte (disco o tira de papel filtro, vidrio o plástico) y se empaqueta tanto para mantener la integridad del soporte inoculado, como para permitir que el agente esterilizante ejerza su efecto sobre el empaque individual. Otra presentación es cuando las esporas se adicionan a unidades de lote por esterilizar (producto sin inocular) o a unidades similares; el producto inoculado no afecta negativamente las características de germinación de las esporas viables. Cuando el producto por esterilizar es un líquido, en el cual no es práctico adicionar el

indicador biológico a las unidades seleccionadas, las esporas viables pueden agregarse a un producto simulado cuya resistencia al proceso de esterilización no difiere a la presentada por el producto a esterilizar.

Con respecto a la ubicación de estos indicadores, MERCK (2007) señala que estos deben colocarse en aquellos sitios donde de acuerdo con la experiencia existan condiciones de esterilización más desfavorable, es decir, en el espacio inferior y medio del autoclave. En el caso de esterilización de grandes volúmenes individuales (por ejemplo matraz con líquido) solamente es posible un ensayo con ayuda del bioindicador, si se coloca la ampolla en el centro del recipiente (por ejemplo colgado en el interior de un matraz o introducido en el contenido de las conservas).

Un mal funcionamiento del esterilizador, de la calidad del vapor, de la humedad relativa del área de procesamiento, tipo y método de empaquetado, configuración de la carga y parámetros del ciclo no apropiados para la carga que estamos esterilizando podrían ocasionar que el indicador biológico dé positivo cuando exista un fallo en el proceso de esterilización (RUTALA *et al.*, 1996).

Por otro lado, y con respecto a la parte biológica del indicador, uno de los puntos más críticos en el uso de las esporas bacterianas, es tener una alta concentración de esporas con una resistencia estable al calor, sin cambios después de esporulaciones consecutivas. Las modificaciones en las condiciones de esporulación pueden proporcionar cultivos con diferentes valores de D y z . Estos valores son necesarios de conocer en forma adecuada de modo de poder registrar al menos una reducción después de aplicado el tratamiento térmico (VAN ZUIJLEN *et al.*, 2010).

Otro parámetro importante para la evaluación del proceso es la composición de los alimentos, ya que pueden influir en la resistencia térmica de los microorganismos (CONDÓN y SALA, 1992)

VAN ZUIJLEN *et al.* (2010) mencionan que el propósito final de utilizar las esporas, como una herramienta para evaluar los procesos de esterilización comercial que se aplique a los alimentos de baja acidez es para establecer los requisitos de procesamiento mínimo para garantizar la seguridad y estabilidad microbiana,

manteniendo al mismo tiempo los factores de calidad y reducir al mínimo las necesidades de energía y las emisiones.

2.1.2 Microorganismos utilizados como indicadores biológicos. Dependiendo del tipo de esterilización estos pueden ser según se detalla en el CUADRO 1.

CUADRO 1 Microorganismos utilizados como indicadores biológicos.

Método de Esterilización	Microorganismo utilizado como BI
Calor Húmedo	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i> var. Niger
Calor seco	<i>Clostridium tetani</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i>
Óxido de Etileno-formaldehído	<i>Bacillus subtilis</i> var. Niger
Radiaciones Ionizantes	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Streptococcus faecium</i>

FUENTE: RACINES (2010).

2.1.2.1 *Geobacillus stearothermophilus*. Es la única especie de *Bacillus* de importancia industrial y es el responsable del deterioro por amargor, es decir, produce ácidos a partir de los carbohidratos que amargan el alimento, pero no forma gas, con lo que los fondos y tapas de los envases mantienen su forma normal (HAYES, 1993). El *Geobacillus stearothermophilus* es una bacteria termófila aeróbica formador de esporas elipsoidales. Es una especie heterogénea en las que los rangos distintivos son:

- Temperatura máxima de crecimiento de 65-75 °C, siendo su temperatura mínima de 40 °C.
- La bacteria no crece a 37 °C, y su temperatura óptima es de 55 °C y tiene una tolerancia limitada a la acidez.
- pH mínimo para su crecimiento de 5,2.
- Actividad de agua (a_w) mínima en la temperatura óptima es de 0,93.

La incidencia del *Geobacillus stearothermophilus* en los alimentos está relacionada con la distribución de los microorganismos en el suelo, el agua y las plantas. Es el microorganismo dominante de la remolacha azucarera y ha sido aislada de la leche pasteurizada y descremada en polvo (KOTZEKIDOU, 2000).

En los alimentos enlatados la incidencia de las esporas es de gran interés, entran a la fábrica de conservas por el suelo, en los alimentos crudos y en los ingredientes, por ejemplo las especias, el azúcar, el almidón y la harina. La presencia de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* en algunos envases de un lote determinado, comercialmente estériles en alimentos poco ácidos, puede ser considerado normal (KOTZEKIDOU, 2000).

Como se mencionó anteriormente en 2.1.2 las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* se utilizan como indicador biológico para la verificación de la exposición de un producto a un proceso de esterilización y las cepas comúnmente utilizadas son (KOTZEKIDOU, 2000): NCTC 10007, NCIB 8157 y ATCC 7953 (KOTZEKIDOU, 2000).

Hoy en día la utilización de Unidades Indicadoras Biológicas no sólo es de gran importancia para la verificación de los procesos de esterilización de materiales que necesitan estar en condiciones asépticas sino que ahora el uso de estos indicadores se ha incorporado al área alimentaria siendo el estudio de los parámetros de resistencia térmica para la inactivación del *Geobacillus stearothermophilus* los que han adquirido mayor importancia.

2.1.2.2 *Bacillus subtilis*. Es una bacteria aeróbica que forma endosporas con forma de vara y que contiene flagelos móviles. Se encuentra comúnmente en el suelo y en asociación con las plantas. Es muy resistente y crece en un rango de temperatura de 25-43 °C por lo general en condiciones aeróbicas a pH 5,5-5,8. Sin embargo, también se ha informado de que el *Bacillus subtilis* puede ser clasificado como anaerobio obligado (DAHL, 2000).

La condición normal de crecimiento que se ha informado es a 37 °C con agitación. En estas condiciones y en un medio de cultivo rico en nutrientes específicos, el *B. subtilis*

muestra un tiempo de generación de aproximadamente 20-30 min (DAHL, 2000).

2.1.3 Evaluación de los Indicadores Biológicos (BI). La evaluación del tratamiento de esterilización se puede verificar dentro de 3, 12, 24 ó 48 horas una vez que estos bioindicadores hayan sido incubados a 60 ± 2 °C. Los tiempos y temperaturas dependerán del tipo de indicador (PATIÑO *et al.*, 2001).

MERCK (2007), señala que en el caso de que se verifique una esterilización apropiada, las esporas de *G. stearothermophilus* serán destruidas, por lo tanto el color del contenido de las ampollas Sterikon® plus permanecerán violeta rojizo y transparente. En el caso de una esterilización insuficiente donde sobrevivirían las esporas de *G. stearothermophilus*, el contenido de ampolla mostrará, generalmente dentro de 24 horas de incubación, un viraje de color amarillo-naranja por formación de ácido como consecuencia de la fermentación del azúcar así como una turbidez debido al desarrollo y multiplicación de la bacteria.

La importancia que ha adquirido el uso de indicadores biológicos ha llevado a los investigadores a realizar estudios, para determinar las condiciones en que se produce la inactivación térmica de estos microorganismos no patógenos. Para evaluar biológicamente los procesos térmicos, han incorporado la utilización de capilares de vidrio (BIU) que contienen por lo general esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.

Aunque en la literatura especializada existen pocos trabajos reportados con capilares, los resultados que han proporcionado estos estudios permiten determinar con mayor exactitud las condiciones en las que se debe llevar a cabo un proceso de esterilización. A continuación se mencionan algunos de estos trabajos.

- ICIEK y PAPIEWSKA (2006) realizaron una investigación utilizando *Geobacillus stearothermophilus* cepa ATCC 10149. Ellos combinaron diferentes concentraciones de NaCl, pH y temperatura para estudiar la inactivación térmica de esta cepa. La evaluación biológica la realizaron a través de un recuento en placa de las esporas viables expresado en ufc/cm^3 a una temperatura de incubación de 55 °C durante 48 h.
- ICIEK *et al.* (2008) utilizaron la misma cepa mencionada anteriormente (ATCC

10149). El objetivo de este trabajo fue estudiar la inactivación térmica de la cepa pero utilizando como sustrato solución de triptona y jugo de remolacha roja acidificada. La evaluación biológica la realizaron a través de un recuento en placa a una temperatura de incubación de 55 °C durante 48 h.

- VAN ZUIJLEN *et al.* (2010) realizaron el estudio de las curvas de supervivencia isotérmica del *Bacillus sporothermodurans* IC4 en agua destilada. El número de esporas viables fue determinado realizando una siembra en duplicado en agar nutritivo a una temperatura de incubación de 37 °C durante 48 h.
- PERIAGO *et al* (1998) determinaron los parámetros de resistencia térmica bajo condiciones de calentamiento isotérmico y no isotérmico de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980. El recuento de células viables la realizaron en duplicado y fueron incubadas a 60 °C durante 40 horas.
- MÁRQUEZ (2008) realizó un estudio para determinar la factibilidad del uso de Unidades Indicadoras Biológicas, elaboradas a partir de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* cepa ATCC 7953, para la evaluación de tratamientos de esterilización en filetes de alimentos envasados al vacío en bolsas esterilizables. La factibilidad se evaluó considerando que para una esterilización apropiada, las esporas de *G. stearothermophilus* son destruidas, por lo tanto el color del contenido de las BIU elaborados permanecerían violeta y transparente. En el caso de una esterilización insuficiente donde sobreviven las esporas se producirá un viraje de color de violeta a amarillo.
- ALARCÓN (2008) utilizó *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 para validar microbiológicamente los procesos térmicos de alimentos de formas complejas envasados al vacío en bolsas esterilizables. La evaluación biológica la realizó determinando la población residual de esporas sembrando en triplicado en agar dextrosa peptona a una temperatura de incubación de 60 °C durante 48 h.

Otros estudios se han realizado utilizando tubos de acero de aproximadamente 10 mm de diámetro como el que realizaron DOGAN *et al.* (2009) para estudiar la cinética de inactivación de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* en sistemas de

calentamiento continuo y batch. La validación la realizó por medio de recuento en placa a 55 °C durante 72 h.

FRAIHA *et al.* (2010) determinaron los parámetros termobacteriológicos de esporas de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 utilizando tubos de TDT de 10 mm de diámetro. La siembra de las esporas viables después del tratamiento se realizó en agar dextrosa triptona, seguido de una incubación de 48 h a 50 °C.

2.2 Esterilización de alimentos

Es una operación básica a nivel industrial, en la cual el alimento ya sea sólido o líquido es calentado a una temperatura superior a 100 °C y durante suficiente tiempo con el objetivo de eliminar la actividad microbiana y enzimática, asegurando la estabilidad del producto (CIRO *et al.*, 2009).

En productos envasados, la esterilización puede considerarse como un proceso térmico, en el cual interviene un medio calefactor y un medio a calentar. En este proceso intervienen los diferentes mecanismos de transferencia de calor que sumados a la heterogeneidad del producto (alimento) hacen que dicho proceso sea complejo cuando se pretende predecir su comportamiento (CIRO *et al.*, 2009).

ALVARADO *et al.* (2009) señalan que la esterilización de alimentos no es selectiva por lo que las pérdidas del valor nutricional y sensorial de los alimentos son inherentes al proceso. Los mismos autores definen la efectividad de un proceso térmico, basado en la definición de esterilización comercial emitida por la Food and Drug Administration (FDA, USA) de la siguiente manera: “La aplicación del calor al alimento, antes o después de ser empacado en un contenedor sellado herméticamente, por un período de tiempo y a una temperatura determinada, que garantice la destrucción de microorganismos que puedan dañar la salud de consumidores”. Además requiere del conocimiento de cinéticas de destrucción de microorganismos, enzimas y nutrientes asociados a la calidad del alimento, además del historial de temperatura de la zona de más lento calentamiento del envase.

En la FIGURA 1, se muestra una curva típica de esterilización de un producto, indicando sus diferentes etapas, las cuales se definen a continuación:

- **CUT** (*Come-up time*) o tiempo de elevación de la temperatura, es el tiempo que transcurre desde que comienza la entrada de vapor (t_0) al autoclave cerrado, hasta alcanzar la temperatura de esterilización (t_{cut}).
- **Tiempo de esterilización** o **tiempo del operador**, es el tiempo en que el producto se encuentra sometido a la temperatura de esterilización, este periodo finaliza cuando termina la entrada de vapor al autoclave. Va desde el tiempo inicial del operador (t_{cut}) hasta el tiempo final del operador (t_g).
- **Tiempo de enfriamiento**, es el tiempo que demora el producto en bajar su temperatura desde la temperatura final del proceso de esterilización (t_g) hasta una temperatura por debajo de 30 °C.

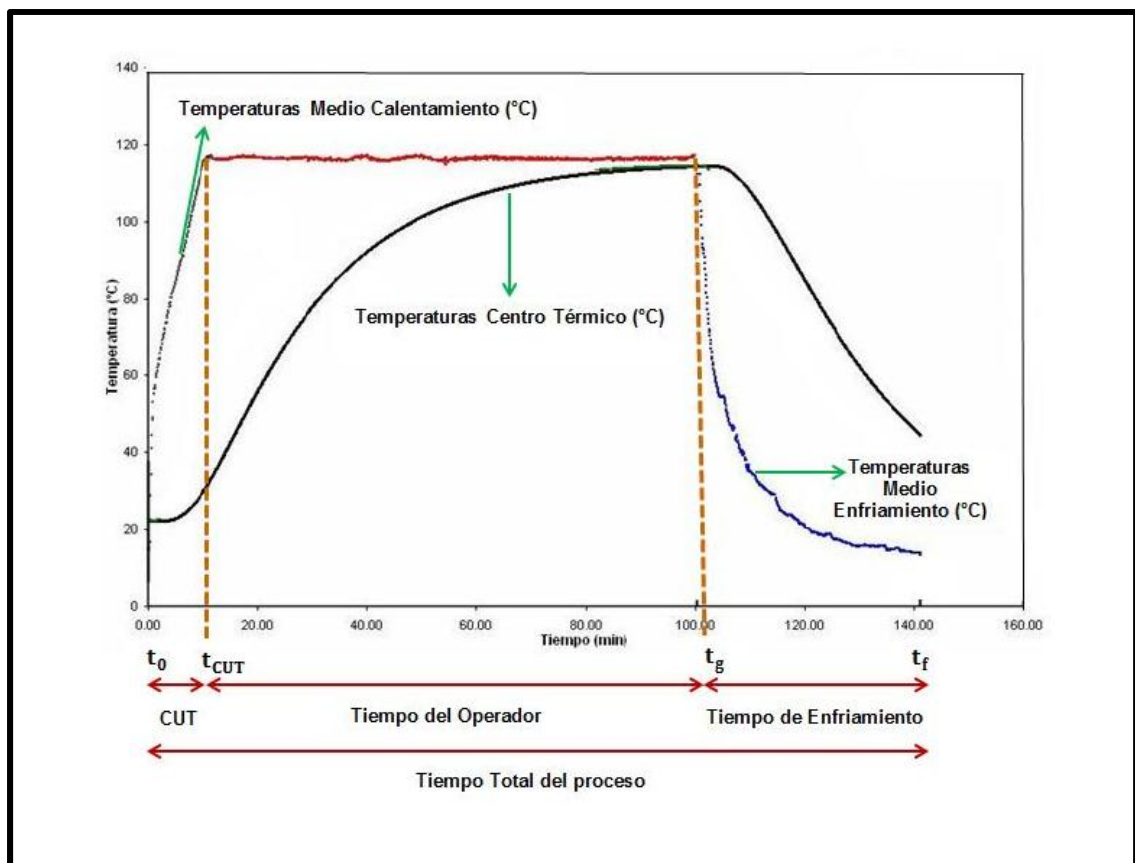


FIGURA 1 Curva típica de esterilización.

FUENTE: Adaptado de NAVARRO (2007).

2.2.1 Esterilización de envases de hojalata. El enlatado es un método de conservación de alimentos en donde la esterilización se realiza por calor en recipientes herméticamente cerrados, lo que permite que estén listos para su consumo, y que no son ni congelados, ni deshidratados para que sean seguros y saludable durante meses o incluso años de almacenamiento a temperatura ambiente sin el uso de aditivos ni preservantes (TEIXEIRA, 2005).

La esterilización se realiza en autoclaves en donde, latas, tarros o recipientes están llenos de alimentos y están herméticamente cerrados, luego son calentados con vapor saturado a presión hasta que el calor penetre hacia el interior de la pared y del producto alcanzando el punto de más lento calentamiento y en donde el envase y el alimento son esterilizados en conjunto (TEIXEIRA, 2005).

2.2.2 Esterilización de bolsas flexibles. Para la esterilización de bolsas se aplican técnicas de esterilización alta-corto, con temperaturas de 121-135 °C. En estas condiciones es necesario trabajar con sobrepresión de aire, fundamentalmente durante el ciclo de enfriamiento de los envases. Es por esto que se ha llegado al consenso que comprende el realizar un proceso donde se equilibren las presiones internas y externas cuando las temperaturas durante el ciclo de calentamiento superen los 100 °C y cuando se retorna a esa temperatura durante el enfriamiento (MITCHELL, 2002).

La práctica aconseja el uso de una sobrepresión de aire de 0,2 a 0,7 Kg_f / cm^2 . Esta sobre presión, además de asegurar la integridad frente a los problemas de expansión térmica del aire residual y del producto envasado es necesaria para mejorar la transmisión de calor y juega un papel importante en la inmovilización de las bolsas, previniendo la agitación y los movimientos que podrían dañar los cierres (LAMPI, 1977).

Los autoclaves usados en el procesamiento de bolsas pueden ser batch (por carga) o continuo, con agitación o sin agitación y requieren vapor o aire como fuente de sobrepresión para controlar la integridad de las bolsas.

2.2.3 Ventajas y desventajas entre los envases de hojalata y bolsas esterilizables. El perfil delgado y el aumento en el área superficial de la bolsa esterilizable permiten una penetración de calor más rápida, lo que hace mucho más

eficiente este proceso que en los envases de hojalata. Esto permite una mejora en la calidad del producto, mejor sabor, color y textura que en productos similares procesados en envases de hojalata (HEINTZ, 1980).

Con respecto a los envases de hojalata su línea de producción superan las 800 unidades por minuto, lo que es una ventaja con respecto a las bolsas esterilizables, en donde los equipos actuales de llenado y sellado trabajan a velocidades de 60 a 120 bolsas por minuto (CATALA, 1982).

Las bolsas necesitan de un embalaje adicional debido a su flexibilidad, para la protección de materiales frágiles, lo que aumenta el costo de elaboración del producto. Sin considerar la elevada inversión en las instalaciones, que es unas 10 veces superior a la instalación de una línea completa de envasado de enlatados (MITCHELL, 2002).

2.3 Principios de procesamiento térmico

Debido a la cinética de primer orden que sigue la inactivación microbiana es prácticamente imposible la obtención de un producto totalmente estéril. La destrucción completa de formas viables, representaría la destrucción del alimento. Los tratamientos térmicos además de inactivar microorganismos, también destruyen algunas vitaminas termolábiles como la tiamina y promueven la oxidación de lípidos (ALVARADO *et al.*, 2009).

Un procesamiento térmico efectivo se basa en la definición de esterilidad comercial como también de los factores que determinan las condiciones del proceso térmico y entre los cuales podemos mencionar: el tipo de microorganismo y sus parámetros de resistencia térmica, así como también pH, composición del alimento, condiciones de calentamiento, medio de calentamiento, tipo de contenedor, forma y tamaño (ALVARADO *et al.*, 2009).

2.3.1 Esterilidad comercial. Se puede definir como aquella condición de un alimento que es consecuencia de un tratamiento, generalmente térmico, aplicado para lograr que esté libre de gérmenes patógenos o que sean incapaces de multiplicarse en él en condiciones de temperatura ambiente durante su almacenamiento y distribución. Es

decir, no deben existir formas vegetativas, esporas de bacterias patógenas o toxígenas ni microorganismos capaces de alterar el producto (PASCUAL y CALDERON, 2000).

2.3.2 Esporulamiento económico. Es el esporulamiento de microorganismos que no dañan la salud pública. Los microorganismos esporulados termófilos frecuentemente tienen una mayor resistencia al calor que el *C. botulinum* y su desactivación o destrucción es la base para el diseño del proceso térmico en algunas plantas conserveras (TOLEDO, 1991).

2.3.3 Parámetros cinéticos de inactivación térmica de microorganismos. Un aspecto crítico en el cálculo de procesos térmicos es la necesidad de conocer los parámetros que cuantifican la influencia de las temperaturas letales sobre la inactivación de las poblaciones microbianas. El impacto de las temperaturas letales sobre las poblaciones microbianas requiere referirse al Tiempo de Reducción Decimal (Valor D) y al Tiempo de Destrucción Térmica (TDT ó valor F), además del concepto de la Constante de Resistencia Térmica (valor z) (MORALES-BLANCAS y TORRES, 2003 ab).

2.3.3.1 Valor D o tiempo de reducción decimal. Es definido como “el tiempo requerido para inactivar el 90% de las esporas o células vegetativas de un organismo dado expuesto a una temperatura letal constante en un medio dado” (RAMASWAMY y SINGH, 1997; FDA/CFSAN, 2000; PFLUG, 1987a).

En los cálculos de tratamientos térmicos se supone que este tiempo es independiente de la concentración inicial de microorganismos y dependiente de la temperatura, tipo de microorganismo y medio de cultivo o alimento en el que crecen los microorganismos (IBARZ y BARBOZA, 2005).

CASP y ABRIL (1999) señalan que el significado práctico del valor D se puede explicar de la siguiente manera:

- Cuando se mantiene una suspensión de esporas a una temperatura constante durante un tiempo de D minutos, se destruye el 90% de la población inicial; si se alarga el tratamiento durante otros D minutos, se destruirá el 90% de la población residual y así sucesivamente.

- Conociendo el valor del parámetro D de un microorganismo a una temperatura definida y el número de reducciones decimales deseadas, se podrá determinar cuál será la duración del tratamiento a aplicar a esa temperatura constante.

Numéricamente el valor D es igual al número de minutos requerido para que la curva de concentración de microorganismos sobrevivientes o componentes químicos reduzca un ciclo logarítmico. En el caso de la inactivación microbiana, ésta puede ser determinada gráficamente trazando el número de sobrevivientes como una función del tiempo de calentamiento a temperatura letal constante usando la típicamente llamada Curva de Supervivencia (RAMASWAMY y SINGH, 1997; HELDMAN y HARTEL, 1997) FIGURA 2.

Matemáticamente es igual al recíproco negativo de la pendiente de la curva de supervivencia y puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\frac{\log N_{t_1} - \log N_{t_2}}{t_1 - t_2} = -\frac{1}{D_T} \quad (2.1)$$

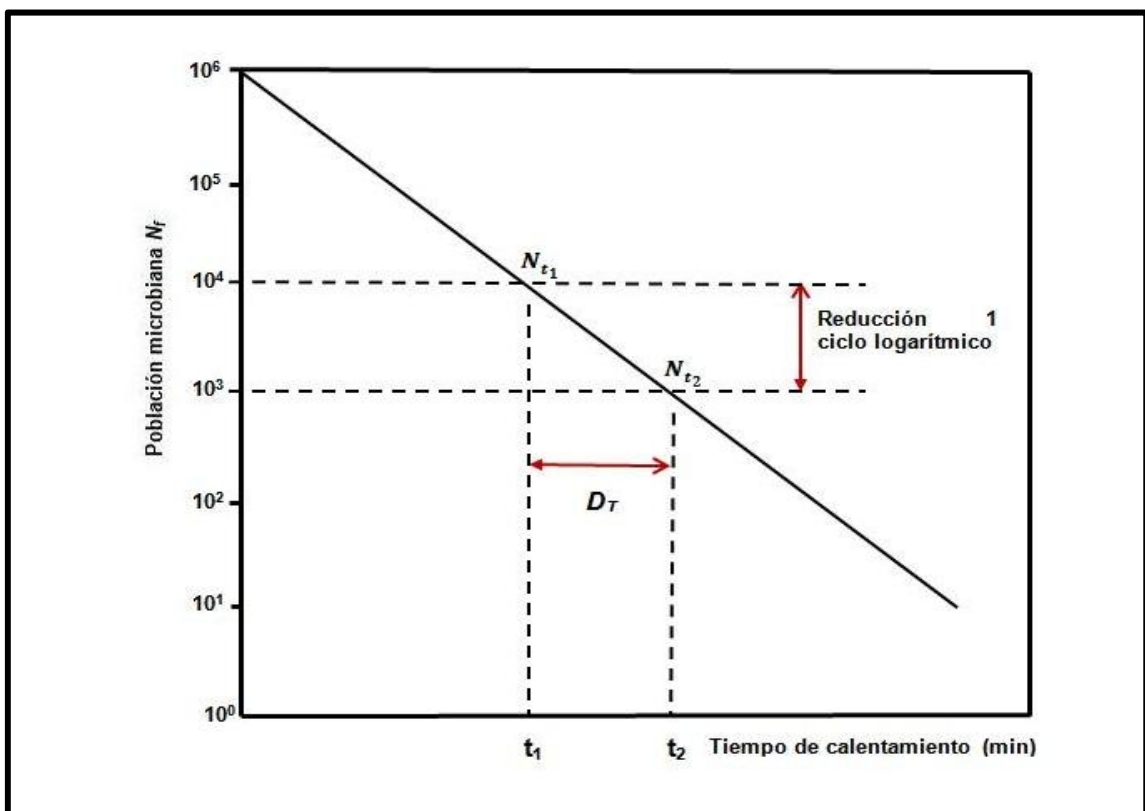


FIGURA 2 Representación esquemática de una curva de supervivencia.
FUENTE: MORALES-BLANCAS y TORRES (2003a).

La Ecuación anterior (2.1) puede ser reordenada para describir los cambios en la población microbiana como una función del tiempo de calentamiento, t .

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -\frac{t}{D_T} \quad (2.2)$$

La Ecuación (2.2) es el modelo empírico que expresa el valor F ó TDT como múltiplo del valor D como sigue (PFLUG, 1987 ab).

$$F_{T_{ref}}^z = D_{T_{ref}} (\log N_0 - \log N_t) \quad (2.3)$$

2.3.3.2 Valor z o constante de resistencia térmica. Es un parámetro básico en el esquema de evaluación de la inactivación microbiana por calor. Este término apareció en los primeros esfuerzos por ajustar los datos en bruto de la velocidad de destrucción térmica hacia un coeficiente de temperatura usando la curva de Tiempo de destrucción Térmica, cuyas siglas en Inglés son TDT (Thermal Death Time). La curva de tiempo de destrucción se obtiene trazando sobre un gráfico semi-logaritmico los valores TDT en función de una temperatura letal (BALL, 1923:1928; TOWNSEND *et al.*, 1938).

CASP y ABRIL (1999) mencionan que el parámetro z define la termorresistencia característica de cada especie de microorganismo en un medio de composición definida y que su significado práctico es que cuando se eleva la temperatura de tratamiento en z grados, el tiempo requerido para conseguir la misma destrucción térmica es 10 veces menor.

El valor z numéricamente es igual al número de grados (en °F ó °C) requeridos para cambiar en un ciclo logarítmico, o por un factor de 10, el valor del tiempo de reducción decimal (valor D). Gráficamente puede ser determinado trazando el logaritmo del valor D en función de la temperatura letal, el cual desde 1950 es frecuentemente referido como la curva de Tiempo de Destrucción Térmica (TEXEIRA, 1992; STUMBO *et al.*, 1950; BAIRD-PARKER *et al.*, 1970; BREMER *et al.*, 1998).

En la tecnología de esterilización de alimentos sobre el rango de temperaturas de interés, las curvas TDT se aproximan a líneas rectas (STUMBO, 1973) como se observa en la FIGURA 3.

Matemáticamente, el valor z es igual al recíproco negativo de la pendiente de la curva TDT y puede ser expresado como sigue:

$$\frac{\log D_{T_1} - \log D_{T_2}}{T_1 - T_2} = -\frac{1}{z} \quad (2.4)$$

La Ecuación (2.4) es usada cuando el valor z es calculado de valores de D , y algunas veces es denotado por el símbolo z_D (STUMBO, 1950; TÖRÖK y KING, 1991; XEZONES y HUTCHINGS, 1965; SCHUMAN *et al.*, 1997).

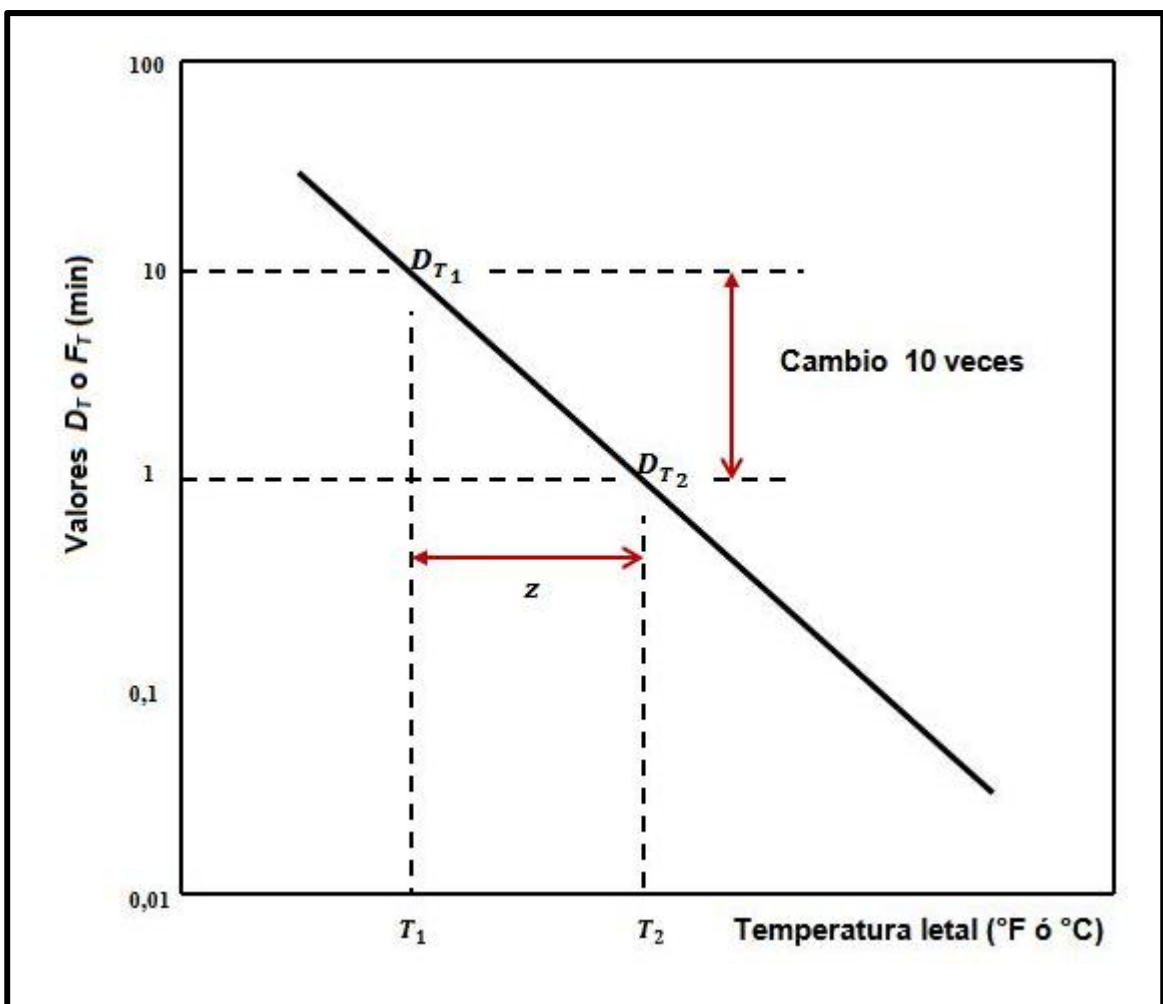


FIGURA 3 Representación esquemática de una curva TDT.
FUENTE: MORALES-BLANCAS y TORRES (2003a).

Cuando el valor z es determinado a partir de los datos TDT (valor F) se utiliza algunas veces el símbolo z_F (RAMASWAMY y SINGH, 1997; TOWNSEND *et al.*, 1938; BRADSHAW *et al.*, 1987; REED *et al.*, 1951; OSBORNE y BREMER, 2000). De esta manera los valores z pueden ser calculados de valores TDT (valores F_T) a partir de la pendiente de la curva TDT de la siguiente forma:

$$\frac{\log F_{T_1} - \log F_{T_2}}{T_1 - T_2} = -\frac{1}{z} \quad (2.5)$$

La Ecuación (2.4) citada puede ser reescrita como sigue (TOLEDO, 1991; FDA/CFSAN, 2000):

$$\log \left[\frac{D_T}{D_{T_{ref}}} \right] = -\frac{(T - T_{ref})}{z} \quad (2.6)$$

También puede ser reordenada de la siguiente manera (TOLEDO, 1991; RAMASWAMY y SINGH, 1997; MERSON *et al.*, 1978; ÁVILA y SILVA, 1999):

$$D_T = D_{T_{ref}} 10^{(T_{ref} - T)/z} \quad (2.7)$$

Basado en la Ecuación (2.5), se obtuvo la Ecuación de la curva TDT (TOLEDO, 1991; RAMASWAMY y SINGH, 1997; MERSON *et al.*, 1978):

$$TDT = F_T = F_{T_{ref}} 10^{(T_{ref} - T)/z} \quad (2.8)$$

Con respecto a la relación que tiene el valor z con el uso de indicadores biológicos, KRUSHEFSKI y GILLIS (2008) señalan que el valor z es una de las más importantes expresiones de la resistencia de un indicador biológico (BI). Ellos indican que sólo mediante la aplicación de un valor z adecuado se puede predecir con exactitud la letalidad biológica emitida por el proceso. El propósito de los indicadores biológicos es proporcionar una confirmación biológica precisa de los datos generados físicamente.

Las esporas son la única herramienta disponible que puede integrar con exactitud todas las variables cruciales del proceso, conocido o desconocido. Si las esporas sobreviven al proceso de esterilización significa que el tratamiento térmico no ha emitido la letalidad física suficiente para destruirlas.

Debido a lo anteriormente citado, se han realizado diversos estudios para poder determinar los parámetros de resistencia térmica del *Geobacillus stearothermophilus*. En el CUADRO 2 se mencionan algunos valores de D y z del *Geobacillus stearothermophilus* para diferentes cepas ATCC 7953 y en el CUADRO 3 valores de D y z correspondiente a la cepa utilizada en la presente investigación.

CUADRO 2 Valores D y z para el *Geobacillus stearothermophilus* correspondiente a distintas cepas.

Cepa	Valor D (min)	Rango de Temperatura Investigada (°C)	Valor z (°C)	Metodología	Referencia
ATCC 12980	3,6	115-125	8,5	Medio de Calentamiento baño de Aceite	PERIAGO <i>et. al.</i> (1998)
NCIB 8923	$D_{120^{\circ}\text{C}} = 5,8$	115-130	13	Calentamiento en buffer fosfato (pH= 7) o agua	KOTZEKIDOU (2000)
NCIB 8919	$D_{120^{\circ}\text{C}} = 5,3$	115-130	11		
NCIB 8924	$D_{120^{\circ}\text{C}} = 1,0$	115-130	8,9		
NCA 1518	$D_{160^{\circ}\text{C}} = 3,2$ $D_{160^{\circ}\text{C}} = 27$	100-160	14 22	Calor Seco	KOTZEKIDOU (2000)
NCTC 10339	$D_{160^{\circ}\text{C}} = 0,16$	150-180	26-29		

2.3.3.3 Tiempo de destrucción térmica, o valor F . Se utiliza como base para comparar los procedimientos de esterilización por calor. Se define como el tiempo necesario para lograr una reducción en el número de microorganismos especificado a una temperatura letal determinada. Cuando está asociado a una temperatura de referencia de 250 °F (121,1 °C) el valor F es denotado como F_0 . (FELLOWS, 2000). El valor F es específico para una población microbiana caracterizada por su valor z (MORALES-BLANCAS y TORRES, 2003b).

2.3.3.4 Numero de reducciones decimales (S). También denominado “efecto esterilizante” o “eficiencia de esterilización” y se refiere al número de reducciones decimales en el recuento de esporas bacterianas logrado por un proceso dado de esterilización. CAMBIANO y VON DER BECKE (2000) señalan que este es un concepto más útil y realista, ya que una función logarítmica nunca puede alcanzar el valor cero. En otras palabras, la esterilidad definida como la ausencia de esporas vivientes en un volumen ilimitado de producto, es imposible de lograr.

Es por eso, que cada vez que es llevado a cabo un proceso de esterilización, éste puede ser caracterizado por un cierto efecto esterilizante. En cualquier proceso térmico de esterilización, el efecto esterilizante es determinado por la combinación de tiempo/ temperatura aplicada. A mayor temperatura y mayor tiempo de tratamiento, el proceso será más eficiente.

TOLEDO (1991) señala que la base para la letalidad de un proceso o la destrucción de entidades microbiológicas en un alimento sometido a un tratamiento térmico, está representada como una expresión de un valor esterilizante logrado en un proceso como se muestra a continuación:

$$S = \text{número de reducción decimal} = \log\left(\frac{N_0}{N_f}\right) \quad (2.9)$$

donde:

N_0 Corresponde al número inicial de microorganismos.

N_f Es el número de microorganismos sobrevivientes.

En un proceso a temperatura constante, los valores de S y F_T pueden ser fácilmente convertidos usando la siguiente Ecuación:

$$S = \frac{F_T}{D_T} \quad (2.10)$$

Sin embargo, si la suspensión es calentada bajo condiciones de temperatura que cambian tales como en el interior de la lata durante el proceso térmico, la expresión anterior sólo puede ser usada si el valor F_T es calculado con el mismo valor z de la

entidad microbiana representada por D_T . El uso del valor S para expresar el proceso de letalidad es absoluto, es decir, es el efecto esperado del proceso térmico. No obstante, un valor de S representa una entidad microbiológica específica y cuando varias entidades deben ser inactivadas, el valor de S debe ser calculado para cada una de estas de un valor de F usando la Ecuación (2.10) (TOLEDO, 1991).

2.4 Teoría del cálculo de los procesos térmicos

La teoría del cálculo de los procesos térmicos se desarrolló en base a considerar una suspensión de esporas (N) sometidas a una temperatura constante letal T . Así, la velocidad de destrucción de las esporas de los microorganismos es dada por:

$$-\frac{dN}{dt} = K_T N \quad (2.11)$$

Donde K_T es la constante del modelo de muerte térmica de primer orden siguiendo la teoría de la cinética de reacción química.

Siendo $D_T = \frac{2,303}{K_T}$, la Ecuación (2.11) es equivalente en términos de logaritmos comunes a:

$$-\frac{d(\log N)}{dt} = -\frac{1}{D_T} \quad (2.12)$$

El coeficiente D_T es una característica del tipo de esporas en el medio bajo consideración y se ha determinado experimentalmente que varía con la temperatura de acuerdo a la *curva de supervivencia* (FIGURA 2) y expresado matemáticamente mediante la Ecuación (2.7).

CUADRO 3 Valores *D* y *z* para *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953.

Sustrato	Valor <i>D</i> (min)	Rango de Temperatura investigada (°C)	Valor <i>z</i> (°C)	Metodología	Referencia
Solución Ringer (pH=7,1)	$D_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0,7$	100-130	13	Sistema batch (recipiente cerrado)	DOGAN <i>et al.</i> (2009)
Solución Ringer (pH=7,1)	$D_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0,12$	100-130	13	Sistema continuo (intercambiador de calor)	DOGAN <i>et al.</i> (2009)
Solución Salina (pH=6,71)	$D_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 8,8$	100-126	12,8	Baño termo regulado de doble pared con aceite vegetal	FRAIHA <i>et al.</i> (2010)
Mezcla de maíz y soja	$D_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 14,2$	103-122	23,7	Baño termo regulado de doble pared con aceite vegetal	FRAIHA <i>et al.</i> (2010)
Alimento para Bebés	$D_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1,57$	110-121	8,32	Autoclave (Dixie)	PHINO Y CRISTIANINI (2005)
En 0,1% de caldo triptona	$D_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1,53 - 1,8$	-----	15,3-18	Autoclave modelo H 3000 (Cristofoli)	LETRARI <i>et al.</i> (2006)
-----	$D_{121,1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 4 - 5$	-----	7,8-12,2	-----	STUMBO (1973)

CUADRO 3 Valores *D* y *z* para *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (continuación).

Sustrato	Valor <i>D</i> (min)	Rango de Temperatura investigada (°C)	Valor <i>z</i> (°C)	Metodología	Referencia
Pouches de sopas con carne vegetal	$D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 4$	-----	10	Olla a presión como medio de calefacción para generar vapor saturado	ABDUL GHANI <i>et al.</i> (2002)
Buffer fosfato pH= 7 o agua	$D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 2,1$	111-125	8,5	-----	KOTZEKIDOU (2000)
Buffer fosfato pH= 7 o agua	$D_{118^{\circ}\text{C}} = 10$	110-120	5,7	-----	KOTZEKIDOU (2000)
-----	$D_{160^{\circ}\text{C}} = 0,08$	150-170	19	Calor seco	KOTZEKIDOU (2000)

Considerando un solo tipo de espora suspendida en un alimento enlatado el cual es calentado y enfriado durante un proceso térmico, la temperatura en un punto dado en el interior del tarro es función del tiempo, $T(t)$. El cambio en la concentración de esporas en aquel punto puede encontrarse sustituyendo la Ecuación (2.7) en la Ecuación (2.12). Integrando entre los tiempos inicial (t_0) y final (t) donde la concentración de esporas inicial y final en el producto es N_0 y N respectivamente, tendríamos la siguiente Ecuación:

$$-\int_{N_0}^N d(\log N) = \frac{1}{D_{T_{ref}}} \int_{t_0}^t \frac{dt}{10^{(T_{ref}-T(t))/z}} \quad (2.13)$$

Reordenando la Ecuación (2.13) se obtiene:

$$-D_{T_{ref}} \int_{N_0}^N d(\log N) = \int_{t_0}^t \frac{dt}{10^{(T_{ref}-T(t))/z}} \quad (2.14)$$

El lado izquierdo de la Ecuación (2.14) entrega una relación entre F y el cambio de la concentración de esporas, de esta manera se puede hablar de un valor de " $F_{requerido}$ "

$$\left(F_{T_{ref}}^z \right)_{requerido} = D_{T_{ref}} (\log N_0 - \log N) \quad (2.15)$$

donde:

N_0 Concentración inicial de esporas del alimento y su valor es establecido experimentalmente.

N Concentración final segura establecido por la entidad de Salud Pública o por consideraciones de velocidad de esporulamiento.

El lado derecho de la Ecuación (2.14) relaciona el valor F con la historia tiempo-temperatura del proceso, $T(t)$, que las esporas han experimentado entre los t_0 y t . Así podemos hablar del valor " **F del proceso**".

(2.16)

$$\left(F_{T_{ref}}^z\right)_{\text{proceso}} = \int_{t_0}^t \frac{dt}{10^{(T_{ref}-T(t))/z}}$$

El subíndice T_{ref} de F indica que el efecto integrado tiempo-temperatura sobre las esporas es equivalente al tiempo F en minutos a una temperatura letal constante T_{ref} . Las temperaturas de referencia comunes son 121 °C (250 °F) para alimentos no ácidos y 100 °C (212 °F) ó 82,2 °C (180 °F) para productos ácidos. El sobre índice z indica que se considera sólo un tipo de spora y que puede considerarse constante sobre las condiciones normales de procesamiento.

La eficacia del proceso térmico en la muerte de los microorganismos en un producto alimenticio puede ser indicada por el **valor F o la letalidad**. El valor de la letalidad o esterilización de un proceso térmico es una medida de la eficacia del tratamiento térmico. La letalidad debe ser al menos la unidad para que la esterilidad comercial sea alcanzada (BARRET *et al.*, 2005).

La letalidad matemáticamente se define mediante la siguiente Ecuación:

$$\text{Letalidad} = \frac{\left(F_{T_{ref}}^z\right)_{\text{proceso}}}{\left(F_{T_{ref}}^z\right)_{\text{requerido}}} \quad (2.17)$$

$$\text{Letalidad} = \frac{1}{\left(F_{T_{ref}}^z\right)_{\text{requerido}}} \int_{t_0}^t \frac{dt}{10^{(T_{ref}-T(t))/z}} \quad (2.18)$$

El término $(F_{T_{ref}}^z)_{\text{requerido}} 10^{(T_{ref}-T(t))/z}$ es denominado “Tiempo de destrucción Térmica” el cual fue definido en 2.3.3.3 de esta manera se tiene que:

$$\text{Letalidad} = \int_{t_0}^t \frac{dt}{\text{TDT}} \quad (2.19)$$

2.5 Métodos de estimación de los parámetros de resistencia térmica D y z

Tradicionalmente, los parámetros de inactivación térmica de microorganismos han sido determinados en condiciones de calentamiento isotérmico, siendo este procedimiento relativamente simple bajo estas condiciones (PERIAGO *et al.*, 1998).

Sin embargo, los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos envasados en la industria de alimentos constan de fases de calentamiento no isotérmico (que corresponden a fases de calentamiento y enfriamiento), que pueden ser incluso más importantes que las de calentamiento isotérmico. Este hecho ha llevado a la utilización de métodos no isotérmicos como una alternativa para estudiar la cinética de la inactivación de esporas (CONESA *et al.*, 2003).

2.5.1 Métodos isotérmicos. Es el método tradicional y más comúnmente usado para determinar los parámetros de resistencia térmica para una cinética de primer orden y que considera un procedimiento de dos etapas utilizando regresión lineal y uno de una etapa de regresión no lineal.

2.5.1.1 Procedimiento de dos etapas. En primer lugar, el valor de D_T se calcula a partir de la curva de supervivencia, por regresión lineal de $\log N$ en función del tiempo de acuerdo a la Ecuación (2.20) y posteriormente el valor z se obtiene de la curva de reducción del tiempo decimal a través de una regresión lineal entre $\log D_T$ y temperatura según la Ecuación (2.21) (CONESA *et al.*, 2003).

$$\log N_t = \log N_0 - \frac{t}{D_T} \quad (2.20)$$

$$\log D_T = \log D_{T_{ref}} - \frac{(T - T_{ref})}{z} \quad (2.21)$$

En general, los resultados del método de dos etapas genera un intervalo de confianza relativamente alto debido al pequeño número de grados de libertad (LUND, 1983) y en consecuencia, los valores de D predichos a partir de la curva de muerte térmica también presentan amplios intervalos de confianza (PERIAGO *et al.*, 1998).

Por lo tanto, la estimación de los parámetros de resistencia térmica del modelo requiere una cuidadosa atención a los límites estadísticos generado por los datos experimentales (MORALES-BLANCAS y TORRES, 2003b).

2.5.1.2 Procedimiento de una etapa. Por lo anteriormente mencionado ARABSHAHI y LUND (1985) presentaron un método de regresión no lineal en un solo paso para el análisis de datos cinéticos de calentamiento isotérmico, que proporcionaba resultados estadísticamente más confiables al aumentar los grados de libertad y reducir el intervalo de confianza para los parámetros de resistencia térmica siendo esta metodología aplicada con éxito para el estudio de la inactivación térmica de los microorganismos.

El procedimiento menciona que los parámetros de resistencia térmica $D_{T_{ref}}$ y z pueden ser obtenidos mediante la siguiente Ecuación:

$$\log N_t = \log N_0 - \frac{t}{D_{T_{ref}} 10^{(T_{ref} - T)/z}} \quad (2.22)$$

2.5.2 Método No Isotérmico. Este método implica un proceso iterativo. Los valores iniciales de D y z son supuestos, y mediante el uso de un método no lineal de mínimos cuadrados, los valores de los parámetros D y z son iterados hasta obtener la menor suma de los cuadrados (MORALES-BLANCAS y TORRES, 2003b).

De acuerdo al método descrito por PERIAGO *et al.* (1998) en condiciones no isotérmicas, la siguiente integral se resuelve numéricamente asumiendo inicialmente

los valores de D_0 y z , como se mencionó anteriormente, y utilizando los perfiles de temperatura obtenidos de forma experimental.

$$\log \frac{N_0}{N} = \int_0^t \frac{1}{D_R \cdot 10^{(T_R - T)/z}} \cdot dt \quad (2.23)$$

Del desarrollo de la Ecuación (2.23) se obtiene la expresión $\log \left(\frac{N_0}{N} \right)_f$. Posteriormente al realizar el recuento de esporas viables (N) una vez aplicado el tratamiento térmico y conociendo N_0 que corresponde al recuento inicial de esporas contenidas en las BIU se obtiene el valor de la expresión $\log \left(\frac{N_0}{N} \right)_m$. Así se obtiene la siguiente Ecuación que representa la sumatoria de las diferencias al cuadrado del número de microorganismos predicho y experimental (SSQ):

$$SSQ = \sum_{i=1}^m \left[\log \left(\frac{N_0}{N} \right)_f - \log \left(\frac{N_0}{N} \right)_m \right]^2 \quad (2.24)$$

donde:

m número de repeticiones del proceso

$\left(\frac{N_0}{N} \right)_f$ Número predicho de microorganismos proporcionado por la Ecuación (2.23) en

$t = t_f$

$\left(\frac{N_0}{N} \right)_m$ Número de microorganismos medidos en $t = t_f$

t_f Tiempo total del proceso.

Por último los parámetros de resistencia térmica D_0 y z se obtienen cuando la variable SSQ de la Ecuación (2.24) resulta ser el menor valor.

Considerando la Ecuación (2.9) citada anteriormente, la Ecuación (2.24) puede ser reescrita como sigue:

$$SSQ = \sum_{i=1}^m [S_f - S_m]^2 \quad (2.25)$$

CONESA *et al.* (2003) mencionan que considerar condiciones no isotérmicas tiene como ventaja que la determinación de los parámetros de inactivación en condiciones en que los cambios de temperatura están en función del tiempo hace que el proceso de esterilización sea real, y también que haya una reducción en el esfuerzo experimental. Esto es de un solo experimento se puede obtener una cantidad importante de información ahorrando tiempo, materiales y costos.

Una desventaja de métodos no isotérmicos es su mayor complejidad en el cálculo.

3 MATERIAL Y METODO

La realización de la presente investigación relacionada con la determinación de los parámetros de resistencia térmica (D y z) del *Geobacillus stearothermophilus* para el cálculo y evaluación de procesos de esterilización de conservas de baja acidez, requirió del uso de conceptos y procedimientos microbiológicos, así como, de la teoría de inactivación por calor de microorganismos. La parte microbiológica experimental, incluida la confección de los capilares que contenían el Indicador Biológico (BI), se realizó en el Laboratorio del Ambiente de la Secretaría Regional Ministerial de Salud, Región de los Ríos. Los diferentes tratamientos térmicos aplicados a las BIU se llevaron a cabo en la Planta Piloto de Procesamiento de Alimentos del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile.

En la FIGURA 4 se muestra un esquema de la metodología seguida para alcanzar los objetivos.

3.1 Desarrollo experimental en laboratorio de microbiología

La metodología para esta etapa se basó según lo descrito por ALARCON (2008) y MARQUEZ (2008). El objetivo inicial fue confeccionar los capilares con un microorganismo esporulado termorresistente de ensayo no patógeno que contenga una determinada población inicial. Para este efecto se utilizó el bioindicador Sterikon® plus (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) que contiene esporas de *Geobacillus stearothermophilus* cepa ATCC 7953, disponible comercialmente para el control y verificación de la eficiencia de esterilización de autoclaves.

3.1.1 Preparación de la solución madre. Esta solución se preparó utilizando suspensiones de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 disponibles en ampollas de 2 mL (bioindicador Sterikon® plus). Las ampollas contienen además de las esporas citadas, caldo nutritivo, azúcar y púrpura de bromocresol como indicador de pH (FIGURA 5).

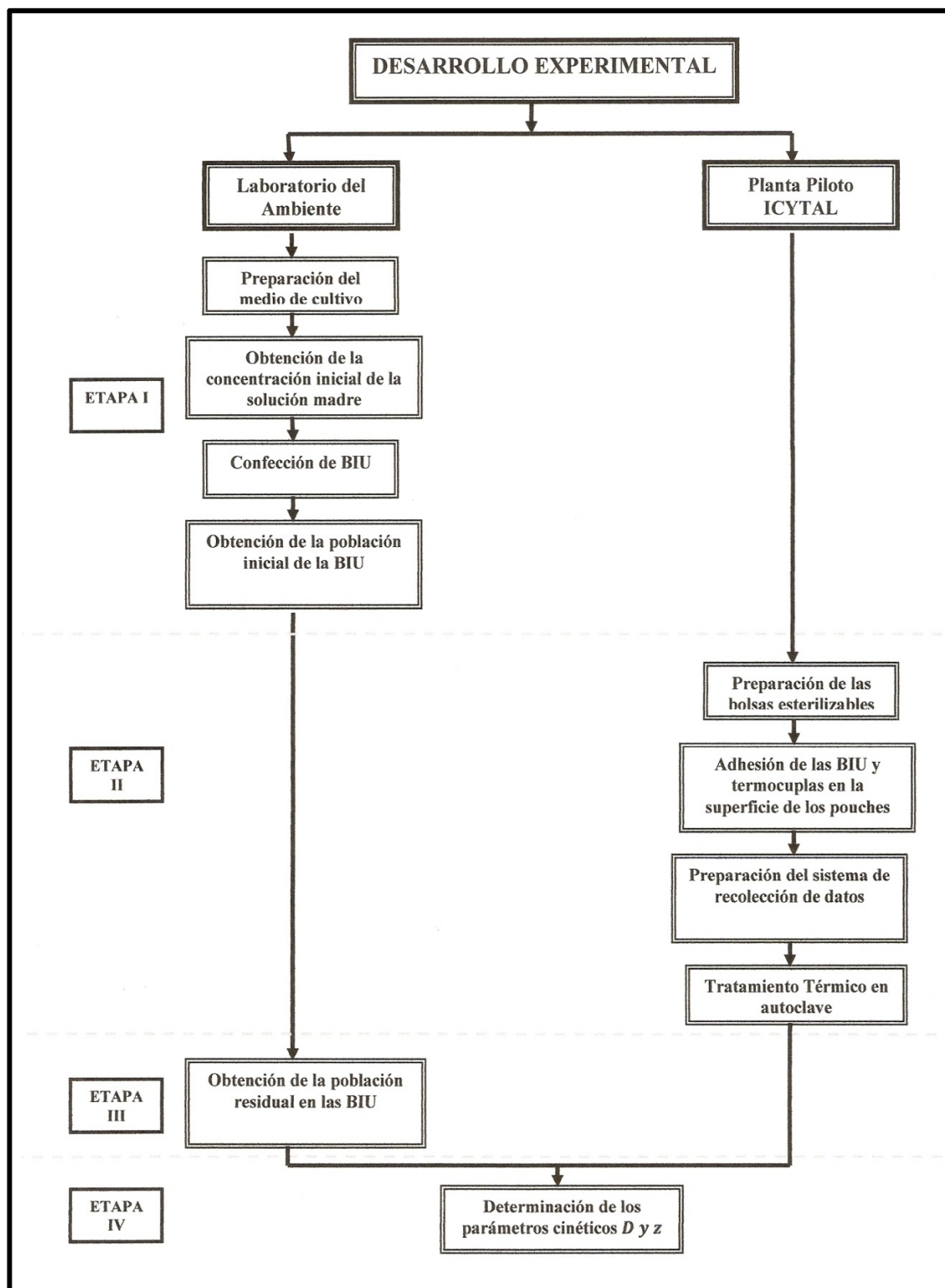


FIGURA 4 Esquema de desarrollo experimental para determinar los parámetros de resistencia térmica D_0 y z .



FIGURA 5 Bioindicador Sterikon® plus marca MERCK.

La concentración de esporas por ampolla que reporta el fabricante en la ficha técnica oscila entre 5×10^5 y 1×10^7 (esporas/2 mL), es decir, $2,5 \times 10^5$ y 5×10^6 esporas/mL. Considerando esta variabilidad se preparó, en un matraz erlenmeyer bajo condiciones asépticas, una solución madre de 6 mL utilizando 3 ampollas del bioindicador citado.

3.1.1.1 Determinación del pH de la solución madre. Para realizar la medición de pH del bioindicador Sterikon® plus (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se tomó una muestra de 3 mL de la solución madre vaciándose en un vaso precipitado, luego de una leve homogeneización se sumergió el electrodo del pHmetro WTW Modelo 330i (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GMBH, Germany) -previamente lavado con agua destilada- en la solución y una vez que la lectura se estabilizó se registró el valor. El valor de pH registrado fue 7,0 y fue utilizado como referencia para utilizar los parámetros de resistencia térmica del *G. stearothermophilus*. La medición se realizó tres veces.

3.1.1.2 Determinación de la concentración de esporas de la solución madre. Para los procedimientos microbiológicos experimentales se acondicionó el laboratorio para poder realizar el ensayo en condiciones asépticas, para ello se utilizó alcohol (70% v/v) con el objetivo de desinfectar los mesones de trabajo y se encendió luz UV durante una hora.

Para determinar la concentración de esporas de la solución madre primeramente se realizaron diluciones en buffer fosfato de hasta 10^{-6} y se tomaron 0,1 mL de las diluciones y se sembró en superficie sobre agar dextrosa caseína peptona por

triplicado (PARRA y ACOSTA, 1999). La metodología empleada se muestra esquemáticamente en la FIGURA 6.

El medio agar dextrosa caseína peptona cuya composición típica en *g/L* contiene peptona de caseína (10,0), D (+) glucosa (5,0), púrpura de bromocresol (0,04) y agar-agar (12,0) fue adquirido de Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Este medio es recomendado por MERCK (2007), para la identificación y la enumeración de especies de *Bacillus*, especialmente de bacterias productoras del “flat-sour” (agriado sin producción de gas o descomposición ácida) en alimentos comestibles.

MERCK (2007), señala que este medio cumple con las recomendaciones del NCA (National Canners Association) y el APHA (American Public Health Association) para la examinación de alimentos.

El medio se preparó con agua desionizada y el pH promedio del medio de cultivo fue de $6,878 \pm 0,06$. El pH recomendado por el fabricante es de $6,8 \pm 0,2$. El vertido en placa se realizó bajo condiciones asépticas con una temperatura del agar de 45 ± 2 °C para facilitar la operación.

Con respecto al buffer fosfato utilizado para las diluciones, este fue preparado a partir de una solución stock que contenía: fosfato monopotásico KH_2PO_4 (34 g) y agua destilada (500 mL). El pH debió ajustarse a 7,2 y para ello se utilizó NaOH 1N. Posteriormente se debió esterilizar en autoclave a 121,1 °C.

Las placas se incubaron por un período de 48 horas en una incubadora modelo ZRD-5055 (Tempra, Buenos Aires, Argentina) programada a 60 °C (FIGURA 7a). Para evitar la deshidratación del agar dextrosa caseína peptona se utilizaron bolsas plásticas donde fueron introducidas las placas.

Para realizar el recuento de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* una vez finalizado el período de incubación se utilizó un contador de colonias Bantex Modelo 900A (American Bantex Co., Burlingame, CA, USA) (FIGURA 7b).

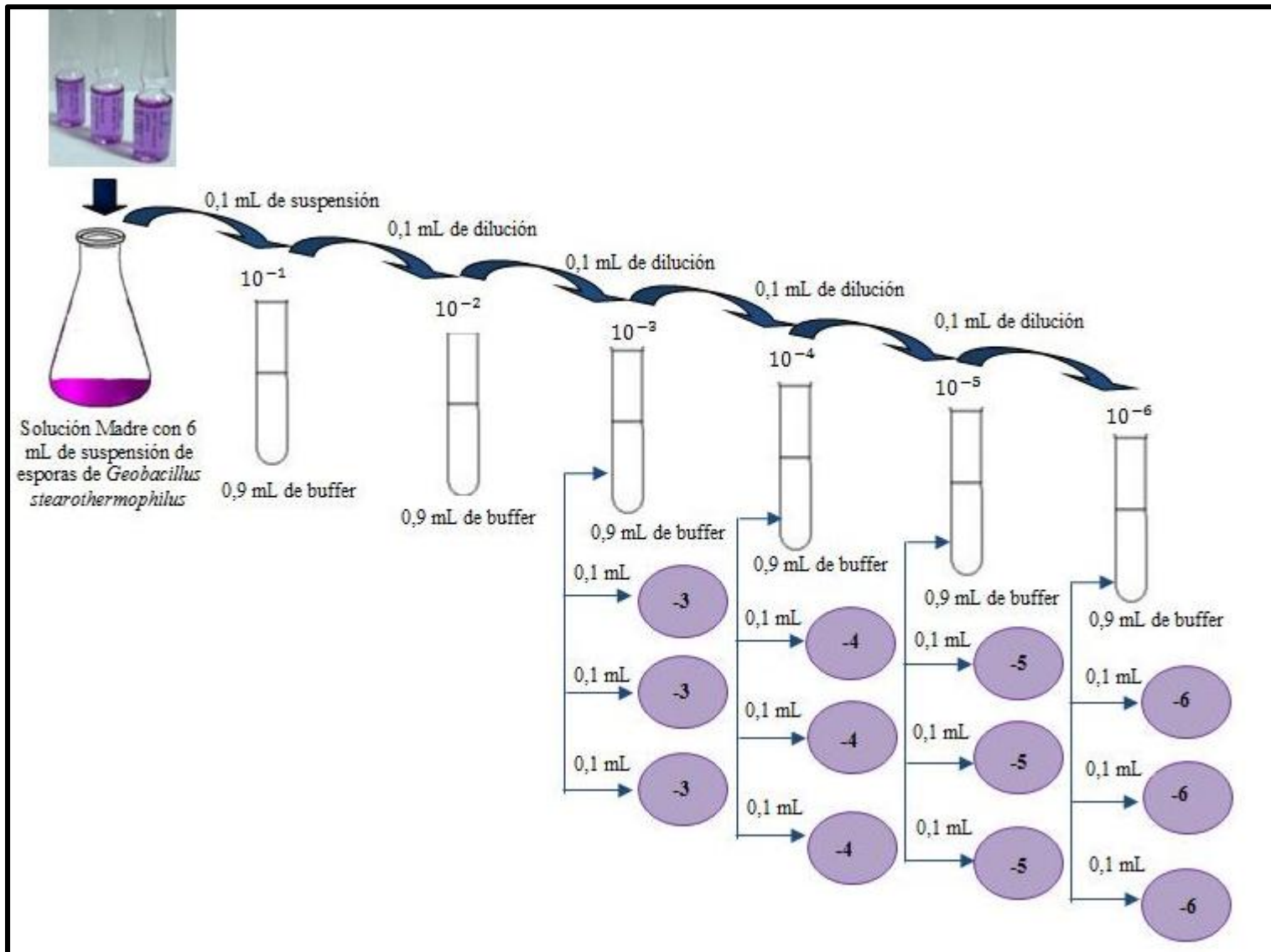


FIGURA 6 Esquema de siembra para obtener la concentración de la solución madre



FIGURA 7 Equipamiento utilizado en el Laboratorio del Ambiente de la Seremi de Salud de la Región de los Ríos.

Las colonias que se identificaron típicas de agriado y sin producción de gas o descomposición ácida (flat-sour) de *Geobacillus stearothermophilus* corresponden a colonias planas, con borde liso, de 2-3 mm de diámetro, con un punto opaco central y por lo general rodeadas por una zona amarilla (FIGURA 8).

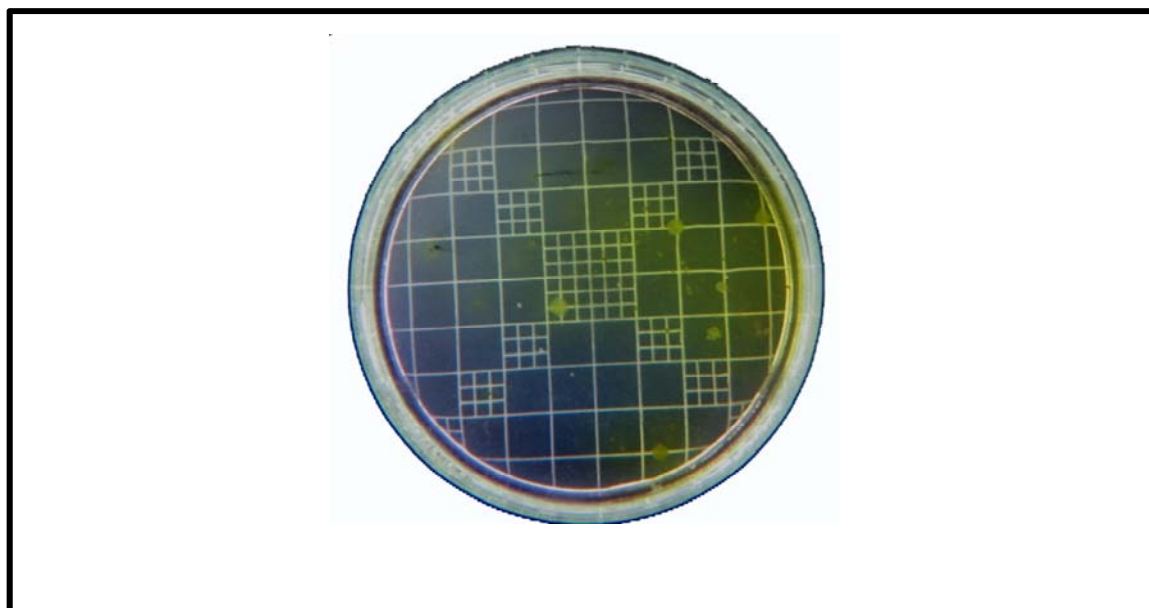


FIGURA 8 Colonias típicas de *Geobacillus stearothermophilus* sobre agar dextrosa caseína peptona.

3.1.2 Confección de Unidades Indicadoras Biológicas (BIU). Bajo condiciones asépticas se cortó la punta de una pipeta Pasteur de cristal de roca de 9" de longitud

(Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Alemania) (FIGURA 9) y utilizando una micropipeta Socorex modelo Calibra® digital 822 (Socorex ISBA., Ecublens, Suiza) se transfirió una alícuota de 40 μL de la solución madre previamente homogeneizada. Una vez realizado lo anterior, se procedió a sellar por calor ambos extremos abiertos utilizando un mechero Bunsen a gas propano VWR® (VWR International Ltda. Leicestershire, Inglaterra). De esta forma se obtuvo un capilar (BIU) de aproximadamente 6,5 cm de largo, con un diámetro interno de 0,90 mm y diámetro externo de 1,35 mm. (FIGURA 10).

Las BIU fabricadas se almacenaron a una temperatura de 4 ± 2 °C hasta su utilización en las experiencias de acuerdo a lo indicado en la Ficha Técnica del bioindicador Sterikon® plus.



FIGURA 9 Pipetas Pasteur HIRSCHMANN® LABORGERÄTE.



FIGURA 10 BIU elaboradas con suspensión de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.

3.1.2.1 Determinación de la población inicial de las Unidades Indicadoras Biológicas (BIU). Del lote de unidades indicadoras biológicas (BIU) fabricadas se eligieron algunas al azar y se sembraron en superficie por triplicado sobre agar dextrosa caseína peptona según la metodología mostrada en la FIGURA 11. La incubación se realizó según lo descrito anteriormente en la sección 3.1.1.2.

Este procedimiento fue de gran importancia porque se debió determinar con exactitud la población inicial (N_0) de la BIU para poder establecer la reducción de los ciclos logarítmicos deseados y lograr el factor de seguridad requerido para el proceso de esterilización.

3.1.2.2 Recuento de la cantidad de esporas contenidas en las BIU después del tratamiento térmico. Una vez finalizado el tratamiento térmico correspondiente, se procedió a retirar las BIU adheridas a la superficie de las bolsas esterilizables, tres por cada bolsa. Posteriormente, se realizó un recuento de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* sobrevivientes al tratamiento térmico.

De acuerdo a la población final predicha se realizó dos tipos de siembra una en forma directa como se observa en la FIGURA 12, y otra a través de diluciones para facilitar la lectura de la placa como se ve en la FIGURA 13. Ambas siembras se realizaron en

superficie sobre placas con agar dextrosa caseína peptona y fueron incubadas a 60 °C durante 48 horas repitiendo los procedimientos descritos anteriormente en la sección 3.1.1.2. La cantidad de esporas sobrevivientes obtenidas después del tratamiento térmico correspondieron al valor N_f reportado en resultados.

3.2 Desarrollo experimental en Planta Piloto

Esta etapa consistió principalmente en la realización de las experiencias de tratamientos térmicos en autoclave y el monitoreo de las temperaturas respectivas para la evaluación de la cinética de inactivación por calor del *Geobacillus stearothermophilus*. La metodología experimental utilizada se basó en los trabajos de PEREZ (2007), NAVARRO (2007), ALARCÓN (2008) y MÁRQUEZ (2008).

3.2.1 Preparación del “carrier” de las BIU. De acuerdo a las experiencias de ALARCÓN (2008) y MARQUEZ (2008) en la práctica es difícil insertar las BIU en el punto más frío de un alimento de forma irregular compleja, más aun cuando existen condiciones de borde asimétricas durante la transferencia de calor. Por esta razón, en la presente investigación las BIU fueron adheridas a la superficie de cada bolsa esterilizable.

Se utilizaron planchas de cobre de dimensiones similares a porciones de filetes de pescado para emular a dicho producto y facilitar las experiencias. El empleo de cobre como material de prueba para los ensayos de transferencia de calor transiente se debe a que permite que la temperatura solo sea función del tiempo de proceso y no de la ubicación en el interior del producto (PEREZ, 2007; ACEVEDO, 2008).

Las bolsas flexibles esterilizables de tamaño individual, suministrados por ALUSA (Santiago, Chile), conteniendo planchas de cobre fueron selladas bajo vacío, 0,1 MPa (750 mmHg) por un tiempo de 40 segundos, mediante la envasadora Plaspak Modelo KVP-650T (Plaspak Maquinarias Ltda., Santiago, Chile) (FIGURA 14). Finalmente, los sistemas cobre-bolsa esterilizable fueron utilizados como vehículo (“carrier”) de las BIU para que puedan ser sometidos a los tratamientos térmicos en forma apropiada. Para el registro de temperaturas durante el tratamiento térmico se colocaron termocuplas en la superficie de la bolsa esterilizable. (FIGURA 15).

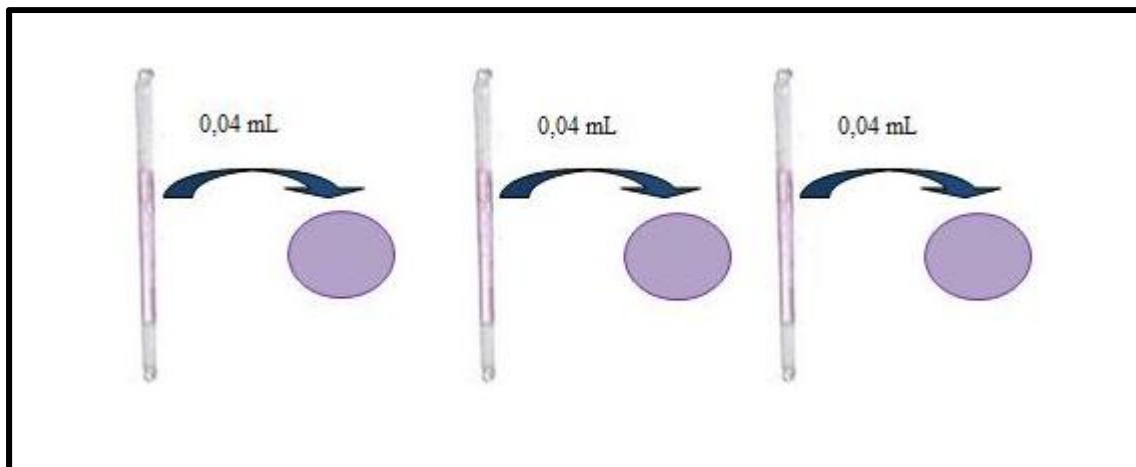


FIGURA 12 Esquema de siembra directa de las BIU después del tratamiento térmico aplicado.

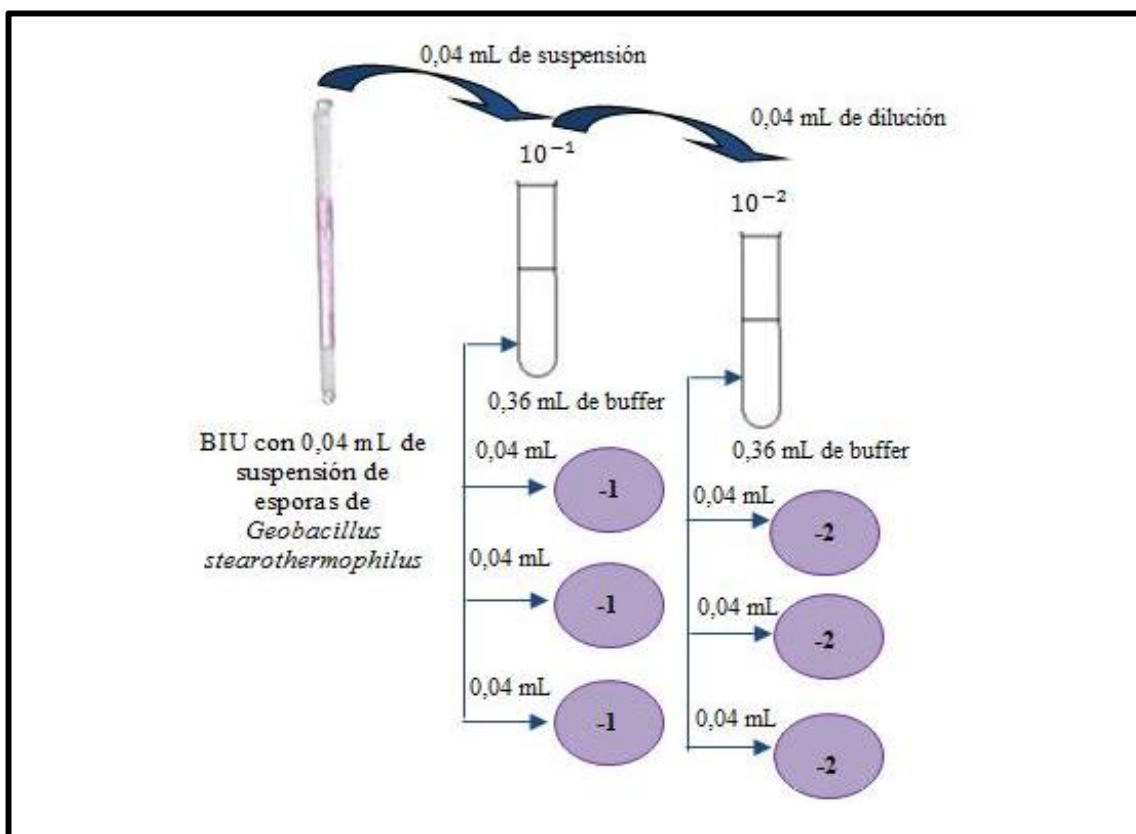


FIGURA 13 Esquema de siembra mediante diluciones de las BIU después del tratamiento térmico aplicado.



FIGURA 14 Selladora al vacío Plaspak Modelo KVP-650T.

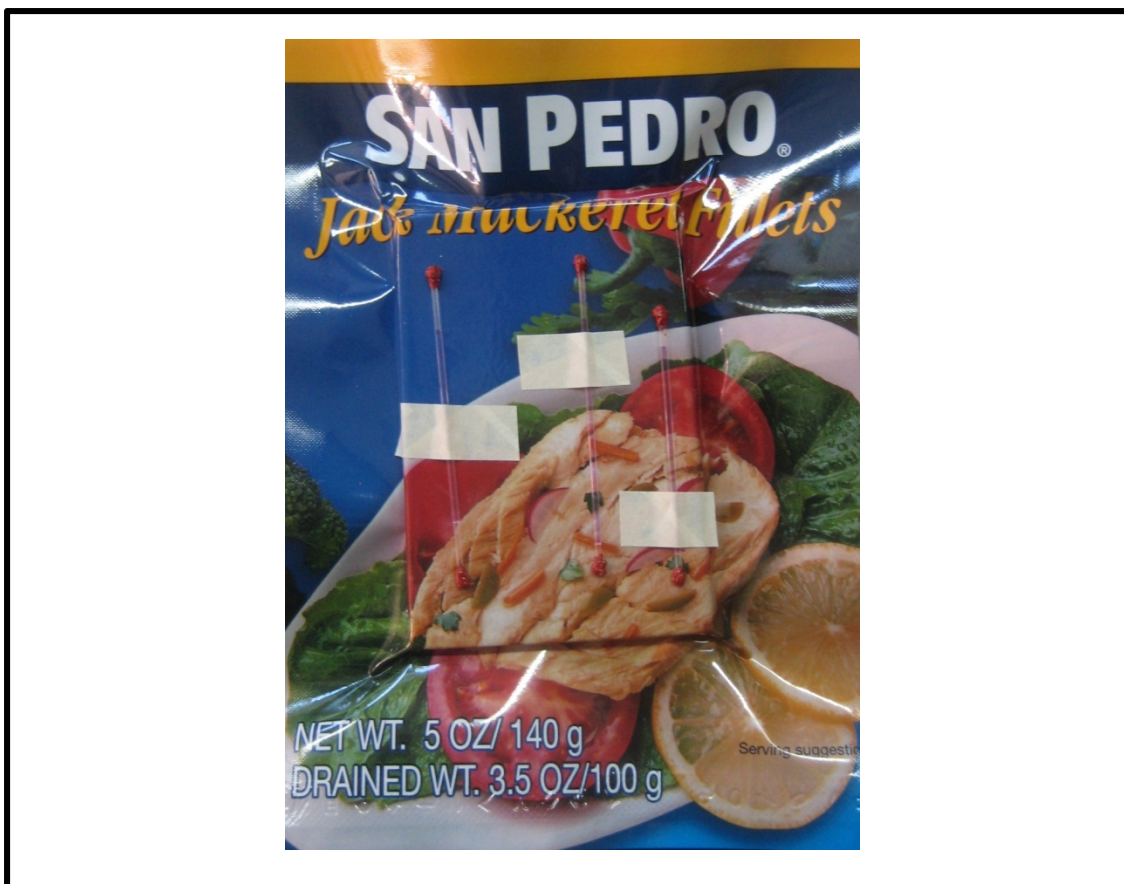


FIGURA 15 Bolsa esterilizable con BIU adheridas a la superficie.

3.2.2 Preparación del sistema de adquisición de datos tiempo-temperatura. Se utilizaron termocuplas, un registrador de temperaturas (data logger) y un computador portátil para la captura de datos tiempo-temperatura (FIGURA 16). Las termocuplas utilizadas para la medición de temperaturas fueron del tipo T (cobre-constantán) flexibles Kapton® calibre 30 (Cole Parmer Instruments Co., Vernon Hills, Illinois U.S.A.) (FIGURA 16a) cuyas especificaciones técnicas se detallan en el CUADRO 4. Las termocuplas fueron conectadas mediante alargadores para termocuplas tipo T calibre 20 (FIGURA 16b) (Cole Parmer Instruments Co., Vernon Hills, Illinois, U.S.A.) a un registrador de temperatura (data logger) de 12 canales *Digi-Sense®* modelo 92000-05, “12- Channel Scanning Thermocouple Thermometer” (FIGURA 16c) (Cole Parmer Instruments Co., Vernon Hills, Illinois U.S.A.).

CUADRO 4 Especificaciones técnicas de las termocuplas kapton ®

Especificación	Ítem
Tipo	T
Rango de Temperatura	-418 a 759 °F (-250 a 404 °C)
Diámetro	0,010 “ (0,508 mm)
Longitud de cable	5 ft (1,524 m)
Conexiones	Miniconector
Empalme	Expuesto
Constante de tiempo	0,1 s
Tiempo de respuesta	0,5 s

FUENTE: Catálogo Cole Parmer (2005/06)⁷.

Las termocuplas conectadas a los canales respectivos del data logger fueron calibradas mediante el método de puntos fijos, que consiste en sumergir las termocuplas en agua destilada en ebullición (100 °C), y luego en una mezcla de agua destilada y hielo (0 °C) en condiciones de presión atmosférica correspondiente a nivel del mar (NICHOLAS y WHITE, 1994). El procedimiento de calibración se realizó previo a cada ensayo.

⁷ REICHMANN W. y CIA. Ltda. 2005-2006. Catálogo Cole-Parmer

Para la captura de datos, el data logger, conectado a través del puerto serial RS-232, a un computador portátil Acer TravelMate 331T (Acer Inc. USA) (FIGURA 16d) con Sistema Operativo Microsoft Windows® XP Profesional requirió además de la ejecución del software *ScanLink* 2.0 (EUTECH Instruments Pte Ltd., Singapur). Se configuró el sistema para registrar datos de temperatura en un intervalo de tiempo de 8 segundos.

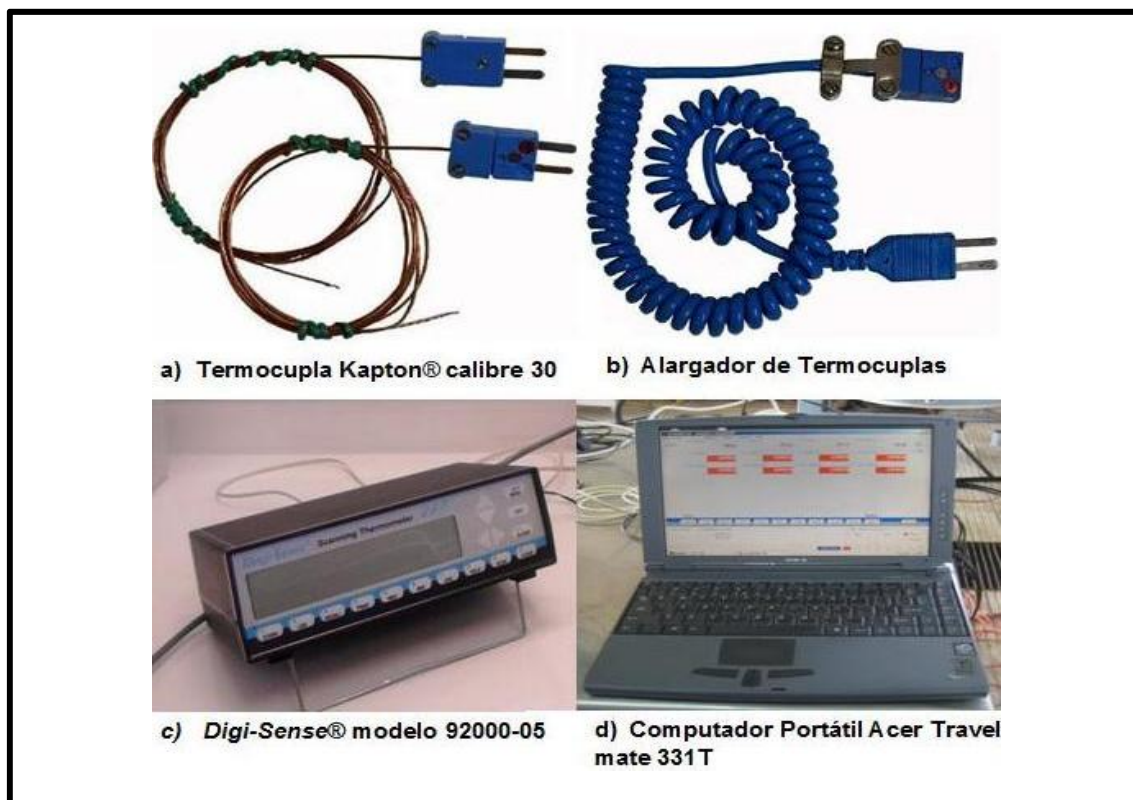


FIGURA 16 Equipamiento utilizado para medición de temperaturas.

3.2.3 Experiencias de esterilización. Para esta parte se utilizó un autoclave vertical Dixie Canner Equipment modelo RDSW-3, (Dixie Canner Co., Georgia, U.S.A.) el cual cuenta con un sistema de medición de temperatura y presión. El manómetro USG, tiene un rango de presión de 0 a 60 psi y el termómetro TRERICE, con un rango de temperatura de 80 a 130 °C respectivamente. A demás se compone de un compresor Hydrovane 50 L, Modelo 550lpurs 10-2415D111 (Comp Air Hydrovane Ltda, Redditch, Reino Unido) y adaptador de bronce para la entrada de termocuplas al interior del autoclave. En la FIGURA 17 se muestran las partes que componen el sistema deesterilización descritas anteriormente.



FIGURA 17 Sistema de esterilización. Autoclave vertical DIXIE (1). Termómetro TRERICE (2). Manómetro USG (3). Adaptador de Bronce (4a y 4b). Compresor Hydrovane (5).

Para el correcto funcionamiento del sistema de esterilización se debió asegurar que la presión del suministro de vapor de caldera, al momento previo de los tratamientos térmicos, se encuentre en el rango de 90 a 100 psig (6,33 y 7,03 Kg_f /cm^2 man.), y la presión de carga del compresor cercano a 15 psig (1,05 Kg_f /cm^2 man.). Esto es de gran importancia para posteriormente suministrar el aire comprimido que permitirá en la etapa correspondiente al enfriamiento impedir que las presiones de vapor interna decaigan bruscamente y deformen o hagan estallar el envase (MITCHEL, 2002).

En base a los trabajos de ALARCÓN (2008) y MÁRQUEZ (2008) se establecieron las condiciones de operación de los tratamientos térmicos aplicados (CUADRO 5). La temperatura de autoclave empleada fue de $116 \pm 0,5$ °C correspondiente a una presión manométrica de 0,750 bar (10,67 psi). En las experiencias la sobrepresión se aplicó inmediatamente después del CUT alcanzando una presión manométrica de 1,103 bar (16 psig).

CUADRO 5 Tratamientos térmicos aplicados en el autoclave.

Tratamiento	CUT (min)	Tiempo de Operador (min)
TT1	4 – 8	~ 8,5
TT2	4 – 8	~ 12,0
TT3	4 – 8	~ 17,0
TT4	4 – 8	~ 22,5

3.3 Determinación de la influencia de la BIU en la distribución de temperatura durante el tratamiento térmico. Se realizó para determinar si el material con el que está fabricado la BIU en este caso vidrio borosilicato presenta algún tipo de resistencia térmica frente a la velocidad de penetración de calor.

Para llevar a cabo este ítem se realizaron mediciones colocando una termocupla en el interior (FIGURA 18A) y exterior de la BIU (FIGURA 18B) y se registraron experimentalmente los perfiles de temperatura.

Posteriormente el resultado fue expresado mediante el valor RMSE (Root Mean Square Error, Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio), el cual puede ser presentado en forma absoluta (°C) o en porcentaje (%) como sigue:

$$RMSE (^{\circ}C) = \sqrt{\frac{\sum_i^n (T_i - T_i^*)^2}{N}} \quad (3.1)$$

$$RMSE (^{\circ}C) = \sqrt{\frac{\sum_i^n \left[\frac{(T_i - T_i^*)}{T_i} \right]^2}{N}} \quad (3.2)$$

donde N es el número total de puntos o número total de temperaturas experimentales, T_i son las temperaturas experimentales al exterior de la BIU y T_i^* son las temperaturas experimentales en el interior de la BIU.

El criterio adoptado fue de un valor máximo de 5% para el valor de RMSE (%) (CALIFANO, 1981; CLELAND y EARLE, 1984; ZHANG y CAVALIERI, 1991; MORALES – BLANCAS *et al.*, 1999).

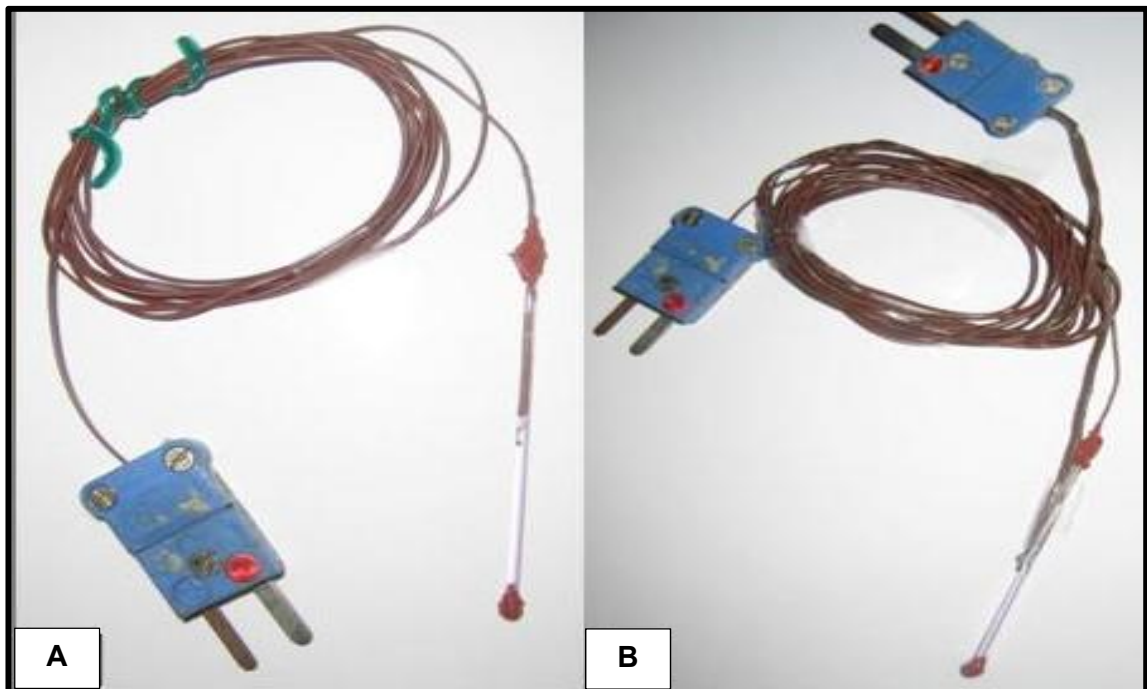


FIGURA 18 Termocuplas al interior y exterior de la BIU.

3.4 Determinación de los parámetros de resistencia térmica D_0 y z

Dado que los perfiles de temperaturas obtenidos para cada BIU una vez sometidas al tratamiento térmico, mostraron un periodo de calentamiento transiente seguido de un periodo de calentamiento a temperatura constante, y finalmente de una etapa de enfriamiento transiente se utilizó el método no isotérmico para la determinación de los parámetros de resistencia térmica D_0 y z descrito en la sección 2.5.2.

La aplicación del método no isotérmico requirió de la suposición de valores iniciales de D_0 (1,5 min) y z (8,0 °C), luego en conjunto con los datos tiempo-temperatura se evaluó el lado derecho de la Ecuación (2.23) obteniéndose el número de reducciones decimales predicho (S_f). El proceso cálculo iterativo señalado se aplicó para el rango de los valores de D_0 entre 1,5 y 2 min, el cual es reportado por el fabricante de las ampollas del bioindicador Sterikon® plus (MERCK, 2007). Para el caso del valor z el rango utilizado fue entre 8 y 9 °C según lo reportado en la bibliografía especializada para la cepa de *G. Stearothermophilus* ATCC 7953 y tomando como base los trabajos previos de ALARCÓN (2008) y MÁRQUEZ (2008).

Posteriormente se determinó el valor de S_m utilizando la concentración inicial de las BIU (N_0) y el número de microorganismos sobrevivientes (N) para cada tratamiento térmico realizado. Finalmente los valores de D_0 y z finales se obtuvieron cuando, al aplicar la Ecuación (2.25), la sumatoria de las diferencias de las reducciones decimales predicha (S_f) y experimental (S_m) al cuadrado correspondiera al menor valor posible.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados del estudio conducente a la determinación de los parámetros de resistencia térmica D_0 y z del *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 utilizando las Unidades Indicadoras Biológicas (BIU) y el método de calentamiento no isotérmico.

4.1 Concentración de la solución madre y concentración inicial de las BIU

El promedio de la concentración de *G. stearothermophilus* de la solución madre fue de $5,05 \times 10^5 \pm 1,26 \times 10^5$ ufc/mL, por lo tanto cada ampolla de 2 mL tuvo una concentración de $1,01 \times 10^6 \pm 0,25 \times 10^6$ ufc/ampolla. Esta concentración está dentro del rango $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ esporas/ampolla, señalado por el fabricante en la ficha técnica de los bioindicadores Sterikon® plus (MERCK, 2007).

Los resultados de los recuentos de la solución madre y de las BIU se detallan en los CUADROS 6 y 7 respectivamente. A partir de la solución madre se debió extraer 0,04 mL (40 μ L) para poder fabricar las BIU según la metodología descrita en la sección (3.1.2). El promedio del recuento inicial de las BIU fabricadas fue de $6,345 \times 10^5 \pm 1,60 \times 10^5$ ufc/mL ($2,52 \times 10^4 \pm 0,61 \times 10^4$ ufc/BIU).

Como se puede observar la concentración inicial de la BIU es mayor a la de la solución madre por lo que resulta necesario analizar si la diferencia existente entre ambas concentraciones pudiese posteriormente afectar los resultados, es por esta razón que se realizó un análisis estadístico utilizando el software STATGRAPHICS PLUS 5.1 (STATPOINT TECHNOLOGIES, INC, Virginia, USA) y a través del t-test se efectuó una comparación de ambas concentraciones obteniendo como resultado que no hay diferencia significativa para un $p < 0,05$.

4.2 Estudio de la influencia de las BIU en la distribución de temperaturas durante el tratamiento térmico

En las FIGURA 19 se presentan las curvas experimentales para las termocuplas localizadas en el interior y exterior de las BIU para los tres ensayos realizados. El CUT y el tiempo de operador son diferentes para cada ensayo.

En la citada figura se puede observar la superposición visual de los perfiles de temperatura interior y exterior de la BIU. Los valores de RMSE expresados tanto en unidades de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) como en porcentaje (%), considerando solamente las temperaturas con importancia letal ($T > 100^{\circ}\text{C}$), que se muestran en el CUADRO 8 confirma que la diferencia entre los perfiles de temperatura correspondiente al interior y exterior de la BIU es prácticamente despreciable por lo que se puede aseverar que el material de la BIU (vidrio borosilicato) no constituyó una resistencia adicional a la penetración de calor durante el tratamiento térmico.

CUADRO 6 Recuentos (ufc/ mL) obtenidos para la solución madre.

Ensayo	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	
1	$4,5 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^5$
2	$5,9 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^5$
3	$8,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$
4	$3,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$

CUADRO 7 Recuentos iniciales (ufc/mL) obtenidos para las BIU.

BIU	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	
1	$6,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5$
2	$4,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$
3	$7,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$8,7 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^5$
4	$1,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5 \pm 4,1 \times 10^5$

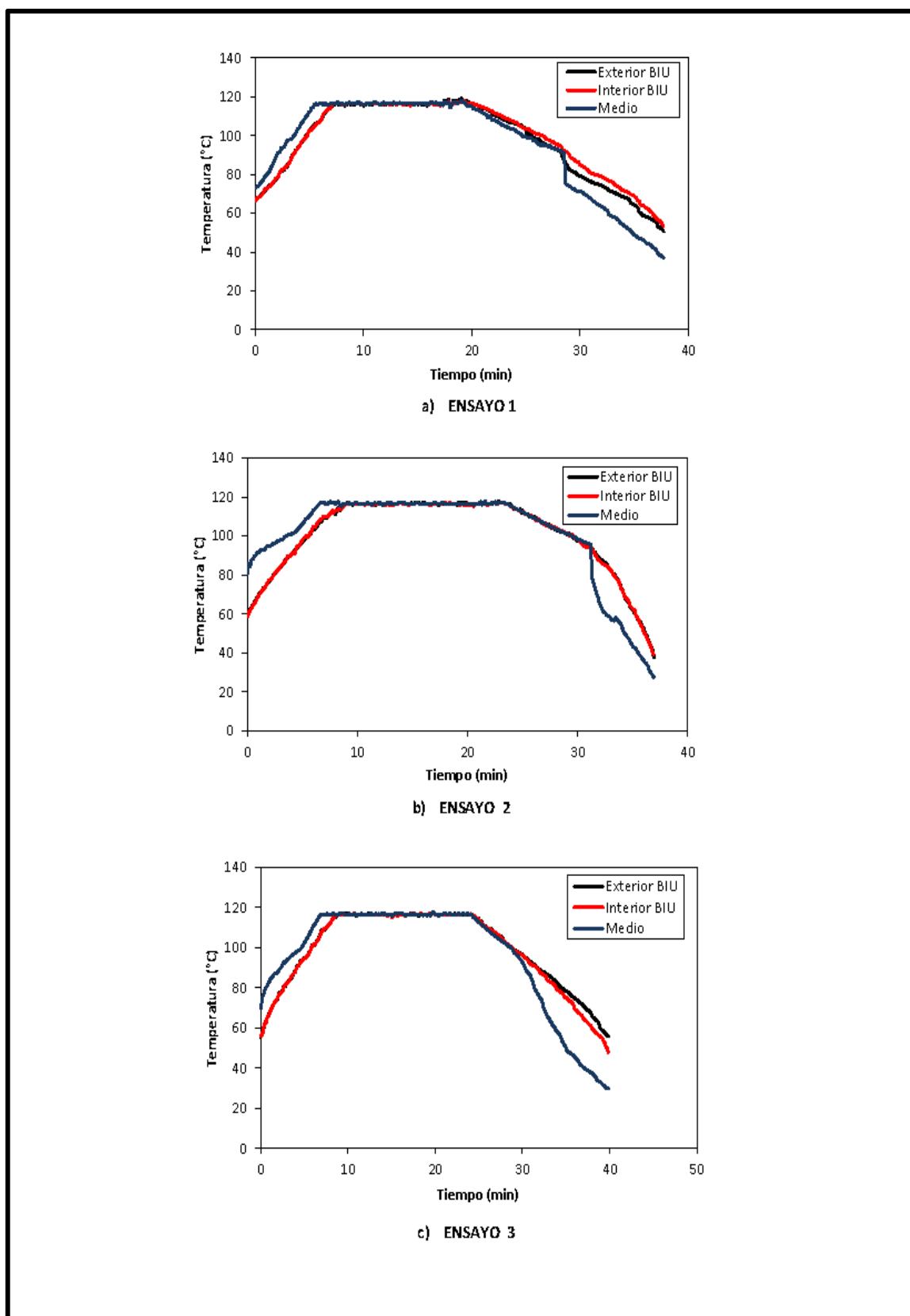


FIGURA 19 Perfiles de temperaturas de las termocuplas ubicadas al exterior e interior de la BIU.

En el CUADRO 9 se presentan los valores de F_0 y S , calculados a partir de los perfiles de temperatura correspondiente a las termocupas ubicadas en el exterior e interior de las BIU. Se puede observar que la diferencia relativa (%) no sobrepasa el 2,8%, y en este contexto y por lo señalado en el párrafo anterior, se puede considerar que el valor esterilizante o letalidad del tratamiento térmico, expresado como el número de ciclos logarítmicos reducidos (S) en la BIU, no se vio afectado por el material y el tamaño de la BIU.

CUADRO 8 Valores de RMSE considerando temperaturas exterior e interior del BIU con importancia letal ($T > 100$ °C).

Ensayo	Calentamiento		Enfriamiento	
	%	°C	%	°C
1	0,415	0,484	0,971	1,013
2	0,476	0,523	0,573	0,604
3	0,261	0,297	0,256	0,278

CUADRO 9 Valores de F_0 y S obtenidos para los datos tiempo-temperatura de las BIU

Ensayo	Ubicación termocupla en la BIU	F_0 (min)	S	Diferencia Relativa (%)
1	Exterior	4,56	2,68	
	Interior	4,53	2,66	0,66
2	Exterior	5,16	3,03	
	Interior	5,02	2,95	2,79
3	Exterior	5,01	2,95	
	Interior	4,98	2,93	0,60

4.3 Recuento de esporas después del tratamiento térmico aplicado

Para obtener el recuento de los microorganismos sobrevivientes en las BIU después de cada tratamiento térmico aplicado se siguió la metodología descrita en la sección 3.1.2.2. Previamente, se realizaron ensayos preliminares de siembra de la suspensión contenidas en las BIU (40 μL) para un mejor recuento de los microorganismos. Así, se optó por realizar una siembra directa con aquellas BIU donde las poblaciones finales estimadas oscilarían entre 10^1 y 10^2 ufc/mL , y para las poblaciones finales que oscilarían entre 10^3 y 10^4 ufc/mL se procedió a realizar diluciones de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.1.2.2.

En el CUADRO 10 se muestran los recuentos de microorganismos sobrevivientes (N_f) para cada tratamiento, expresado en unidades formadoras de colonias (ufc), así como el número de reducciones decimales experimental (S_m) y predicho (S_f). Para el cálculo del número de reducción decimal (S_m) se consideró una población inicial (N_0) de $6,345 \times 10^5$ ufc/mL junto con los N_f mencionados anteriormente, luego, el cálculo del número de reducción decimal predicho (S_f) se aplicó la Ecuación (2.23) a cada perfil de temperatura experimental correspondiente a cada tratamiento térmico.

En las FIGURAS 20 y 21 se muestran ejemplos de las placas conteniendo los microorganismos sobrevivientes de *G. stearothermophilus* obtenidos para los tratamientos térmicos aplicados.

4.4 Determinación de los parámetros de resistencia térmica D_0 y z

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.4, en el CUADRO 10 se muestran los valores del número de reducciones decimales predichos (S_f) y experimentales (S_m) para cada ensayo realizado. Sobre dichos resultados se aplicó la Ecuación (2.25) reportándose en el ANEXO 4 el detalle agrupado de los valores de $\sum(S_f - S_m)^2$, denotado como SSQ, por tratamiento (SSQTT1, SSQTT2, SSQTT3, SSQTT4), y para todos los tratamientos (SSQTTm). Los resultados obtenidos corresponden a todos los valores de D_0 y z considerados ($1,5 \leq D_0 \leq 2,0$; $8,0 \leq z \leq 9,0$ $^{\circ}\text{C}$).

CUADRO 10 Número de microorganismos sobrevivientes (N_f), número de reducción decimal experimental (S_m) y predicho (S_f) para los tratamientos térmicos aplicados.

Tratamiento	Ensayo	Cut (min)	Tiempo de operador (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	$N_f(ufc/mL)$	S_m	S_f
TT1	1	6	8,53	5,37	$1,00 \times 10^4$	1,80	1,58
	2	6	8,53	5,37	$1,00 \times 10^4$	1,80	1,58
	3	6	8,53	5,37	$1,00 \times 10^4$	1,80	1,58
	4	4,4	8,67	2,83	$1,00 \times 10^4$	1,80	1,54
	5	4,4	8,67	2,83	$1,08 \times 10^4$	1,77	1,54
	6	4,4	8,67	2,83	$1,00 \times 10^4$	1,80	1,54
	7	4,4	8,67	2,83	$1,02 \times 10^4$	1,79	1,63
	8	4,4	8,67	2,83	$1,00 \times 10^4$	1,80	1,63
	9	4,4	8,67	2,83	$1,00 \times 10^4$	1,80	1,63
TT2	10	7,60	12,00	3,7	$2,50 \times 10^3$	2,40	2,38
	11	7,60	12,00	3,7	$2,50 \times 10^3$	2,40	2,38
	12	7,60	12,00	3,7	$2,50 \times 10^3$	2,40	2,38
	13	7,60	12,00	3,7	$2,50 \times 10^3$	2,40	2,43
	14	7,60	12,00	3,7	$3,00 \times 10^3$	2,32	2,43
	15	7,60	12,00	3,7	$2,00 \times 10^3$	2,50	2,43
	16	5,20	12,90	2,67	$2,25 \times 10^3$	2,45	2,44
	17	5,20	12,90	2,67	$2,00 \times 10^3$	2,50	2,44
	18	5,20	12,90	2,67	$2,50 \times 10^3$	2,40	2,44

CUADRO 10 Número de microorganismos sobrevivientes (N_f), número de reducción decimal experimental (S_m) y predicho (S_f) para los tratamientos térmicos aplicados (continuación).

Tratamiento	Ensayo	Cut (min)	Tiempo de operador (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	$N_f(ufc/mL)$	S_m	S_f
TT3	19	4,80	17,30	2,6	$3,00 \times 10^2$	3,32	3,27
	20	4,80	17,30	2,6	$4,25 \times 10^2$	3,17	3,27
	21	4,80	17,30	2,6	$4,25 \times 10^2$	3,17	3,27
	22	4,80	17,30	2,6	$6,00 \times 10^2$	3,02	3,27
	23	4,80	17,30	2,6	$5,50 \times 10^2$	3,06	3,27
	24	4,80	17,30	2,6	$5,75 \times 10^2$	3,04	3,27
	25	8,13	17,60	5,3	$4,25 \times 10^2$	3,17	3,54
	26	8,13	17,60	5,3	$4,75 \times 10^2$	3,12	3,54
	27	8,13	17,60	5,3	$5,00 \times 10^2$	3,10	3,54
TT4	28	4,67	22,53	2,9	$5,00 \times 10^1$	4,10	4,13
	29	4,67	22,53	2,9	$5,00 \times 10^1$	4,10	4,13
	30	4,67	22,53	2,9	$2,50 \times 10^1$	4,40	4,13
	31	4,67	22,53	2,9	$2,50 \times 10^1$	4,40	4,05
	32	4,67	22,53	2,9	$2,50 \times 10^1$	4,40	4,05
	33	4,67	22,53	2,9	$2,50 \times 10^1$	4,40	4,05
	34	6,27	22,67	2,7	$7,50 \times 10^1$	3,93	4,06
	35	6,27	22,67	2,7	$2,50 \times 10^1$	4,40	4,06
	36	6,27	22,67	2,7	$7,50 \times 10^1$	3,93	4,06

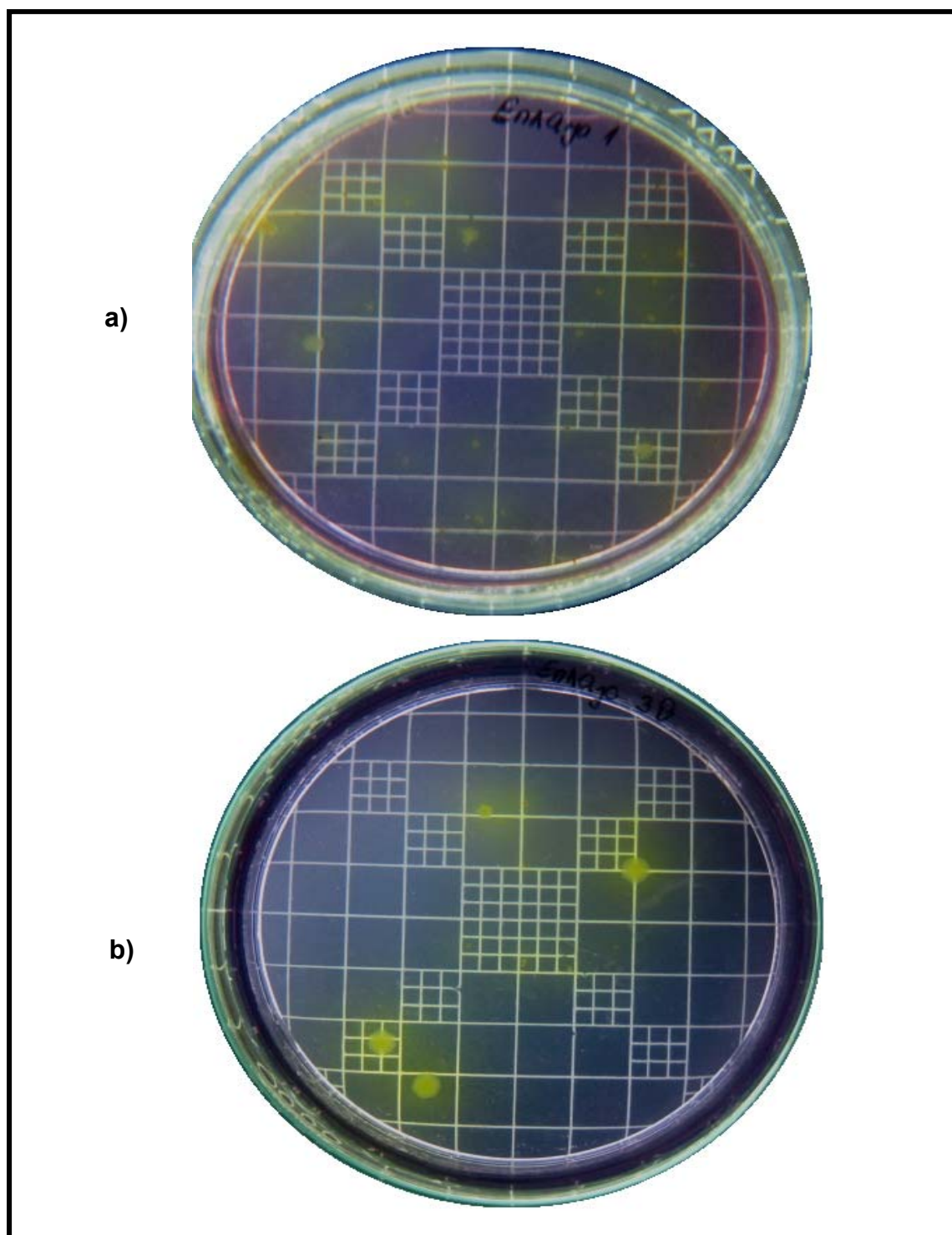


FIGURA 20 Microorganismos sobrevivientes de *G. stearothermophilus* obtenidos para los tratamientos térmicos TT1 (a) y TT2 (b).

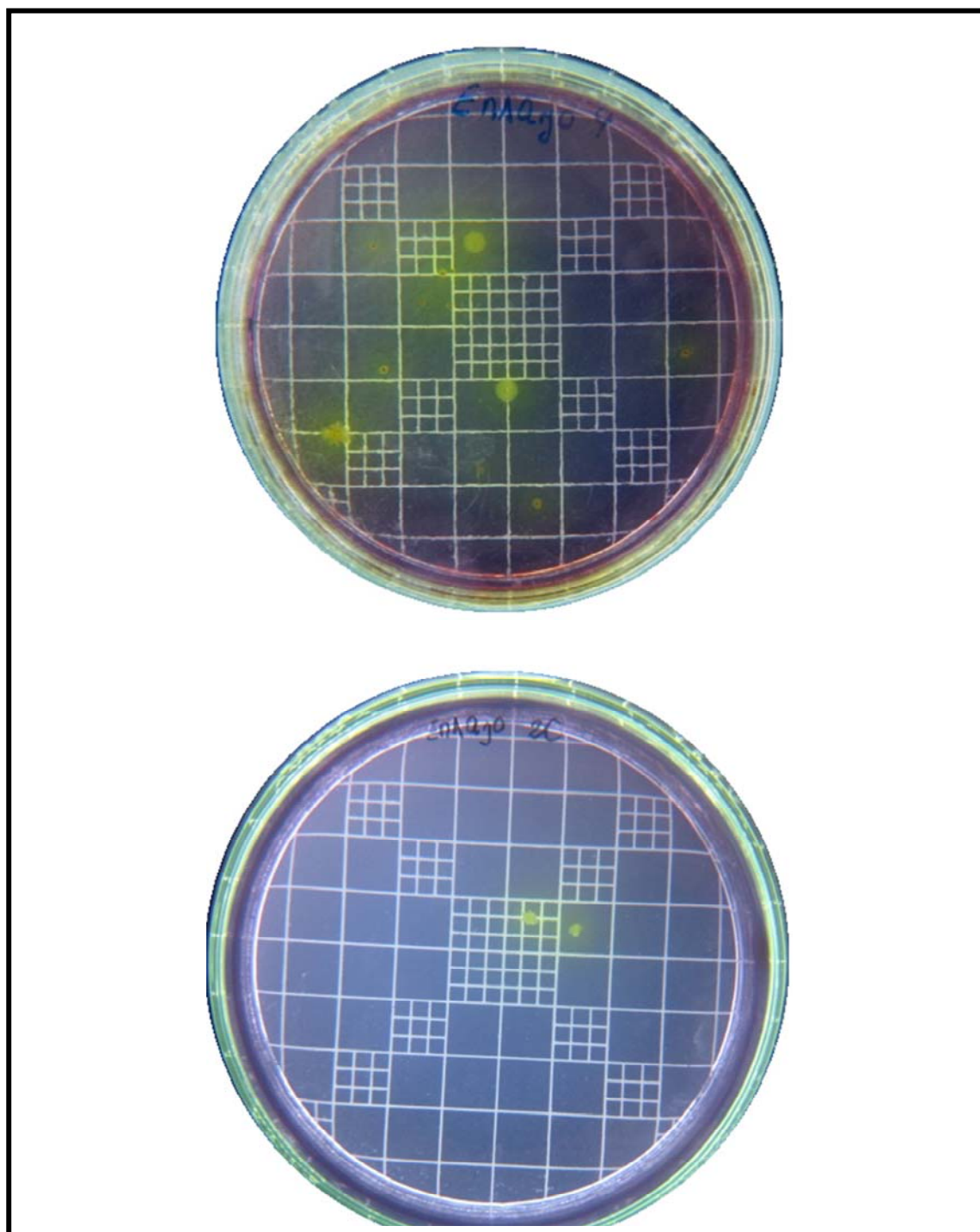


FIGURA 21 Microorganismos sobrevivientes de *G. stearotherophilus* obtenidos para los tratamientos térmicos TT3 (a) y TT4 (b).

En el CUADRO 11 se muestran el menor valor de SSQ para cada tratamiento y para todos los tratamientos SSQm. Los parámetros de resistencia térmica buscados se determinan considerando el menor valor de SSQTTm. De esta manera los valores de D_0 y z , obtenidos fueron 1,7 min y 8,8 °C, respectivamente.

CUADRO 11 Valores mínimos de SSQ para los parámetros D_0 y z iterados.

D (min)	z (°C)	SSQTT1	SSQ TT2	SSQ TT3	SSQ TT4	SSQTTm
1,5	8	0,45785438	0,02538746	0,95666034	0,48899117	1,92889334
1,6	8,4	0,43375300	0,02392988	0,81585231	0,50082349	1,77435868
1,7	8,8	0,42209684	0,02370885	0,67504442	0,5292076	1,6500577
1,8	9	0,60543800	0,07880332	0,32347173	0,95086864	1,95858169
1,9	9	1,03808124	0,39008207	0,20898188	2,29833465	3,93547984
2	9	1,52877200	0,904431	0,55752202	4,18590546	7,17663048

Tomando en cuenta los valores de D_0 reportado en la literatura especializada (CUADRO 3), se puede decir que varían en un amplio rango, encontrándose que para la misma cepa estudiada (ATCC 7953) los valores D_0 oscilan entre 0,12 min y 14,2 min. En base a la evidencia empírica, la diferencia entre los valores de D_0 podría explicarse fundamentalmente por el sustrato empleado.

De acuerdo a lo observado en el CUADRO 11 podemos mencionar que el valor obtenido de $D_0 = 1,7 \text{ min}$ se encuentra dentro del rango establecido por el fabricante (MERCK, 2007) que señala que el valor D_0 del bioindicador (pH = 7,0) utilizado en este estudio debería oscilar entre 1,5 y 2 min. Al respecto, KOTZEKIDOU (2000), quien emplea buffer fosfato (pH = 7,0), reporta un valor de 2,1 min. Lo anterior correspondería a una diferencia de 23,5%. Al no conocer la metodología empleada por el citado autor se podría decir que la diferencia entre los valores de D_0 podría deberse al sustrato empleado en el bioindicador (Sección 3.1.1).

El valor D_0 tiene una importante incidencia a la hora de calcular la letalidad de un proceso térmico, expresado como un valor F requerido ($F_0 = S \cdot D_0$) para lograr un cierto número de reducciones decimales (S) de la población microbiana, lo que conllevaría a aumentar inequívocamente los tiempos de proceso para alcanzar dichas reducciones. Así, considerando el mismo valor de S , la diferencia que se obtendría al calcular el valor F requerido para un D_0 de 2,1 min comparado con el valor obtenido en el presente estudio (1,7 min) es de aproximadamente de un 23,5%. Este dato debe ser tomado en cuenta al optimizar los procesos térmicos para alcanzar la esterilidad comercial.

Con respecto al valor z para el *Geobacillus stearothermophilus* se puede decir que al igual que el valor D_0 , también está dentro del rango reportado en la literatura (CUADRO 3) para la misma cepa estudiada, ATCC 7953, siendo este rango de 5,7 a 23,7 °C, la diferencia se explicaría hasta el momento por el sustrato utilizado. KOTZEKIDOU (2000) reportó valores de z de 8,5 °C para la misma cepa empleando buffer fosfato (pH = 7).

Por otra parte, considerando otras cepas de *Geobacillus stearothermophilus* citadas en el CUADRO 2, se puede mencionar que siguen un comportamiento similar a lo descrito anteriormente. PERIAGO *et al.* (1998) reportaron un valor de $z = 8,5$ °C para el *Geobacillus stearothermophilus* cepa ATCC 12980, determinado, al igual que la presente investigación, bajo condiciones de calentamiento no isotérmicas. KOTZEKIDOU (2000) reportó valores de z de 8,9 °C para la cepa NCIB 8924. En este último caso el calentamiento fue realizado sobre sustrato buffer fosfato (pH = 7,0).

Tomando en consideración el F de proceso, la diferencia de valores F calculados para un z de 8,8 °C, obtenido en la presente investigación, comparado para un z de 8,5 °C reportado por KOTZEKIDOU (2000), para la misma cepa, se refleja en aproximadamente 3,46%, la cual puede considerarse despreciable para efectos prácticos. En consecuencia, se podría afirmar que los resultados de los trabajos de ALARCÓN (2008) y MÁRQUEZ (2008) pueden utilizarse con confiabilidad ya que utilizaron para sus cálculos un valor de z de 8,5 °C.

Algunas de las razones por la cuales se presentaría cierta variabilidad en los parámetros de resistencia térmica serían: a) Modificaciones en las condiciones de esporulación proporcionarían cultivos con diferentes valores de D y z ; b) Variabilidad natural en la resistencia de las esporas de un mismo microorganismo en diferentes cultivos; y, c) Diversidad de los métodos empleados para determinar los parámetros D y z , y la diferencia en condiciones reales, que no se controlan durante el tratamiento térmico, por ejemplo el no considerar el efecto sobre la inactivación microbiana que se produciría durante las etapas transientes de calentamiento y enfriamiento de las experiencias.

5 CONCLUSIONES

- De acuerdo al estudio realizado se concluye que es posible fabricar BIU con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 con una población inicial conocida y de tamaño definido para ser expuesto en un proceso de esterilización.
- Se determinaron los parámetros de resistencia térmica D_0 y z para el *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 siendo estos de 1,7 min y 8,8 °C, respectivamente. Con respecto al valor D_0 reportado en este estudio se puede considerar como un valor adecuado que está dentro del rango reportado por el fabricante del bioindicador utilizado. Por otra parte el valor z es sólo 0,3 °C mayor de lo que se reporta en la literatura especializada (8,5 °C) para la misma cepa estudiada, lo que equivale a un 3,4% de diferencia en los valores $F_{proceso}$ calculados para un mismo tratamiento térmico. Así, en la práctica la citada diferencia puede considerarse despreciable.
- La metodología propuesta, en donde se utilizan capilares con esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, para verificar los tratamientos de esterilización puede ser utilizada para cualquier tipo de conserva de baja acidez. Se deben realizar estudios adicionales que evalúen la influencia de la composición y tamaño del producto, en la concentración de esporas requeridas en las BIU.
- La validación microbiológica de los tratamientos de esterilización mediante el uso de Unidades Indicadoras Biológicas, sería de suma utilidad para las plantas que procesan conservas o alimentos envasados en bolsas flexibles esterilizables ("retortable pouch"), para poder evaluar las desviaciones propias del proceso térmico reduciendo el sobretratamiento al que son sometidos actualmente. Lo anterior permitiría optimizar las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos cada vez mas demandadas por consumidores mas informados y exigentes.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ABDUL GHANI, A.; FARID, M. y CHEN, X. 2002. Theoretical and experimental investigation of the thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* in food pouches. *Journal of Food Engineering* 51(3):221-228.
- ACEVEDO, P. 2008. Evaluación de tratamientos térmicos de jurel (*Trachurus symmetricus murphyi*) envasado al vacío en bolsas esterilizables a nivel industrial. Tesis Lic. Cs. Alim. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 161 p.
- ALARCON, L. 2008. Validación microbiológica de procesos térmicos de alimentos de formas complejas envasados al vacío en bolsas esterilizables. Tesis Lic. Alim. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 211 p.
- ALVARADO, J.; MARTÍNEZ, G.; NAVARRETE, J.; BOTELLO, E.; CALDERÓN, M. y JIMENEZ, H. 2009. Fenomenología de la esterilización de alimentos líquidos enlatados. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquía* (On line) 50:87-98. <ingenieria.udea.edu.co/grupos/revista/revistas/nro050/Articulo%208.pdf> (1 dic. 2011).
- ARABSHAHI, A y LUND, D. 1985. Considerations in calculating kinetics parameters from experimental data. *Journal Food Process Engineering* 7(4): 239-251.
- ÁVILA, I.M.L.B y SILVA, C.L.M. 1999. Methodologies to optimize thermal processing conditions: An overview. *In: Oliveira, F.A.R. y Oliveira, J.C. (eds). Processing foods quality optimization and process assessment.* CRC Press. Boca Ratón, FL, USA. pp: 67-82.
- BAIRD-PARKER, A.C.; BOOTHROYD, M. y JONES, E. 1970. The effect of water activity on the heat resistance of heat sensitive and heat resistant strains of salmonellae. *Journal Applied Bacteriology* 33(3): 515-522.

- BALL, C.O. 1923. Thermal process time for canned foods. Washington, DC. Natl. Research Council 37(7): Part 1.
- BALL, C.O. 1928. Mathematical solution of problems on thermal processing of canned foods. University of California (Berkeley). Public Health 1 (2): 15-245.
- BARRET, D; SOMOGYI, L y RAMASWAMY, H. 2005. Processing fruits. Science and Technology. (On line).< www.scribd.com/.../Thermal-Processing-of-Fruit>.(1 dic.2011).
- BERNAL, L.; PEREZ, J. y SANCHEZ, R. 2008. Indicadores físicos, químicos y biológicos para la esterilización (On line).< www.scribd.com/.../Indicadores-biológicos-y-esterilización> (18 ago. 2010).
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M. y TWEDT, R.M. 1987. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. Journal of Food Protection 50(7): 543-544,556.
- BREMER, P.; OSBORNE, C.; KEMP, R.; VAN VEGHEL, P. y FLETCHER, G. 1998. Thermal death times of *Hafnia alvei* cells in a model suspension and in artificially contaminated hot-smoked kahawai (*Arripis trutta*). Journal of Food Protection 61 (8): 1047-1051.
- CALIFANO, A. 1981. Transferencia de calor y materia durante el escaldado de papas. Tesis de Ph. D. La Plata, Argentina. Universidad Nacional de La Plata. 133 p.
- CAMBIANO y VON DER BECKE. 2000. Fundamentos de la esterilización HTST y UHT. (On line). < www.oocities.org/ohcop/cambiano.html > (27 jun. 2011).
- CASP, A. y ABRIL, J. 1999. Procesos de conservación de alimentos. Madrid, España. Vicente/ Mundi-Prensa. 494 p.
- CATALA, R. 1982. Bolsas flexibles esterilizables: Características y usos específicos. Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos (España) 22(2): 163-177.
- CIRO, H; GONZÁLEZ, C y GARCÍA, E. 2009. Modelación numérica de procesos de esterilización térmica de alimentos usando volúmenes de control: Aproximación cilíndrica. Dyna. (On line) 76(159):15-124.
<redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49611945013> (5 ene.2011).

- CLELAND, A. y EARLE, R. 1984. Assessment of freezing time prediction methods. *Journal of Food Science* 49(4): 1034-1042.
- CONDÓN, S. y SALA, F. J. 1992. Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *Journal of Food Protection* 55(8): 605–608.
- CONESA, R.; PERIAGO, P.; ESNOZ, A.; LOPEZ, A. y PALOP, A. 2003. Prediction of *Bacillus subtilis* spore survival after a combined non-isothermal-isothermal heat treatment. *European Food Research and Technology* 217: 319-324.
- DAHL, M. 2000. *Bacillus subtilis*. In: ROBINSON, R; BATT,C Y PATEL, P (eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. V1. Academic Press. San Diego, CA, USA. pp: 135-143.
- DOGAN, Z.; WEIDENDORFER, K.; MÜLLER-MERBACH, M.; LEMBKE, F. y HINRICHS, J. 2009. Inactivation kinetics of *Bacillus* spores in batch- and continuous-heating systems. *Food Science and Technology* 42: 81-86.
- FELLOWS, P. 2000. *Food Processing Technology, Principles and Practice*. (On line). <www.mediafire.com/?s6gwwxdej9w9wl6> (10 dic.2011).
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA).2000. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Overarching principles: Kinetics and pathogens of concern for all technologies. (On line).<<http://vm.cfsan.fda.gov/comm/ift-over.html>> (30 jul.2011).
- FRAIHA, M; FERRAZ, C y BIAGI, J. 2010. Determination of thermobacteriological parameters and size of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* (On line) 30 (4):1041-1045. <www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101...script.> (5 ene.2011).
- HAYES, P.R. 1993. *Microbiología e higiene de los alimentos*. Zaragoza, España. Acribia.369 p.
- HEINTZ, D. A. 1980. Marketing opportunities for the retort pouch. *Food Technology* 34 (9): 32 – 38.
- HELDMAN, D. y HARTEL, R. 1997. *Principles of food processing*. New York, USA. Chapman & Hall. 288 p.

- IBARZ, A. y BARBOSA, G. 2005. Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos. (On line). <books.google.cl/books?isbn=8484761630> (16 jul. 2011)
- ICIEK, J. y PAPIEWSKA, A. 2006. Inactivation of *Bacillus Stearothermophilus* spores during thermal processing. *Journal of Food Engineering* 77(3):406–410.
- ICIEK, J ; BLASZCZYK, I. y PAPIEWSKA, A. 2008. The effect of organic acid type on thermal inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Engineering* 87(1): 16-20.
- KOTZEKIDOU, P. 2000. *B. stearothermophilus*. In: ROBINSON, R.; BATT, C. y PATEL, P. (eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. v1. Academic Press. San Diego,CA, USA. pp: 125-129.
- KRUSHEFSKI, G. y GILLIS, J. 2008. The most important letter in sterilization is Z. *SGM Biotech*. 5(5).
- LAMPI, R. 1977. Flexible packaging for thermoprocessed foods. In: Chichester, C.O., Mrak, E.M. y Stewart, G.F. (eds.). *Advances in Food Research*. Vol. 23. New York, USA. Academic Press. pp: 305-428.
- LETRARI, J.; LIMA, H.O.S. y VANIN, M. 2006. Esterilização térmica e parâmetros de morte microbiana do *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953. IV ENTEC E II WORKSHOP da UTFPR – Campus Campo Mourão, PR, Brasil (On line).<www.fat.uerj.br/intranet/disciplinas/.../valorD.pdf> (31 ago.2011).
- LUND, D. 1983. Considerations in modeling food processes. *Food Technology* 37(1): 92-94.
- MARQUEZ, P. 2008. Factibilidad del Uso de Unidades Indicadoras Biológicas en la Evaluación de Tratamientos de Esterilización en Filetes de Alimentos Envasados al Vacío en Bolsas Esterilizables. Tesis Lic. Cs. Alim. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 211 p.
- MERSON, R.; SINGH, R. y CARROAD, P. 1978. An evaluation of ball's formula method of thermal process calculations. *Food Technology* 32(3): 66-71.
- MERCK S.A. 2007. Manual de Microbiología. (On line).<<http://service.merck.de/microbiology/>> (16 jul. 2011).

- MITCHELL, M. 2002. Modelación matemática como herramienta para el desarrollo de productos y procesos: Aplicación a la esterilización comercial de Jurel en bolsas esterilizables. Tesis Lic. Ing. Alim. Viña del Mar. Universidad Técnico Federico Santa María, Departamento de Procesos Químicos, Biotecnológicos y Ambientales. 95 p.
- MORALES-BLANCAS, E.; ZUÑIGA, G. y CARRASCO, E. 1999. Predicción de perfiles de temperatura durante el proceso combinado escaldado-hidrogenfriado de productos vegetales. Caso formas Cilíndricas. *In* Actas XVI Jornadas de Transferencia de Calor y Materia. Santiago, Chile. 29 – 30 nov. 1999. Asociación Chilena de Transferencia de Calor y Materia. pp 12-17.
- MORALES-BLANCAS, E. y TORRES, J. 2003a. Thermal resistance constants. *In*: Helman, D.R. (eds). Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering. Marcel Dekker. New York, USA. pp: 1030-1037.
-
- _____.2003b. Determination of thermal resistance parameters. *In*: Helman, D.R.(eds). Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering. Marcel Dekker. New York, USA. pp: 1038-1043.
- NAVARRO, R. 2007. Simulación de Procesos Térmicos de Alimentos de Formas Complejas Envasadas al Vacío en Bolsas Esterilizables de Tamaño Institucional. Tesis Lic. Cs. Alim. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 166 p.
- NICHOLAS, J. y WHITE, D. 1994. Traceable temperatures: An introduction to temperature measurement and calibration. Chinchester, England. John Wiley. 358 p.
- OSBORNE, C.M. y BREMER, P.J. 2000. Application of the Bigelow (*z*-value) Model and histamine detection to determine the time and temperature required to eliminate *Morganella morganii* from seafood. Journal of Food Protection 63(2): 227-280.
- PARRA, L y ACOSTA, E. 1999. Análisis de algunos indicadores biológicos disponibles comercialmente en México. Revista de la Asociación Dental Mexicana (On line) 44(4):151-154.< <http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-adm/e-od1999/e-od99-4/em-od994d.htm>> (15 nov.2011).

- PASCUAL, M. y CALDERON, V. 2000. Microbiología alimentaria. metodología analítica para alimentos y bebidas. (On line). <books.google.com/books/about/Microbiología_Alimentaria.html?> (1 dic. 2011).
- PATIÑO, N.; LOYOLA, J. y TOVAR, L. 2001. Uso y verificación con indicadores biológicos en esterilizadores de cirujanos dentistas de San Luis Potosí. Revista Salud Pública de México (On line) 43 (5): 455 - 458. <bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000329> (31 dic.2011).
- PEREZ, D. 2007. Simulación de procesos térmicos de alimentos de formas complejas envasadas al vacío en bolsas esterilizables. Tesis Lic. Cs. Alim. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias.218 p.
- PERIAGO, P.; LEONTIDIS, S.; FERNANDEZ, P.; RODRIGO, C. y MARTINEZ, A. 1998. Kinetic parameters of *Bacillus stearothermophilus* spores under isothermal and non-isothermal heating conditions. Food Science and Technology International 4(6): 443-447.
- PFLUG, I.J.1987a. Using the straight line semilogarithmic microbial destruction model as an engineering design model for determining the F-value for heat processes. Journal of Food Protection 50(4): 342-346.
- PFLUG, I.J. 1987b. Factor important in determining the heat process value, F_T , for low-acid canned foods. Journal of Food Protection 50(6): 528-533.
- PINHO, C y CRISTIANINI, M. 2005. Three-dimensional mathematical modeling of microbiological destruction of *Bacillus stearothermophilus* in conductive baby food packed in glass container. *International Journal of Food Engineering* 1(2). Art.1.
- RACINES, R. 2010. Indicadores de esterilización. (On line.)<esterilizaciónmf.wikispaces.com/Indicadores+de+esterilización> (11 jul.2011).
- RAMASWAMY, H. y SINGH, R. 1997. Sterilization process engineering. *In*: Valentas, K., Rotstein, E. y Singh, P. (eds). Handbook of Food Engineering Practice. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp: 37-69.

- REED, J.; BOHRER, C. y CAMERON, E. 1951. Spore destruction rate studies on organisms of significance in the processing of canned foods. *Food Research* 16 (5): 383-408.
- RUTALA, W.; JONES, S. y WEBER, D. 1996. Comparison of a rapid readout biological for steam sterilization with four conventional biological indicators and five chemicals indicators. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 17(7): 423-428.
- SCHUMAN, J.D.; SHELDON, B. y FOEGEDING, P.M. 1997. Thermal Resistance of *Aeromonas Hydrophila* in liquid whole egg. *Journal of Food Protection* 60(3): 231-236.
- STUMBO, C.R.; MURPHY, J. y COCHRAN, J. 1950. Nature of thermal death time curves for P.A. 3679 and *Clostridium botulinum*. *Food Technology* 4(8): 321-326.
- STUMBO, C.R. 1973. *Thermobacteriology in food processing*. 2nd ed. New York, USA. Academic Press. 329 p.
- TEXEIRA, A. 1992. Thermal process calculations. *In* Heldman, D. R. y Lund, D. B (eds). *Handbook of food engineering*. Marcel Dekker. New York, USA. pp: 563-619.
- TOLEDO, R. 1991. *Fundamentals of food process engineering*. 2nd ed. New York, USA. 602 p.
- TÖRÖK, T y KING, A., Jr. 1991. Thermal inactivation kinetics of food-borne yeast. *Journal of Food Science* 56(1): 6-9,59.
- TOWNSEND, C.; ESTY, J. y BASELT, F. 1938. Heat-resistance studies on spores of putrefactive anaerobes in relation to determination of safe processes for canned foods. *Food Research* 3(3): 323-346.
- XEZONES, J. y HUTCHINGS, I. 1965. Thermal resistance of *C. botulinum* (62A) spores as affected by fundamental food constituents. *Food Technology* 19(6): 113-115.
- ZHANG, Q. y CAVALIERI, R. 1991. Thermal model for steam blanching of green beans and determination of surface heat transfer coefficient. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* 34(1): 182-186.

VAN ZUIJLEN, A.; PERIAGO, P.; AMÈZQUITA, A.; PALOP, A.; STANLEY, B. y FERNANDEZ, P. 2010. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimization of thermal processes in food sterilization. Food Research International 43: 1895–1901.

ANEXO 1

Análisis estadístico para determinar la concentración de la solución madre y las BIU

Anexo 1.1 Resumen estadístico obtenido en STATGRAPHICS plus 5.1.

Resumen Estadístico		
	solucion madre	capilar
Frecuencia	4	4
Media	505833,0	634167,0
Varianza	1,60102E10	2,57805E10
Desviación típica	126532,0	160563,0
Mínimo	316666,0	500000,0
Máximo	583333,0	866666,0
Rango	266667,0	366666,0
Asimetría tipi.	-1,60001	1,29513
Curtosis típificada	1,58203	1,17246

Anexo 1.2 Comparación de medias a través del t-test obtenido en STATGRAPHICS plus 5.1.

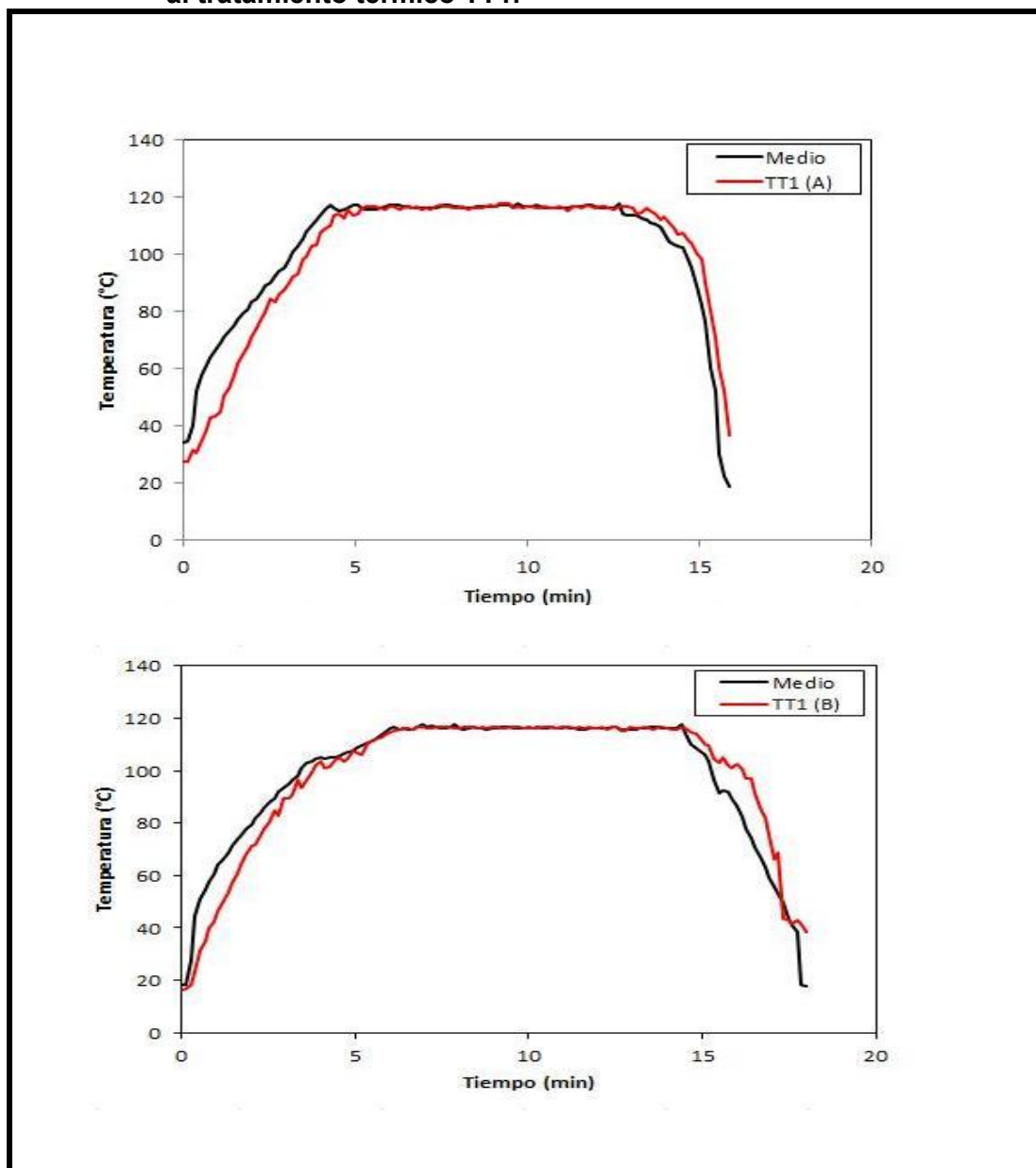
Comparación de Medias	

95,0% intervalo de confianza para la media de solucion madre:	505833,0 +/- 201340,0 [304493,0,707173,0]
95,0% intervalo de confianza para la media de capilar:	634167,0 +/- 255492,0 [378675,0,889658,0]
95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:	
suponiendo varianzas iguales:	-128334,0 +/- 250109,0 [-378442,0,121775,0]
contrastes t de comparación de medias	
Hipótesis nula: media1 = media2	
Hipótesis alt.: media1 <> media2	
suponiendo varianzas iguales: t = -1,25554 P-Valor = 0,255964	

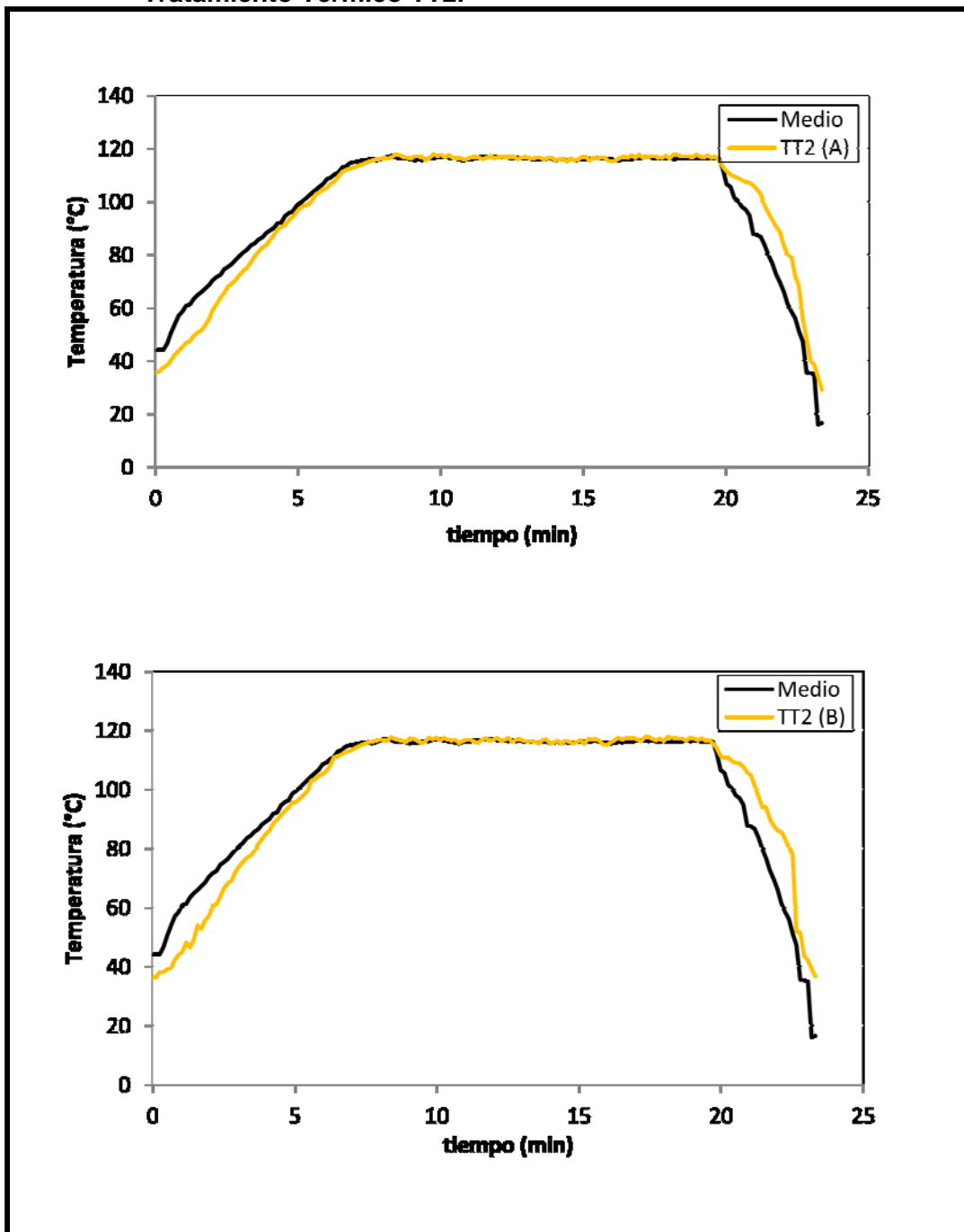
ANEXO 2

Perfiles tiempo-temperatura de acuerdo a los tratamientos térmicos preestablecidos

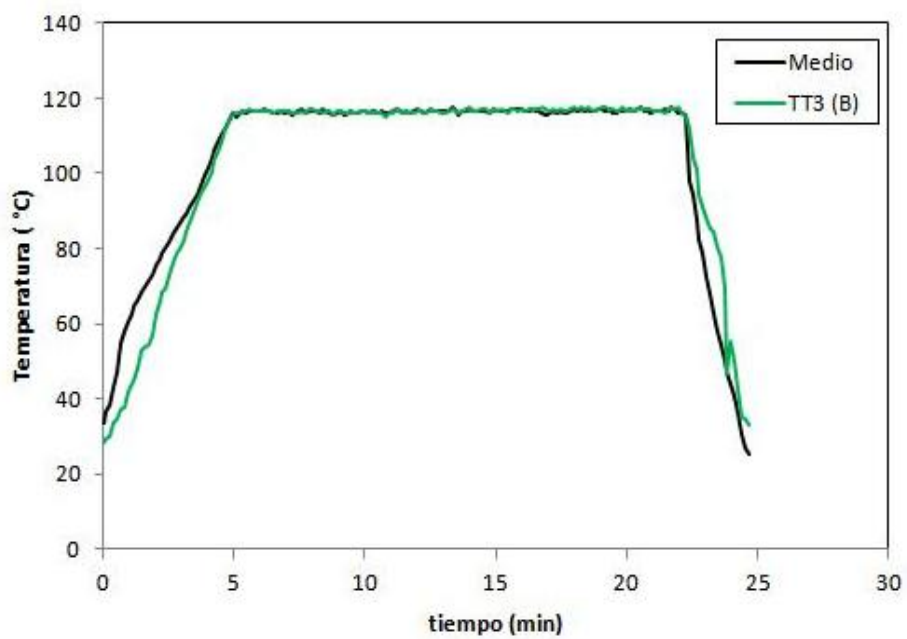
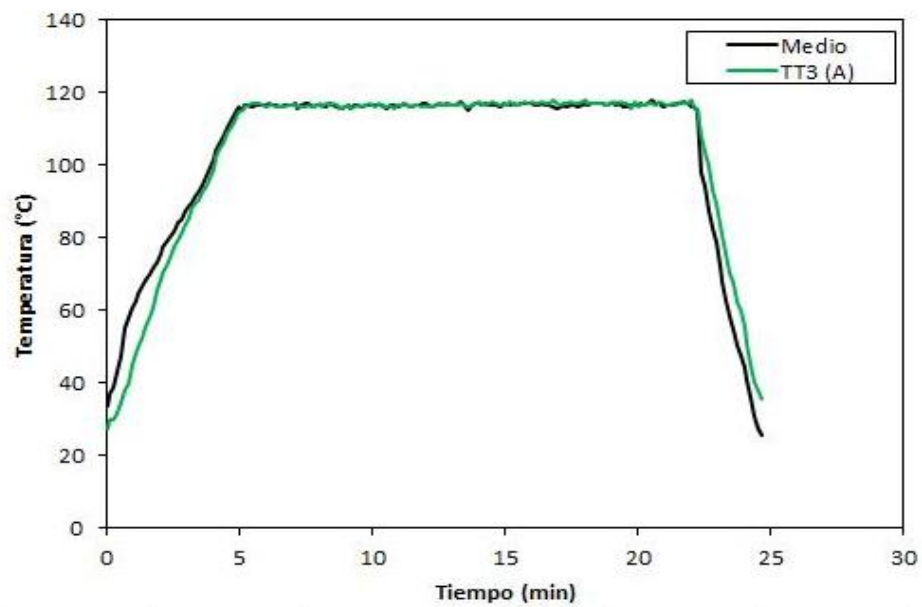
Anexo 2.1 Perfiles de tiempo/ temperatura experimental correspondiente al tratamiento térmico TT1.



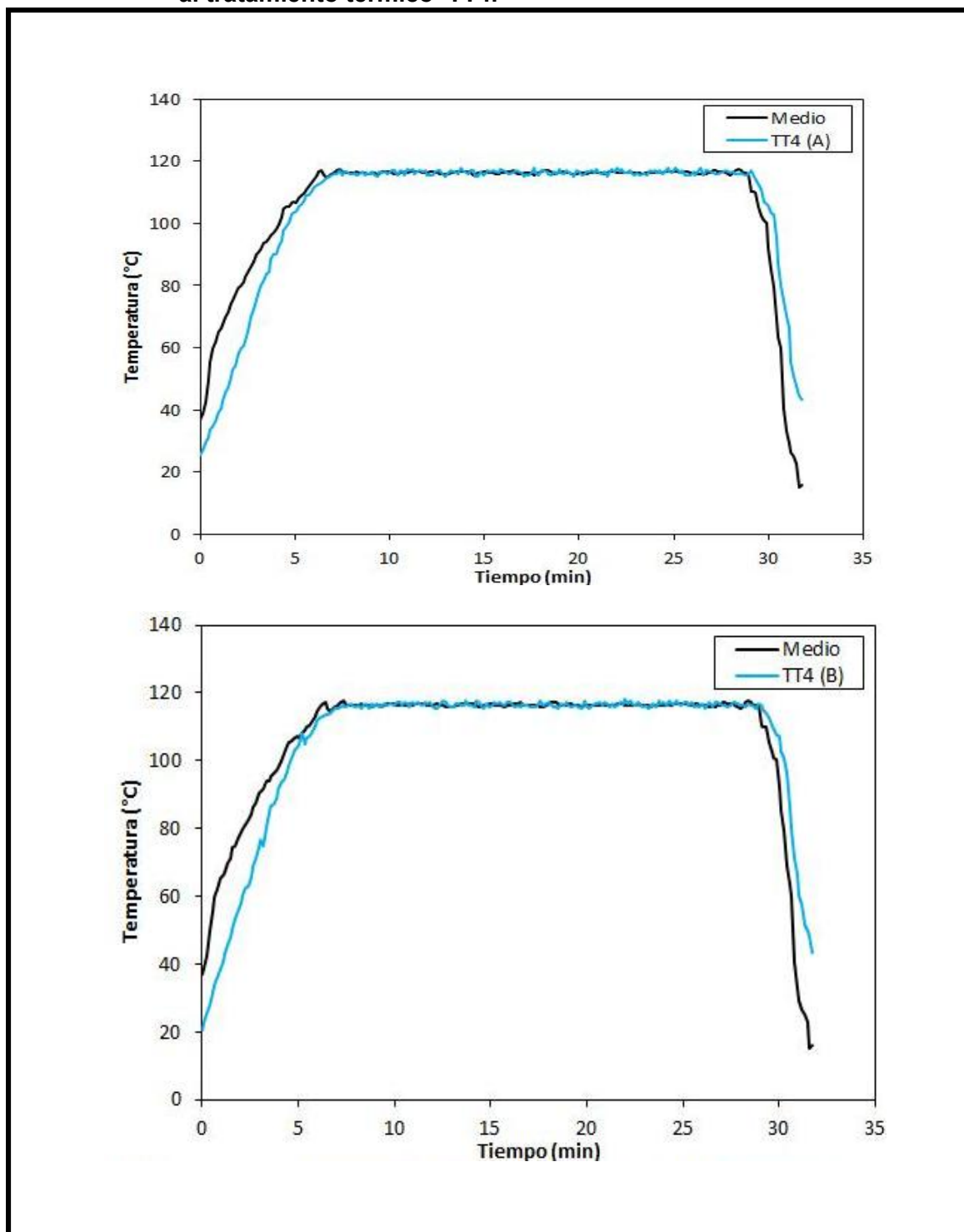
Anexo 2.2 Perfiles de tiempo/temperatura experimental correspondiente al Tratamiento Térmico TT2.



Anexo 2.3 Perfiles de tiempo/ temperatura experimental correspondiente al tratamiento térmico TT3.



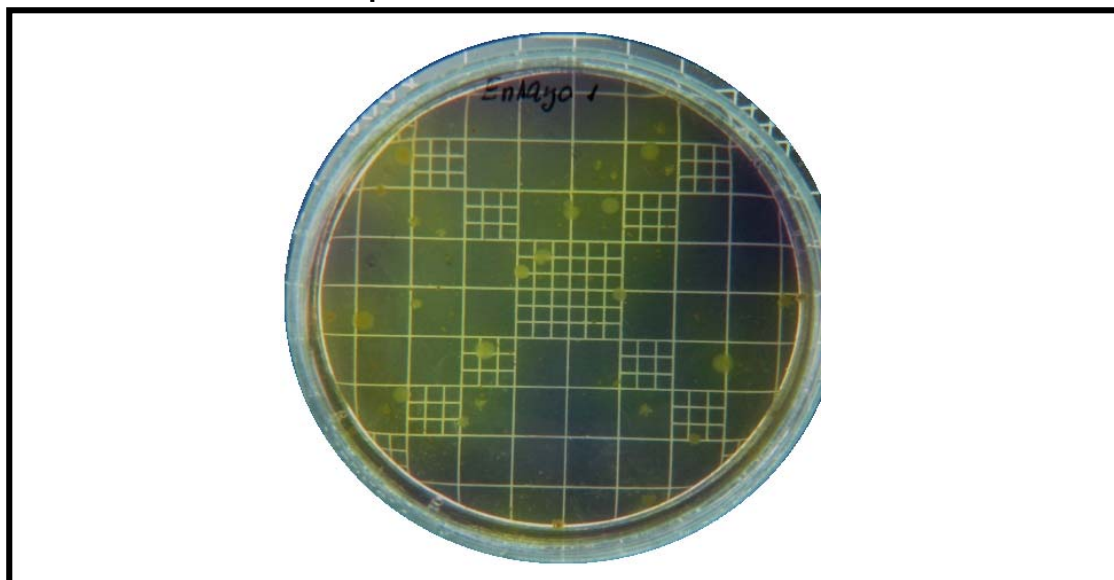
Anexo 2.4 Perfiles de tiempo/ temperatura experimental correspondiente al tratamiento térmico TT4.



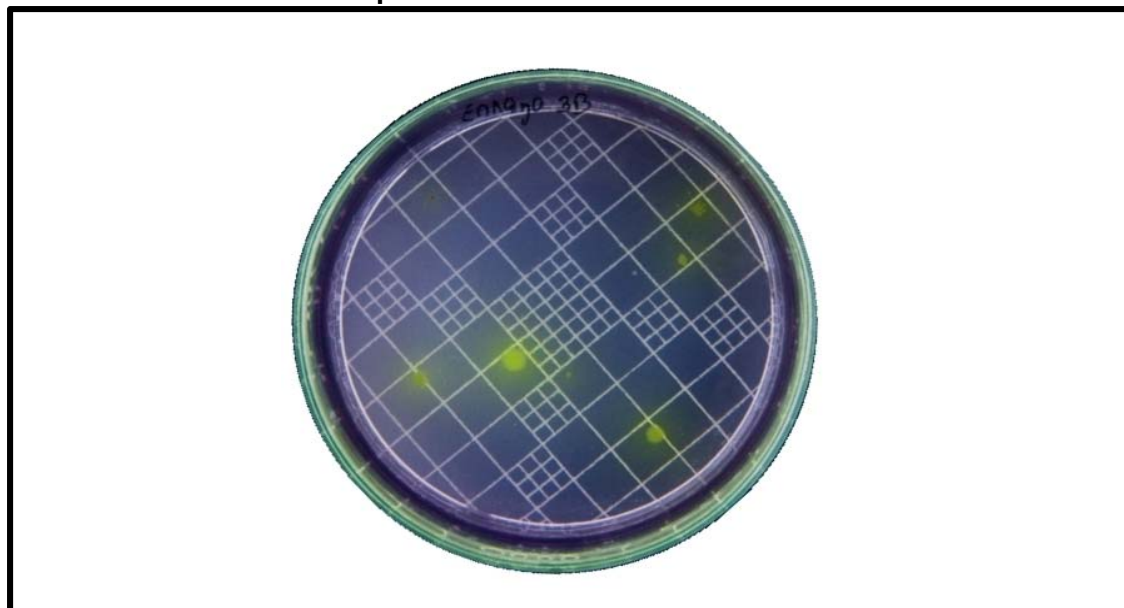
ANEXO 3

Recuento de la cantidad de esporas sobrevivientes al tratamiento térmico

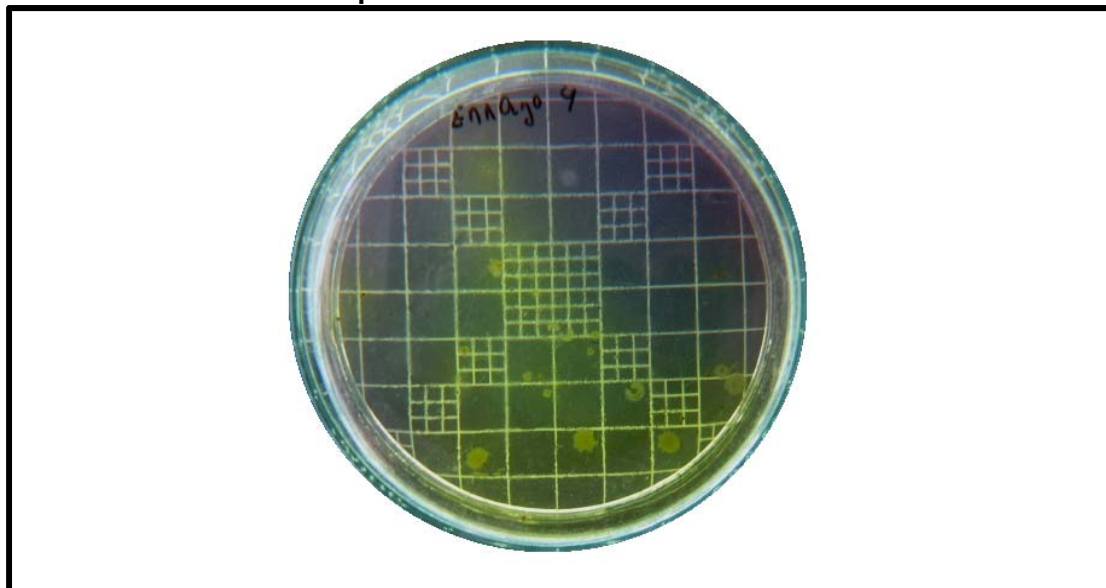
ANEXO 3.1 Microorganismos sobrevivientes de *G. stearothermophilus* obtenidos para el tratamiento térmico TT1.



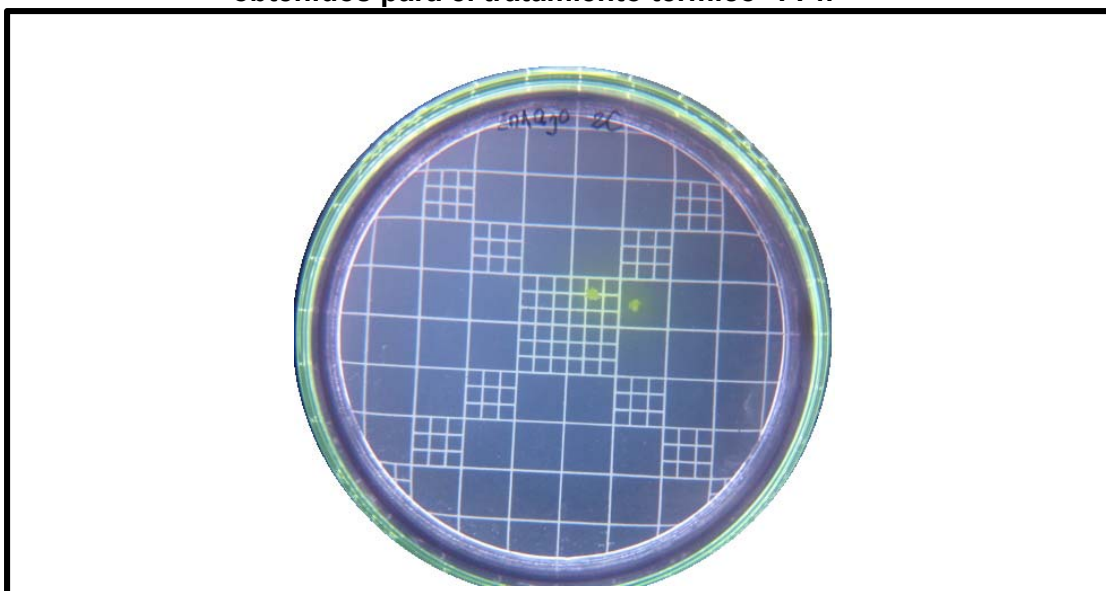
ANEXO 3.2 Microorganismos sobrevivientes de *G. stearothermophilus* obtenidos para el tratamiento térmico TT2.



ANEXO 3.3 Microorganismos sobrevivientes de *G. stearothermophilus* obtenidos para el tratamiento térmico TT3.



ANEXO 3.4 Microorganismos sobrevivientes de *G. stearothermophilus* obtenidos para el tratamiento térmico TT4.



ANEXO 4

Detalle agrupado de los valores de $\sum(S_f - S_m)^2$, denotado como SSQ, por tratamiento (SSQTT1, SSQTT2, SSQTT3, SSQTT4), y para todos los tratamientos (SSQTTm).

D	Z	SSQTT1	SSQ TT2	SSQ TT3	SSQ TT4	SSQTTm
1,5	8	0,45785438	0,02538746	0,95666034	0,48899117	1,92889334
	8,1	0,35321025	0,04603301	1,23247498	0,39100145	2,02271969
	8,2	0,26324816	0,09414863	1,552883	0,37635482	2,2866346
	8,3	0,18771635	0,16910855	1,9166305	0,44310599	2,71656139
	8,4	0,12636765	0,27029157	2,32248562	0,58931966	3,30846451
	8,5	0,07895392	0,39708188	2,76923053	0,81307364	4,05833997
	8,6	0,04522343	0,54886985	3,25567718	1,11246159	4,96223205
	8,7	0,02491826	0,72505266	3,78065302	1,48559554	6,01621948
	8,8	0,01779257	0,92503496	4,34300658	1,93060803	7,21644213
	8,9	0,02358597	1,14822927	4,94161492	2,44565405	8,55908422
	9	0,04205675	1,39405655	5,5753731	3,02891269	10,0403991
1,6	8	0,936152	0,20667602	0,28716013	1,61433676	3,04432491
	8,1	0,790942	0,12418545	0,35936219	1,22421917	2,49870881
	8,2	0,658948	0,06659735	0,47227969	0,90972896	2,10755401
	8,3	0,539953	0,0333595	0,62480645	0,66916274	1,86728169
	8,4	0,433753	0,02392988	0,81585231	0,50082349	1,77435868
	8,5	0,340121	0,03776424	1,04434306	0,40302354	1,82525185
	8,6	0,258839	0,07432562	1,30922219	0,37408715	2,01647396
	8,7	0,189689	0,13308481	1,60945254	0,41235282	2,34457917
	8,8	0,132449	0,21351377	1,94401587	0,51617538	2,80615402
	8,9	0,086893	0,31509597	2,31191036	0,68392781	3,39782714
	9	0,05281	0,43731975	2,71215897	0,91400278	4,1162915
1,7	8	1,50335319	0,71201094	0,37614215	3,59710523	6,1886115
	8,1	1,32756266	0,54979569	0,28932437	2,98225223	5,14893495
	8,2	1,16375719	0,41030936	0,23991907	2,4364962	4,25048183
	8,3	1,0117562	0,29306636	0,22694558	1,95833384	3,49010198
	8,4	0,87136405	0,19758342	0,24943064	1,54626543	2,86464353
	8,5	0,74239621	0,12338035	0,30641728	1,19879754	2,37099139
	8,6	0,62465948	0,06998077	0,39696451	0,91444556	2,00605031
	8,7	0,51795708	0,03691264	0,52014295	0,69173582	1,76674849
	8,8	0,42209684	0,02370885	0,67504442	0,5292076	1,6500577
	8,9	0,33688233	0,02990764	0,86077238	0,42541481	1,65297716
	9	0,26211994	0,05505308	1,07645231	0,37892759	1,77255291

D	Z	SSQ TT1	SSQ TT2	SSQ TT3	SSQ TT4	SSQTTm
1,8	8	2,121789	1,43302092	0,99020193	6,13858833	10,6836002
	8,1	1,922923	1,20881433	0,77827258	5,34996199	9,25997191
	8,2	1,734994	1,00547998	0,60091917	4,62484628	7,96623942
	8,3	1,557846	0,82258544	0,45725807	3,96190526	6,79959476
	8,4	1,391311	0,6596998	0,34642075	3,35980435	5,7572359
	8,5	1,235219	0,51639444	0,26754758	2,81721284	4,83637386
	8,6	1,089405	0,35792931	0,21979054	2,33280626	3,99993111
	8,7	0,953688	0,2868251	0,20231679	1,90526848	3,34809837
	8,8	0,827906	0,19972061	0,21430524	1,53329351	2,77522536
	8,9	0,711879	0,13051635	0,25495499	1,21558719	2,31293753
	9	0,605438	0,07880332	0,32347173	0,95086864	1,95858169
1,9	8	2,76627623	2,29499117	1,96640908	9,03403831	16,0617148
	8,1	2,55003541	2,02239931	1,65549616	8,11066616	14,338597
	8,2	2,34383944	1,76907767	1,37669423	7,24598058	12,7355919
	8,3	2,14754229	1,53463879	1,12921001	6,43878707	11,2501782
	8,4	1,96099805	1,31869607	0,91225418	5,68789062	9,87983891
	8,5	1,78405932	1,12086452	0,72505323	4,99209815	8,62207522
	8,6	1,61657253	0,94076133	0,56684106	4,35022077	7,47439568
	8,7	1,45838412	0,77800645	0,43686362	3,7610757	6,43432989
	8,8	1,30934191	0,63222305	0,3343794	3,2234881	5,49943246
	8,9	1,16929425	0,50303796	0,25865687	2,73629258	4,66728166
	9	1,03808124	0,39008207	0,20898188	2,29833465	3,93547984
2	8	3,41992	3,24587567	3,1896246	12,1417976	21,9972179
	8,1	3,190689	2,93545469	2,80008974	11,1138982	20,0401316
	8,2	2,970726	2,64290996	2,44050954	10,1404845	18,19463
	8,3	2,7599	2,36789236	2,11016339	9,22048242	16,4584382
	8,4	2,558084	2,11005312	1,80833776	8,35281606	14,8292909
	8,5	2,365139	1,86904451	1,53432698	7,53640978	13,3049203
	8,6	2,180937	1,64452042	1,28743783	6,77019042	11,8830857
	8,7	2,005335	1,43613686	1,06698215	6,05308919	10,5615432
	8,8	1,8382	1,24355245	0,87228532	5,38404329	9,33808105
	8,9	1,679393	1,06642882	0,70268371	4,7619975	8,21050302
	9	1,528772	0,904431	0,55752202	4,18590546	7,17663048