

## Tema 6. La esterilización de procesos.

A- Sensibilidad de los microorganismos a la temperatura: tiempo de reducción decimal a temperatura constante, curva de reducción térmica. Tasa mínima de contaminación experimental, significado práctico.

B- Tratamiento térmico: F, Z y curva T.D.T. Baremo de esterilización. Factores que incluyen en la esterilización. Tratamiento térmico según ARRHENIUS: velocidad específica de destrucción térmica y energía de activación.

C- Esterilización del medio de cultivo: discontinua y continua. Esterilización del aire de fermentación. Cinética de la esterilización y cálculo de la duración del tratamiento térmico.

D- La esterilización en la industria: Tipos y características. Ensayos de esterilidad. Asepsia. Ejemplos industriales.

### Esterilización

Es conveniente, al tratar este tema, dar una definición clara del término y de otros relacionados, ya que a veces suelen producirse confusiones.

**Esterilización** significa la eliminación de toda forma de vida de un medio o material, lo que se lleva a cabo generalmente por medios físicos, por ejemplo, filtración, o por muerte de los organismos por calor, productos químicos u otra vía.

Esta definición excluye por lo tanto cualquier técnica que resulte solamente en un daño a los microorganismos o atenuación de la actividad de cualquier tipo. La palabra *desinfección* se aplica a la remoción o destrucción por cualquier vía de organismos vivos que pueden causar daño particular o infección. No significa por lo tanto la destrucción de todos los microorganismos, sino solamente de aquellos que pueden producir un resultado no deseado. Un antiséptico es un desinfectante, o sea un agente químico usado para destruir microorganismos dañinos. Se utiliza en general para agentes a ser aplicados en animales o humanos.

**Asepsia** es la exclusión continuada de microorganismos contaminantes. Así por ejemplo el cultivo de microorganismos en el laboratorio es llevado a cabo asépticamente como en muchas fermentaciones industriales. El medio de cultivo es esterilizado para remover toda forma de vida y luego inoculado con el cultivo requerido. Se dice entonces que el sistema se mantiene en condiciones asépticas.

**Pasteurización** es el término aplicado al proceso que se utiliza para la destrucción de algunos de los microorganismos posiblemente presentes en materiales sensibles al calor como la leche y cerveza. Consiste en calentar la leche, por ejemplo a 62 °C, mantenerla a esta temperatura 30 minutos y después enfriarla lo más rápidamente posible. Esta técnica no es de ninguna manera un procedimiento de esterilización. Es solamente un método para destruir organismos patógenos y al mismo tiempo disminuir el nivel de aquellos organismos que más pueden deteriorar la leche.

La razón fundamental para efectuar la esterilización en Microbiología Industrial es para evitar la competición por los nutrientes en medios de cultivo y permitir así que el cultivo de microorganismos específicos que se utilizan en un proceso de fermentación de los rendimientos esperados en biomasa y/o metabolitos específicos.

### **Métodos de esterilización**

Los métodos de esterilización pueden ser de 3 tipos: a) por destrucción total de microorganismos; b) Por muerte o inactivación; y c) Por eliminación con medio físicos.

Por destrucción total se entiende un proceso muy violento, que casi siempre implica calentamiento apreciable del material, como ocurre con la aplicación de una llama, que es lo que hacemos en el laboratorio cuando flameamos un anillo de platino o las bocas de tubo de ensayo o erlenmeyers. Otra manera de destruir contaminantes es con el uso de poderosos agentes oxidantes. Por supuesto ésta metodología, aunque es efectiva, está muy restringida en su empleo. La muerte o inactivación significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por calentamiento, seco o húmedo, por radiaciones o por agentes químicos. El calor húmedo, generalmente en forma de vapor bajo presión, es muy útil y de gran valor en la esterilización en el laboratorio, que se efectúa en autoclave, o en la industria cuando se esterilizan los medios de cultivo y los equipos de fermentación. En el caso de los autoclaves, se pueden alcanzar presiones de 1 a 3 atmósferas. En escala grande el equipo de producción es esterilizado con vapor saturado bajo presión, y la presión requerida debe ser alcanzada en todas las partes del equipo y el aire debe ser purgado totalmente del sistema (como ocurre también en el caso de los autoclaves) porque la transferencia de calor disminuye mucho en ese caso. Después de la esterilización se mantienen las condiciones asépticas, haciendo pasar vapor por las válvulas y sellos.

La eliminación física está restringida a la esterilización de gases líquidos, y es fundamentalmente llevada a cabo por filtración mediante filtros absolutos o filtros fibrosos. Los filtros absolutos son de materiales cerámicos, de vidrio o de metal sinterizado con poros tan pequeños que la penetración de los microorganismos no es posible. Los filtros fibrosos no son absolutos y el material filtrante puede ser lana de vidrio, amianto y esteres de celulosa, siendo las fibras de un diámetro variable de 0.5 a 15 micrones.

### ***Cinética de la esterilización por calor***

La cinética de la esterilización por calor húmedo, que es la única que consideraremos en esta monografía por su aplicación a la esterilización de medios de fermentación, está caracterizada bastante aproximadamente por una reacción cinética de primer orden. Si  $N_0$  es el número de organismos viables presentes inicialmente y  $N$  es número viable al final tendremos que la ecuación de velocidad de muerte será:

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (1) \text{ e integrando entre los límites}$$

$N_0$  a tiempo = 0 y  $N$  al tiempo  $t = t$ , se obtiene

$$\ln \frac{N_0}{N} = kt \quad \text{ó} \quad \ln \frac{N}{N_0} = -kt \quad (2)$$

$N/N_0$  es la fracción de organismos viables que sobreviven después del tratamiento por calor durante el tiempo  $t$  y  $k$  = constante de velocidad de destrucción, que depende de la temperatura según la clásica ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad \text{ó} \quad \ln k = \ln A - \frac{E}{RT} \quad (3)$$

$A$  = constante

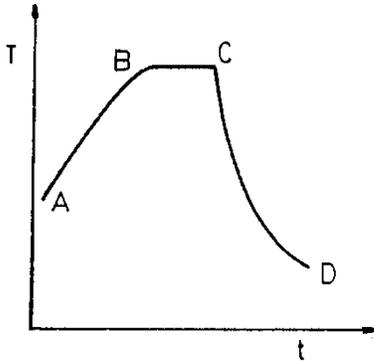
donde  $E$  = energía de activación

$R$  = Constante general de los gases

$T$  = Temperatura en grados Kelvin

Si se gráfica el  $\ln k$  en función de  $1/T$  se obtendrá una línea recta, siendo la inclinación igual a  $-E/R$  y la intersección de la recta con la ordenada, el valor de la constante de Arrhenius. La ecuación de velocidad de muerte necesita una aclaración, ya que la misma no admite una disminución del número de organismos a cero, porque si  $N$  es cero,  $t$  debería ser infinito. Para resolver este problema supongamos que  $N = 0.1$  y calculemos el valor correspondiente de  $t$ . No podemos decir que después de ese tiempo sobrevivirá una décima parte de un microorganismo, pero si podemos decir que habrá sólo una probabilidad de 1 en 10 de que sobreviva un microorganismo. Ya

veremos que por razones de seguridad podemos fijar el valor de  $N = 0.001$  o sea fijar una probabilidad de 1 en 1000 de sobrevivencia.



**Figura 9.** Variación de la temperatura en función del tiempo en un proceso de esterilización en batch.

La figura 9 muestra una curva típica de la esterilización en "batch" de un medio en un fermentador. La curva AB representa la etapa de calentamiento, la parte BC corresponde a la etapa de mantenimiento y CD es la etapa de enfriamiento. Durante la primera y última etapa ocurre parte de la destrucción térmica de organismos presentes en el medio debido a que se alcanza temperatura elevada sobre todo en la última parte de la curva AB y la primera parte de la curva CD. Se considera que la temperatura a partir de la cual se produce destrucción de esporos es  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por lo tanto tendremos eliminación de esporos de  $100$  a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la etapa de calentamiento y de  $120$  a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la correspondiente al enfriamiento. Los tiempos de calentamiento y enfriamiento varían de acuerdo al volumen del equipo. En fermentadores industriales de  $60.000\text{ l}$  por ejemplo esos tiempos están en el orden de  $28-30\text{ min.}$  y  $11-14\text{ min.}$  Para los períodos de calentamiento y enfriamiento respectivamente. En la práctica de la esterilización es necesario tener presente que la calidad nutriente del medio debe ser preservada todo lo posible, razón por la cual, es imprescindible diseñar un ciclo de esterilización lo más efectivo posible pero al mismo tiempo lo más corto posible. Podremos definir un término nabla ( $\nabla$ ) que representa la magnitud de la disminución del número de organismos viables de manera que:

$$\nabla = \ln \left( \frac{N_0}{N} \right) = kt$$

Y por tanto

$$\nabla = At e^{-\frac{E}{RT}}$$

Sin embargo, como ya dijimos, parte de la destrucción ocurre en la etapa de calentamiento y otra parte en la de enfriamiento, de manera tal que:

$$\nabla_{\text{total}} = \nabla_{\text{cal}} + \nabla_{\text{mant}} + \nabla_{\text{enfriam.}}$$

Las partes  $\nabla_{\text{cal}}$  y  $\nabla_{\text{enfriam.}}$  son obtenidas a temperatura variable de manera tal que es necesario integrar la ecuación:

$$k dt = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}} dt$$

para el período de calentamiento y de enfriamiento con el fin de calcular la cantidad de esporos que se eliminan durante ambos períodos. Conociendo el valor inicial de esporos presentes en el volumen de medio considerado es posible calcular el tiempo de mantenimiento a 120 °C para la esterilización completa del mismo.

Existen datos, en bibliografía, de cálculo de tiempo de mantenimiento para la esterilización de 45,000 l de medio (con un valor de  $N_0 = 2 \times 10^7$  esp/ml) que demuestra que son necesarios solamente 8.8 min como tiempo de mantenimiento a 120 °C.

Debe tenerse en cuenta que estas consideraciones son válidas para el cálculo del tiempo de esterilización mínimo, a 120 °C, en fermentadores industriales del volumen considerado. En el caso del laboratorio cuando utilizamos un autoclave y deseamos esterilizar distintos recipientes con volúmenes diversos de medio, el tiempo de calentamiento y de enfriamiento no son generalmente considerados, salvo en el caso de equipos que tengan un período de calentamiento y de enfriamiento prolongado, los que por otra parte no son recomendados para su uso en el laboratorio.

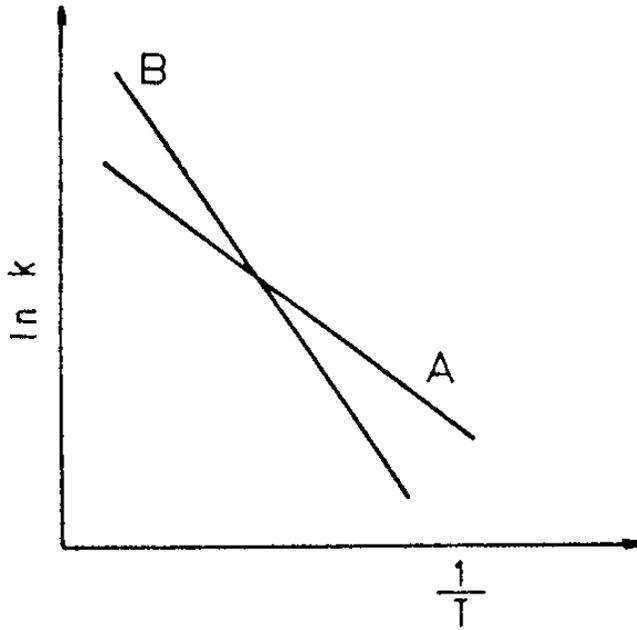
Lo que es importante en este caso es el tipo de recipiente, su geometría y el volumen de medio a esterilizar. El tiempo de esterilización (o sea el tiempo de mantenimiento a 120 °C) requerido por ejemplo para tubos de ensayo de 18 x 50 mm es de 12-14 min y para tubos de 38 x 200 mm, de 15-20 min. Erlenmeyers de 2000 ml requieren de 30-35 min mientras que si son de 125 ml el tiempo es de 12-14 min. En cambio un frasco pyrex cuadrado de 1000 ml requiere 30-35 min y una botella de suero de 9000 ml 50-55 min. Estos tiempos aseguran la eliminación de esporos bacterianos de las especies más resistentes.

### ***Conservación de la calidad nutriente***

Como ya dijimos anteriormente, los medios de fermentación utilizados en la industria son casi siempre complejos y a menudo con sólidos en suspensión, de manera tal que los cambios que se producen durante la esterilización pueden ser importantes. A veces puede haber modificaciones beneficiosas o perjudiciales dependiendo del tiempo de esterilización.

Existen casos en los cuales si se prolonga la esterilización 50 a 60 min se producen pérdidas de rendimiento que llegan hasta el 65% con respecto al medio normal. En ciertos casos cuando el tiempo es solamente de 15-20 min se puede producir un efecto beneficioso.

La naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre los componentes de un medio, durante la esterilización por calor, dependerá no solamente de la naturaleza de los componentes sino también de la temperatura, duración del calentamiento, pH del medio, y de la agitación. Un ejemplo típico de interacción es la reacción de Maillard que tiene lugar entre los grupos carbonilos de los azúcares con los grupos amino de proteínas, aminoácidos, etc. Se forman así productos de condensación con lo cual se inactivan significativas cantidades de carbohidratos y nitrógeno amínico. Por ese motivo es necesario que los carbohidratos se esterilicen por separado de los compuestos nitrogenados orgánicos. Las sales de  $\text{NH}_4^+$  se deben autoclavar a pH 7 o menor, si no el amonio se volatiliza. En medios químicamente definidos se puede observar pérdida importante de magnesio, potasio, amonio, sodio y fosfatos por precipitación de sales poco solubles como  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ,  $\text{MgKPO}_4$  y  $\text{MgNaPO}_4$ . Es importante por lo tanto autoclavar las sales de calcio y magnesio aparte de los fosfatos. Los aminoácidos y factores de crecimiento son muy lábiles al calor. Entre los aminoácidos, el triptofano, glutamina, asparagina, y entre las vitaminas hidrosolubles, la tiamina, riboflavina y piridoxina son las más susceptibles de sufrir descomposición. En todos estos casos es aconsejable disolverlas separadamente en pequeños volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}$  y luego esterilizarlas por filtración.



**Figura 10.** Relación entre  $k$  y la inversa de la temperatura para reacciones de baja y alta energía de activación.

Como ya dijimos es fundamental, además de esterilizar correctamente los medios, conservar al máximo la calidad nutricional de los mismos. En la misma forma que la inactivación de microorganismos puede ser considerada una reacción cinética de primer orden, también la destrucción de algunos compuestos sensibles al calor puede ser tratada en la misma forma. La energía de activación de tales reacciones está generalmente en el rango de 10,000-30,000 cal.mol<sup>-1</sup> mientras que la correspondiente a la destrucción térmica de esporos es superior (65,000-85,000 cal. mol<sup>-1</sup>). Una representación gráfica daría una línea recta para ambos casos con valores distintos de pendientes según se aprecia en la Fig. 10. La figura muestra que a medida que la temperatura aumenta, el valor de  $k$  para la reacción con baja  $E$  (curva A) aumenta más lentamente que en el otro caso. Esto significa que un aumento de la temperatura acelera la destrucción de esporos más que la degradación de nutrientes. Recordando la ecuación anterior:

$$kt = \ln \frac{N_0}{N}$$

vemos que el tiempo requerido para la destrucción de esporos decrece en proporción al aumento de  $k$ . Por lo tanto si se emplea alta temperatura para la esterilización se requiere un tiempo menor, por lo cual se concluye que la esterilización llamada de alta temperatura-corto tiempo favorece la conservación de la calidad nutricional al mismo tiempo que produce la destrucción efectiva de los esporos.

Es necesario aclarar que el uso de alta temperatura con tiempos cortos en escala grande implica necesariamente el empleo de un sistema de calentamiento y enfriamiento continuo en lugar de proceso de esterilización en batch.

En los próximos tres capítulos trataremos los aspectos básicos correspondientes a estequiometría, cinética de crecimiento y formación de productos, sistemas de cultivo y aspectos generales de biorreactores.