

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**“EFECTO DEL OZONO SOBRE LA ELIMINACIÓN DE *Brettanomyces
bruxellensis* EN MADERAS DE ROBLE AMERICANO.”**

EDUARDO GABRIEL RUIZ OÑATE

SANTIAGO DE CHILE
2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**“EFECTO DEL OZONO SOBRE LA ELIMINACIÓN DE *Brettanomyces
bruxellensis* EN MADERAS DE ROBLE AMERICANO.”**

**"EFFECT OF OZONE ON THE ELIMINATION OF *Brettanomyces bruxellensis* IN
AMERICAN OAK."**

EDUARDO GABRIEL RUIZ OÑATE

**SANTIAGO DE CHILE
2012**

**“EFECTO DEL OZONO SOBRE LA ELIMINACIÓN DE *Brettanomyces
bruxellensis* EN MADERAS DE ROBLE AMERICANO.”**

Memoria para optar al título profesional de

Ingeniero Agrónomo

Mención: Enología y Vitivinicultura.

EDUARDO GABRIEL RUIZ OÑATE

PROFESOR GUIA

Calificaciones.

Sr. Eduardo Loyola M.

Ingeniero Agrónomo, Dr.

PROFESORES EVALUADORES

Sr. Elías Obreque S.

Ingeniero Agrónomo, Dr.

Sr. José L. Henríquez S.

Ingeniero Agrónomo, Dr.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
Hipótesis	7
Objetivo	7
MATERIALES Y METODO	8
Materiales	8
Lugar de estudio	8
Materiales	8
Método	8
Procedimiento	9
Variable a medir	11
Diseño experimental y análisis estadístico	11
RESULTADOS Y DISCUSION	13
Efecto a nivel superficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1009	14
Efecto a nivel subsuperficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1009	17
Efecto a nivel superficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1451	20
Efecto a nivel subsuperficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1451.	24
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFIA	28
APENDICES	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los 7 días.	14
Cuadro 2. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los 7 días	18
Cuadro 3. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 7 días	21
Cuadro 4. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 7 días.	24
Cuadro 5. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los días. (Superficial).	31
Cuadro 6. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los 4 días. (Subsuperficial)	31
Cuadro 7. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 4 días. (Superficial)	32
Cuadro 8. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 4 días. (Subsuperficial)	32
Cuadro 9. Efecto de la presión de trabajo (Test de Kruskal-Wallis).	33
Cuadro 10. Efecto del tiempo de aplicación (Test de Kruskal-Wallis).	33
Cuadro 11. Efecto de la presión de trabajo (Test de Kruskal-Wallis).	33
Cuadro 12. . Efecto del tiempo de aplicación (Test de Kruskal-Wallis).	34

Cuadro 13. Efecto de la presión de trabajo (Test de Kruskal-Wallis).	35
Cuadro 14. Efecto del tiempo de aplicación (Test de Kruskal-Wallis).	35
Cuadro 15. Efecto de la presión de trabajo (Test de Kruskal-Wallis).	35
Cuadro 16. Efecto del tiempo de aplicación (Test de Kruskal-Wallis).	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo	17
Figura 2. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo	20
Figura 3. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo	23
Figura 4. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo.	26

RESUMEN

El propósito del estudio fue evaluar la eliminación de *Brettanomyces bruxellensis* por medio de aplicaciones de ozono en mezcla gaseosa a presiones de trabajo y tiempos de exposición diferentes. La investigación se realizó con bloques de madera de roble americano en formato viniblock, los cuales fueron inoculados con las dos cepas de *Brettanomyces bruxellensis* utilizadas a lo largo del ensayo (cepa 1009 y 1451), donde se evaluó la mortalidad a través de un conteo directo en placas Petri post un periodo de incubación.

Los mayores promedios de mortalidad obtenidos para la cepa 1009 (100%) fueron aquellos donde los bloques contaminados fueron expuestos a tiempos de 20 minutos de exposición y a una presión de trabajo de 1,8 bares, para ambas mediciones realizadas (efecto superficial y subsuperficial). En el caso de la cepa 1451 los mejores resultados fueron obtenidos al aplicarse las mismas condiciones anteriormente señaladas.

La cepa 1009 tuvo una cinética de crecimiento mayor a la presentada en la cepa 1451, donde el número de colonias fue más numerosa, pero con lo que respecta al comportamiento que tuvieron frente al agente sanitizante sus promedios de mortalidad tendieron a igualarse, lo cual nos indica que ambas cepas son igualmente sensibles a las aplicaciones de ozono en mezcla gaseosa.

Por lo que se concluye que el ozono es un buen sanitizante para las maderas de guarda ya que bajo ciertas condiciones de trabajo elimina la totalidad de las levaduras presentes, tanto a nivel superficial como bajo la madera, lo cual otorga la completa esterilidad de las maderas de guarda.

Palabras claves: Sanitización de barricas, cepa 1009, cepa 1451, Yep, Viniblocks.

ABSTRACT.

The purpose of this study was to evaluate the elimination of *Brettanomyces bruxellensis* through applications of ozone gas mixture at different pressures of work and exposure times. The research was carried out with blocks of American oak in viniblock format, which were inoculated with two strains of *Brettanomyces bruxellensis* used along the assay (strain 1009 and 1451), where mortality was evaluated through a direct count in Petri dishes post an incubation period.

The highest average mortality obtained for strain 1009 (100%) were those contaminated blocks were exposed to times of 20 minutes of exposure and a working pressure 1.8 bar for both measurements (surface and subsurface effect) in the case of strain 1451 the best results were obtained when applying the same conditions stated above.

The 1009 strain had higher growth kinetics to that presented in strain 1451, where the number of colonies was larger, but with regard to behavior which sanitizing agent were compared to averages of mortality tended to level out, which indicates that both strains are equally sensitive to ozone applications in a gaseous mixture.

It that concludes the ozone is a good sanitizer for woods barrels because under certain working conditions eliminated all of yeast presents at both the surface and under the wood, which gives the complete sterility of the woods barrels.

Keywords: Sanitation barrels, strain 1009, strain 1451, Yep, Viniblocks.

INTRODUCCIÓN.

El vino es un producto fermentado provenientes de materias primas sin tratar, el cual tiene un periodo de almacenamiento prolongado (Hernández y Barbero, 2007), en el cual es susceptible de ser atacado por microorganismos indeseables capaces de alterar sus propiedades físicas y sensoriales (Laureiro y Malfeito-Ferreira, 2007).

Uno de los mayores problemas ocasionados por microorganismos en los vinos son los producidos por las levaduras del género *Brettanomyces*, ya que tienen un rol de importancia en la evolución aromática del vino (Chatonnet *et al.*, 1995; Fugelsang y Zoecklein., 2003; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Esto sumado a que su presencia pasa casi inadvertida hasta que el vino está permanentemente afectado, hace que su control sea especialmente complicado (Zoecklein et al., 1995).

Como fue mencionado anteriormente la presencia de estos microorganismos pueda afectar de forma considerable la calidad del producto y esto se debe a la producción de compuestos aromáticos volátiles como el 4-etil fenol (E4F) y el 4-etil guayacol (E4G), los que se caracterizan por producir olores desagradables que afectan el producto final. Desde el punto de vista organoléptico, estos olores fenolados son catalogados como un fuerte olor animal, similar a establo o a sudor de caballo (Murat et al., 2007).

Cifras extraoficiales indican que hasta un 5% de la producción nacional se pierden producto del ataque de levaduras del género *Brettanomyces* cada año, que de acuerdo a las cifras de exportación de Viñas de Chile, considerando solo el vino embotellado correspondería a una pérdida que rodea a los US\$ 30.000.000 (Saavedra et al., 2005).

La actividad metabólica de las levaduras del género *Brettanomyces*, es la responsable de la aparición de estos compuestos fenólicos (E4F y E4G) que son producidos a partir de precursores del grupo de los ácidos hidroxinámicos, y en concreto de los ácidos *p*-

cumárico y ferúlico, los cuales están presentes en forma natural en mostos y vinos (Matthew *et al.*, 2003; Murat *et al.*, 2007; Carbo *et al.*, 2008).

La morfología celular del género *Brettanomyces* es ojival o cilíndrica, con gemación multipolar en reproducción vegetativa. Una de las características es su tamaño celular variable y formación de filamentos. En vinos siempre se observan células de menor tamaño que las que se podrían apreciar en medios de cultivos específicos para levaduras de este género. Las formas filamentosas son posible de apreciar en superficies sólidas, como en el caso de maderas de guarda, ya que estos filamentos permiten su adherencia (Navascués, 2007; Hidalgo, 2003).

El desarrollo de las poblaciones de las levaduras del género *Brettanomyces* se inicia posterior a la fermentación alcohólica. En este momento, y a partir del reducido número de células provenientes de la uvas y mostos, que durante la fermentación alcohólica no han tenido oportunidad de desarrollarse, debido a su baja competitividad con respecto a las levaduras que participan directamente en la fermentación alcohólica como lo son las levaduras del género *Saccharomyces*. Uno de los factores que ayudan a la proliferación de levaduras del género *Brettanomyces* es el bajo contenido de anhídrido sulfuroso presente en los vinos luego de finalizada la fermentación alcohólica (Navascués, 2007).

Según Navascués (2007), dependiendo del arranque más tardío de la fermentación maloláctica, la población de levaduras del género *Brettanomyces* será mayor, y aunque luego se corrija con aplicaciones de anhídrido sulfuroso, existe una mayor probabilidad de encontrar células viables dispuestas a producir alteraciones, sobre todo en la etapa de crianza de vinos. Durante este periodo las levaduras del género *Brettanomyces* que provienen del vino o que pueden permanecer en las maderas de las barricas, aumentan de manera lenta pero sin competencia.

Cabe que señalar que para se produzcan alteraciones en los vinos no son necesarias grandes poblaciones de estas levaduras ya que se ha constatado que con poblaciones de alrededor de

las 1000 células/mL ya se producen daños organolépticos apreciables en los vinos resultantes (Navascués, 2007).

La crianza evolutiva de los vinos en bodega, es una práctica tradicional en zonas de elaboración de vinos de calidad y que en la actualidad se ha extendido a gran parte de los territorios vitivinícolas del mundo. Durante esta etapa el vino experimenta gran cantidad de cambios que dan origen a un aumento en su estabilidad y una mejora de sus características organolépticas, debidos a fenómenos de clarificación espontánea, eliminación de dióxido de carbono, difusión lenta de Oxígeno a través de los poros presentes en la madera y cesión de compuestos presentes en la madera (Sanza, 2006; Zamora, 2003).

Como fue comentado anteriormente, uno de los puntos críticos para que se produzcan estas alteraciones provocadas por levaduras del género *Brettanomyces*, se provocan en la etapa de crianza del vino, por ello es necesario un gran control preventivo para evitar la contaminación de las bodegas, donde se debe prestar especial atención en su limpieza y desinfección, siguiendo algunos procesos estandarizados por la mayoría de las bodegas, estos son:

- *Limpieza y desinfección posterior a cada trasiego realizado.
- *Limpiezas a altas presiones.
- *En caso de sospecha de contaminación utilizar productos químicos de limpieza.
- *Combustión de pastillas de azufre.

Frente a esta constante necesidad de sanitización en los procesos de producción de vino y en un escenario donde la calidad juega un papel fundamental en la elaboración y exportación de este producto, se ha comenzado a realizar una serie de estudios para encontrar nuevos métodos de sanitización de los implementos de uso diario en la producción de vinos, algunos ejemplos de nuevas técnicas utilizadas son:

- * Inactivación de levaduras del género *Brettanomyces* por ultrasonido (Yap *et al.*, 2008).
- * Aplicación de ozono en solución acuosa (Colil, 2005).

* Aplicación de ozono en mezcla gaseosa.

En relación al uso de ozono en bodegas para la eliminación de levaduras del género *Brettanomyces* se ha comenzado a realizar distintos ensayos con el objetivo de comprobar la eficacia de este gas en la sanitización de los implementos utilizados en la elaboración del vino, como los realizados por Indura y Ecozone.

Desde el punto de vista químico el ozono (O_3), es una forma alotrópica del oxígeno, formado por 3 átomos de este elemento, cuya función más conocida es de protección frente a la peligrosa radiación ultravioleta del sol, pero también es un potente oxidante (Pérez, 2008).

Con respecto a su capacidad oxidante, esta molécula, de acuerdo a Seminario et al. (2007), constituye uno de los poderes oxidantes más poderosas que se conocen después del fluoruro, con una velocidad de reacción 3000 veces superior al cloro.

El potencial de reducción del ozono es de 2,07 voltios en tanto el del cloro es de 1,36 de aquí su gran diferencia en su velocidad de reacción. Es debido a este gran potencial de oxidación que el ozono es capaz de oxidar hierro, manganeso y otros metales pesados. Esta cualidad oxidante es la razón por la que se señala que el ozono posee una gran capacidad sanitizante y algunas de sus características según Seminario et al., (2007) son:

- * Los microorganismos son inactivados por el deterioro de sus constituyentes celulares lípidos de la pared celular, enzimas intracelulares y sus ácidos nucleicos.
- * No desarrollan resistencia. Su mecanismo de acción produce la destrucción de los microorganismos por lisis celular por lo que no puede desarrollar resistencia.
- * No es contaminante ya que el ozono se convierte rápidamente en oxígeno sin dejar residuos.
- * No causa problemas por la generación de compuestos indeseables.
- * Se produce in-situ por lo que no necesita de almacenamiento.
- * No necesita enjuague por lo tanto genera un ahorro en agua.

Por todo lo descrito anteriormente se ha establecido la siguiente hipótesis y objetivo:

Hipótesis:

La aplicación de ozono en mezcla con oxígeno disminuye significativamente la población de levaduras del género *Brettanomyces*.

Objetivo:

Evaluar la eficacia del ozono, en mezcla con oxígeno, en la eliminación de levaduras del género *Brettanomyces*.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de estudio

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Microbiología perteneciente al Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

Para la realización del estudio se utilizó madera de roble americano, en formato viniblock con un tostado grado medio, los cuales fueron facilitados por Tonelería Nacional. Las levaduras de *Brettanomyces Bruxellensis* seleccionadas para el estudio fueron las cepas CETC n° 1451 y CETC n° 1009 lote 2-4-2004, pertenecientes al cepario español.

Se utilizó un equipo de generación de ozono Pacific Ozone modelo G11 facilitado por Indura, el cuál posee una generación máxima de 12 g/h de Ozono, con una concentración de 37,5 g/m³ y una presión de trabajo mínima de 6 psi y máxima de 12 psi. Este equipo es alimentado por cilindros de oxígeno facilitados por la misma empresa.

Método

El estudio constó de 2 ensayos independientes cada uno de 6 tratamientos y 1 testigo, cada uno de ellos con 4 repeticiones, que se diferenciaron entre sí por tiempo de exposición al ozono, estos tiempos elegidos para realizar el estudio fueron determinados por medio de pre ensayos, los tratamientos también se diferenciaron por la presión de trabajo. Los tratamientos realizados detallan a continuación:

T1: Aplicación de ozono por 15 minutos a presión atmosférica.

T2: Aplicación de ozono por 15 minutos a una presión de trabajo de 1,8 bares.

T3: Aplicación de ozono por 17 minutos a presión atmosférica.

T4: Aplicación de ozono por 17 minutos a una presión de trabajo de 1,8 bares.

T5: Aplicación de ozono por 20 minutos a presión atmosférica.

T6: Aplicación de ozono por 20 minutos a una presión de trabajo de 1,8 bares.

Con respecto al tratamiento testigo el cual fue denominado T0 consto solo en bloques de madera contaminados con *Brettanomyces bruxellensis*, de ambas cepas elegidas para el estudio (1009 y 1451) los cuales no fueron sometidos a ningún tipo de aplicación de ozono.

Procedimiento:

La preparación del inóculo se llevó a cabo en un medio propicio para el crecimiento de las levaduras de *Brettanomyces* seleccionadas para el estudio, en este caso el medio seleccionado es un medio YEP, cuya composición es la siguiente (Manual de practico de microbiología enológica, 2008).

- 20 gramos de extracto de levadura
- 20 gramos de D (+) glucosa monohidratada.
- 10 gramos de peptona
- 15 gramos de agar-agar.
- 1000 mL de agua destilada.

Este medio obtenido fue esterilizado por medio de una autoclave a una temperatura de 121° C por 15 minutos y posteriormente gelificado en placas Petri desechables. Una vez gelificado el medio de cultivo se procederá a tomar con un haza una muestra del cepario (cepa 1009 y 1451) la cual será sembrada en las placas y puestas en una estufa durante 24 a 48 horas a una temperatura de 28° C.

Del crecimiento obtenido pasado este tiempo se extraerá una muestra la cual fue colocada en un activo de crecimiento (YEP Líquido) por 24 horas más en estufa a 37° C.

La inoculación de los bloques de madera se efectuó a través de la siguiente metodología:

- Al cultivo se le hizo un recuento en cámara de Neubauer para conocer la población presente.
- Luego de conocida la población presente se llevó a cabo la cantidad de diluciones necesarias para obtener una población de 1000 cel/mL con la cual se procedió a la inoculación de los bloques de madera.
- Los bloques de madera previamente esterilizados, por medio de autoclave, se colocaron en vasos precipitados con 150 mL de medio Ringer, el que posteriormente se inoculó con 1000 cel/mL. El medio Ringer es una solución salina que contiene cloruro de sodio, potasio, calcio y magnesio.
- Esta solución fue mantenida por 24 horas, a una temperatura constante de 37° C, para así permitir el ingreso de la solución por capilaridad.
- Pasadas las 24 horas se procedió a la aplicación de ozono, la cual se explica a continuación.

Para la aplicación de los tratamientos de ozono se utilizó un equipo Pacific Ozone modelo G11, capaz de aplicar 12 g/hora de ozono.

Un recipiente de acero inoxidable resistente a la presión contuvo los bloques de madera inoculados con *Brettanomyces*, lugar donde se hizo la aplicación de Ozono en estado gaseoso a los distintos tiempos y presiones anteriormente señaladas.

Terminadas las aplicaciones se midió el efecto superficial y subsuperficial que el ozono tuvo en la población de levaduras presentes en los bloques de madera.

Para medir el efecto superficial, los cubos de maderas tratados se sumergieron en 150 mL de medio Ringer estéril en vasos precipitados los cuales se agitaron por dos tiempos distintos (10 y 20 minutos), al cabo de estos tiempos se procedió a la siembra por agotamiento de 0,1 mL en placas con medio de cultivo YEP. El tiempo final de agitación fue precisado luego de hacer pre ensayos con estos tiempos, para así asegurar la completa extracción de las levaduras que quedaron en la madera luego de la aplicación del ozono, los tiempos utilizados en los pre ensayos fueron de 2, 5, 10, 20 y 25 minutos optando por los tiempos de 10 y 20 minutos ya que es en estos tiempos donde se produjo la total extracción de las levaduras presentes en las maderas.

Para evaluar el efecto subsuperficial que posee el ozono se realizó el siguiente procedimiento; los cubos de madera se rasparon con un rallador de cocina previamente esterilizado, por las 4 caras principales hasta una profundidad de aproximadamente de 4 mm, obteniéndose así, un fino polvo de roble al cual se le aplicó el mismo procedimiento explicado anteriormente (agitación por 10 y 20 minutos para extraer las levaduras presentes en este polvo).

Las placas sembradas, posteriormente fueron incubadas por una semana en estufas a 28°C, estas fueron sometidas a recuento de población a los cuatro y siete días para observar el crecimiento de colonias de levaduras del género *Brettanomyces*. Estos tiempos de medición fueron elegidos debido a que se observó que las levaduras presentes en las placas poseían una gran velocidad de crecimiento.

Variable a medir:

La variable a considerar es el crecimiento de UFC, durante el cultivo de las muestras extraídas después de las aplicaciones de ozono, durante una observación periódica de las placas Petri durante el lapso de una semana, para cada uno de los diferentes tratamientos.

Diseño experimental y Análisis estadístico:

El diseño del estudio será completamente al azar con estructura factorial de 3×2 (3 tiempos y 2 presiones), el que consto de 6 tratamientos cada uno con 4 repeticiones, para cada una de las cepas utilizadas en este estudio, donde la unidad experimental correspondió a 5 bloques de madera en formato Viniblock.

El análisis estadístico se realizo mediante un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis debido a la imposibilidad de normalizar los datos obtenidos, luego se analizo la interacción presente en los factores de estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La evaluación de efecto de las distintas aplicaciones de ozono a los bloques de madera que representaron el material experimental utilizado en esta investigación, se colectaron en dos oportunidades a los cuatro y siete días posterior a la aplicaciones de los tratamientos. Del análisis de los resultados se pudo determinar que los resultados obtenidos a los siete días representan de manera más confiable el efecto del ozono sobre el crecimiento de las levaduras por ello se decidió presentar y analizar los datos que se obtuvieron en la última medición, y así asegurarse que todas células que mantenían viabilidad pudieran ser detectas a pesar del lento crecimiento que es característico de *Brettanomyces bruxellensis*

Por otra parte se decidió analizar los resultados de forma separada para cada una de las cepas debido al problema que presentan las interacciones detectadas entre los factores en estudio, se opto por esta manera de desarrollar la presentación de resultados, ya que como se pudo observar, las diferencias entre las cepas fueron menores.

Para cada cepa se midieron los dos efectos esperados para las distintas aplicaciones de ozono, la primera para la superficie de la madera y una segunda, el efecto producido por el ozono a nivel subsuperficial ambos necesarios para estimar el real potencial que posee el ozono como sanitizante. Según Colil (2005), la adherencia de estas levaduras a la madera y en especial su ubicación dentro de las grietas y los poros presentes hacen muy complicada su eliminación, especialmente cuando este se aplica disuelto en agua. Es por ello que se opto por aplicaciones en medio gaseoso con la esperanza que penetrara de mejor manera por estos poros y erradicara las levaduras presentes en ellos especialmente si se recurría a la ayuda de la presión

Los resultados obtenidos a los 4 días posteriores a los tratamientos son presentados en el **Apéndice I** y **Apéndice II**, y son útiles para conocer las diferencias en el potencial de desarrollo que mostraron las cepas de esta levadura.

Efecto a nivel superficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1009

El principal objetivo de esta memoria no es saber el crecimiento que se logra a lo largo del tiempo, si no, el grado de eliminación que podemos obtener y así asegurar la inocuidad de las maderas utilizadas para la guarda, pero este es un dato interesante de analizar ya que proporciona algo más de conocimiento de cómo se comporta esta cepa de levadura y que mas adelante se verán las diferencias que esta puede tener con la cepa 1451 que fue la otra cepa elegida para complementar el desarrollo de la experiencia.

Durante el tiempo de incubación de esta cepa se detectó una gran velocidad de crecimiento de las colonias, la cual fue vista solo a través de la observación, no fue medida de manera cuantitativa, lo que permitiría inferir que es una cepa capaz de provocar grandes daños económicos en periodos de tiempos cortos, ya que este microorganismo ha sido clasificado como una levadura altamente deteriorante en todas las áreas de producción del vino y en todas las zonas productoras de esta bebida (Heresztyn, 1986).

Cuadro 1. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los 7 días.

Tratamiento	Conteo	Porcentaje de mortalidad
T0 ₁	2284 +/- 3,86	0
T1	906 +/- 62,5	60,33
T2	781,25 +/- 62,5	65,8
T3	218,75 +/-36,08	90,42
T4	78,13 +/-31,25	96,57
T5	46,88 +/- 31,25	97,94
T6	0 +/- 0	100

Conteo expresado en UFC/cm²

El **Cuadro 1** muestra el número de células viables detectadas en la superficie de la madera luego de aplicar las distintas modalidades de tratamiento. Los resultados expresan el efecto del tiempo de tratamiento sobre el grado de destrucción de la población inoculada en la madera. Al aumentar el tiempo de contacto del agente sanitizante con las células de

levaduras se observa claramente una mayor destrucción lo que se traducen en un menor número de UFC detectadas en los recuentos a los 7 días de las aplicaciones.

Por otra parte, la aplicación de presión ayudo también en una baja de la población que colonizaba superficialmente la madera, sin embargo, el tiempo de aplicación fue la principal causa de la destrucción de las células de levadura en la población en el estudio, esto quedará comprobado mas adelante cuando se analicen las interacciones detectadas y sus reales aportes a la erradicación de las células de *Brettanomyces* que colonizan la madera.

Como se observa, el porcentaje de eliminación fue mayor para los tratamientos que fueron expuestos a un mayor tiempo de aplicación de ozono en mezcla gaseosa, a su vez la presión mostró un efecto aditivo similar en todos los tratamientos bajo la condición de trabajo de 1,8 bares (T2, T4 y T6).

Estos datos obtenidos concuerdan con experiencias realizadas por empresas dedicadas al rubro y con una experiencia anterior realizada con agua ozonizada en la que los tiempos de exposición de una hora exhibieron mejores resultados que tiempos cortos (Colil, 2005).

Para corroborar lo anterior se procedió a hacer una prueba estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis), esto debido a que los datos no presentaron una distribución normal poco luego de aplicarles la transformación angular de Bliss, con esto se busco determinar el grado de efecto de cada unos de los factores que participaban en los tratamientos (tiempo de aplicación y presión de trabajo)

El test de Kruskal-Wallis realizado (**Apéndice III**), para el factor presión de trabajo (**Cuadro 9**) confirmo lo expuesto anteriormente, que la presión no ejerce un gran efecto en la eliminación de las levaduras de la cepa 1009 en la superficie de los bloques de madera.

En el **Cuadro 10 (Apéndice III)** se aprecia la gran importancia que posee el factor tiempo en el éxito de la experiencia, se ve claramente que las muestras expuestas a tiempos

mayores (17 y 20 minutos) muestran un mayor porcentaje de eliminación que la madera tratada con ozono gaseoso por 15 minutos. Estos datos reafirman y le aporta validación estadística al análisis realizado a los datos presentados en el **Cuadro 1**.

Las diferencias determinadas son del todo esperables ya que se pensó que mientras mayor sea el tiempo de contacto entre el ozono y las células de las levaduras deberá haber un mayor grado de destrucción de sus estructuras. Desde el punto de vista práctico es necesario ajustar el tiempo de tratamiento al menor valor posible ya que mientras mayor sea el tiempo de tratamiento, mas limitaciones operativas presentará.

Desafortunadamente de acuerdo a las condiciones de esta investigación solo los dos mayores tiempos de aplicación permiten obtener reducciones superiores al 90% , valor que podría ser considerado como suficiente para vinos secos y grados alcohólicos superiores a los 14° (Roberts, 2010).

Pero no solo es importante saber que acción genera cada uno de los factores que conformaron los tratamientos de forma separada, sino que también es necesario saber si se establecen interacciones entre sus efectos. Al no poder normalizarse los datos obtenidos de la experiencia, el análisis de sus interacciones fue posible de realizar solo de forma gráfica, lo que permite modelar el efecto de los factores, considerados de manera conjunto.

Básicamente la **Figura 1** nos muestra como fue el efecto en respuesta a la acción conjunta de los dos factores integrantes de los tratamientos. Es así que para el efecto de la presión versus tiempo las diferencias a un mismo tiempo son casi nulas. En el caso del tiempo vs presión se ve claramente que para ambas presiones de trabajo la adición de tiempo fue claramente más efectiva en la eliminación de las levaduras contaminantes.

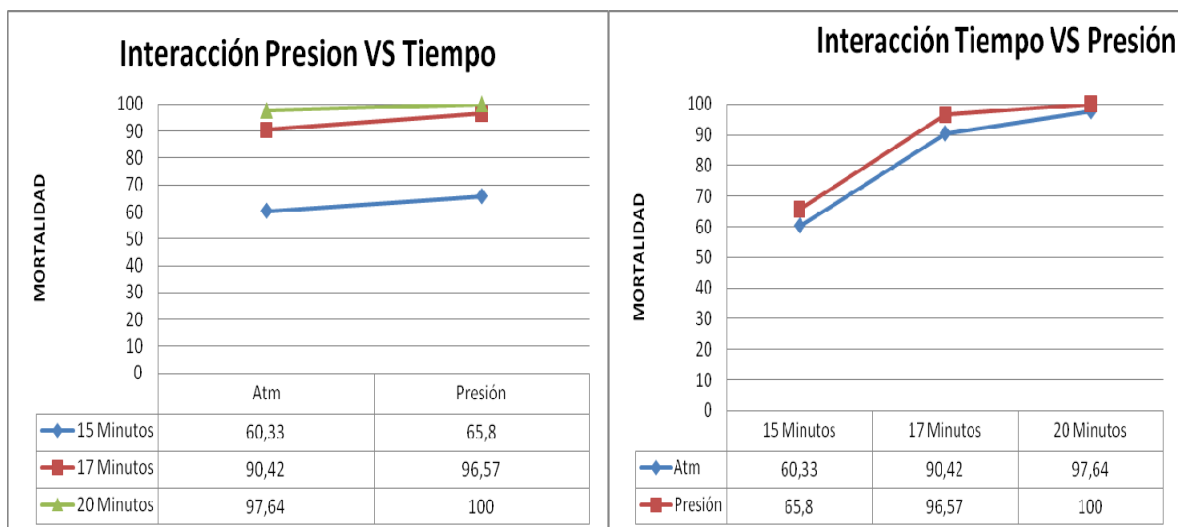


Figura 1. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo.

Efecto a nivel Subsuperficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1009

Como es sabido la importancia de esta levadura radica en su difícil eliminación una vez que la madera de guarda se encuentra contaminada, esto se debe a que esta levadura es capaz de introducirse por los poros de la madera y aprovechar los azúcares que esta le puede aportar, es por esta razón que es relevante conocer como el gas es capaz de penetrar a través de los poros y lograr entrar en contacto con la levadura y así lograr su eliminación.

La mayoría de las bodegas en Chile presentan contaminaciones de *Brettanomyces* y a pesar de los variados sistemas de lavados de barricas que se utilizan la contaminación persiste, esto debido a que la mayoría de los sistemas de lavados no penetran a través de los poros no logrando eliminar estas colonias remanentes que causan un gran daño económico a la industria.

Cuadro 2. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los 7 días.

Tratamiento	Conteo	Porcentaje de mortalidad
T0	4687 +/- 4,69	0
T1	2304,68 +/- 322,12	57,22
T2	585,93 +/- 149,60	87,49
T3	312,5 +/- 0	93,3
T4	195,31 +/- 78,12	95,83
T5	273,43 +/- 78,12	94,16
T6	39,06 +/-78,13	99,16

Conteo expresado en UFC/cm³

El **Cuadro 2** muestra (crecimiento promedio) el número de células viables situadas en la profundidad de la madera luego de las distintas modalidades de aplicación de ozono

En este caso si se comparan tratamientos a un mismo tiempo de exposición, por ejemplo T1 (aplicación de ozono por 15 minutos a presión atmosférica) y T2 (aplicación de ozono por 15 minutos a presión de 1,8 bares), la adición de presión mostró una mejora notable en el nivel de destrucción celular.

El aumento en el tiempo de exposición también mejoró el efecto esto quedó demostrado en el cuadro anterior donde se muestra el efecto producido por el ozono frente a la muerte celular expresado en porcentaje respecto al valor de la población presente en la madera sin tratar

La mortalidad celular determinada fue mayor en todos los tratamientos que consideraron la aplicación del ozono bajo presión (T2, T4 y T6).

Donde mejor se aprecia el efecto que posee la presión es en lo ocurrido entre T1 (aplicación de ozono por 15 minutos a presión atmosférica) y T2 (aplicación de ozono por 15 minutos a presión de 1,8 bares), donde el grado de eliminación fue notablemente mayor llegando a poseer una diferencia de un 30,27%, en los siguientes casos la diferencia no fue tan amplia pero se vio en algo mejorada con la acción de la presión. Los resultados anteriores permiten

afirmar que la hipótesis respecto a que la presión debería mejorar la penetración del ozono en la profundidad de madera, ayudando de esta manera a mejorar su efectividad, es cierta.

Este mejoramiento del efecto en el caso del tiempo de aplicación más prolongado logro una erradicación del 99,16% de las células que colonizaban la madera, número que bajo las condiciones de la investigación (población inoculada) debe considerarse como elevado, demostrando la elevada efectividad de este tratamiento.

La aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis a los resultados obtenidos (**Apéndice III**), permiten afirmar que las aplicaciones bajo presión presentan una diferencia de significancia estadística respecto de la aplicación a presión atmosférica (**Cuadro 11**). Esto confirma lo visto en la **Cuadro 2** donde claramente se observó que la adición de presión sobre todo en T1 y T2 que fueron los tratamientos expuestos a menor tiempo al agente sanitizante, ayudo en un gran porcentaje a eliminar las células de esta cepa presentes en los poros de la madera.

El **Cuadro 12 (Apéndice III)** muestra los resultados entregados por el test de Kruskal-Wallis al aplicarlo a los datos agrupados de acuerdo a los distintos tiempos de aplicación. El análisis deja de manifiesto claramente que la longitud del tiempo de aplicación tiene un efecto sobre la efectividad del tratamiento siendo mucho más efectivo en los tratamientos que consideraron un mayor tiempo (17 y 20 minutos con respecto a los 15 minutos).

Al igual que lo expresado anteriormente al analizar el efecto del ozono a nivel superficial, es necesario determinar si cada factor actúa por separado y si es su interacción la que explica el grado de efecto exhibido por los distintos tratamientos. Con este propósito, se evaluó la posible ocurrencia de interacción entre los factores integrantes de las distintas formas de aplicación en la **Figura 2**.

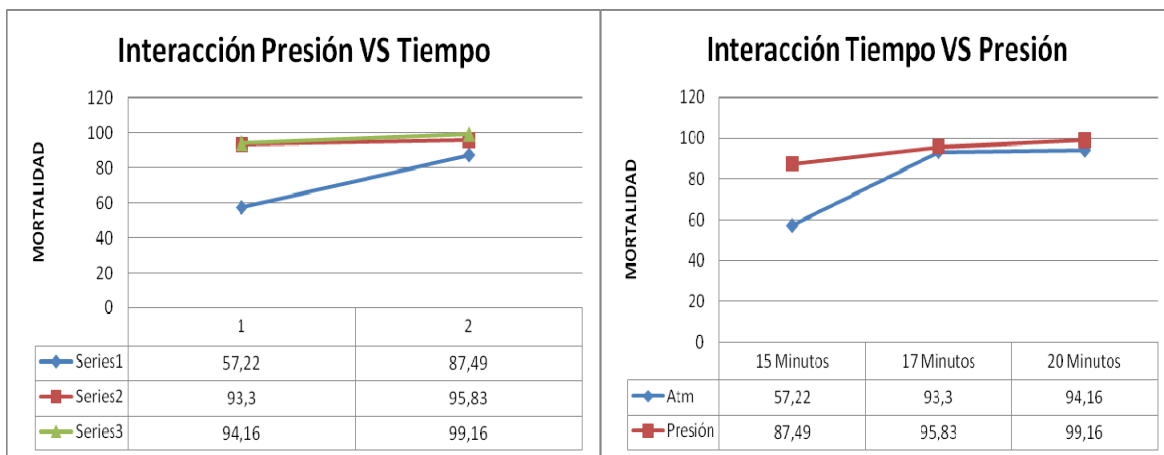


Figura 2. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo.

Los gráficos que representan la interacción (**Figura 2**) presentó que solo para el tiempo menor el factor presión ejerció una diferencia tal que provoca que el análisis estadístico presente una diferencia significativa, a pesar de que los dos tiempos mayores de exposición también la adición de presión presenta una mejora en la eliminación esta no es tan radical.

De manera general se puede señalar que es factible erradicar completamente las células que colonizan la madera por esta cepa de *Brettanomyces* mediante un tratamiento de la misma que considere un tratamiento mediante ozono gaseoso por 20 minutos y bajo una presión de 1,8 bares. Esto último desde el punto de vista de la aplicación en terreno es importantísimo ya que ocupando esta combinación de factores produciríamos la total esterilidad de las maderas y con esto la seguridad completa del vino en su etapa de guarda, siempre que este esté libre de contaminación con esta levadura.

Efecto a nivel superficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1451

La cepa 1451 mostró, durante su tiempo de incubación, una velocidad de crecimiento menor que su par la cepa 1009, esto quedó verificado por el menor número de colonias formadas y el menor tamaño que poseían estas colonias en el cultivo realizado. Esta observación concuerda con lo realizado por Roberts (2010).

Cuadro 3. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 7 días.

Tratamiento	Conteo	Porcentaje de mortalidad
T0	996,5 +/- 3,11	0
T7	203,12 +/- 31,25	70,58
T8	187,5 +/- 51,03	81,18
T9	203,12 +/-31,25	70,58
T10	125 +/- 0	87,56
T11	62,5 +/- 72,17	93,72
T12	0 +/- 0	100

Conteo expresado en UFC/cm²

Al observar el **Cuadro 3** se vio un menor crecimiento cuantitativo de células viables en comparación a lo observado en la cepa 1009 (**Cuadro1**).

La significancia de este cuadro es que muestra que el aumento del tiempo de exposición y la adición de presión provoca una mayor destrucción de las células lo que se traduce en un menor número de colonias presentes en los recuentos realizados a los 7 días luego de las aplicaciones de ozono.

Según otro estudio realizado por Roberts (2010), la cepa 1451 posee una menor resistencia que la cepa 1009 hacia distintos agentes restrictivos como el anhídrido sulfuroso y el alcohol presente en los vinos, con lo cual se inferiría que estas levaduras también presentarían menor resistencia hacia el ozono.

El **Cuadro 3** muestra que esta levadura posee un grado de resistencia menor que la cepa 1009, si se compara en lo sucedido en los menores tiempos de aplicación (T1 y T2), pero mantiene la misma tendencia en los mayores tiempos de aplicación.

El efecto de la presión no fue notoriamente entre T11 y T12 pero si entrego mejores resultados que todas las combinaciones restantes en el estudio. Cabe mencionar que donde mejor se apreció el efecto aditivo de la presión fue en los tratamientos T8 y T10.

Para corroborar los datos fueron sometidos a un test de Kruskal-Wallis (**Apendice IV**) para obtener el grado de significancia que tuvo cada uno de los factores presentes, en la eliminación de la cepa 1451.

A pesar de que el factor presión de trabajo en la práctica arroja un mejor resultado, estadísticamente este factor no produciría un gran efecto (**Cuadro 13**). Esto es comprensible revisando el **Cuadro 3**, donde la presión de trabajo no es la que proporciona la mayor diferencia entre las mortalidades de los distintos tratamientos efectuados dentro de un mismo tiempo de exposición, a excepción de lo ocurrido entre los tratamientos T8 y T10 como se mencionó anteriormente.

El factor tiempo de exposición es el que juega el rol predominante en la acción del ozono en la eliminación de las células de esta cepa. Al igual que lo ocurrido para la cepa 1009 la duración del tratamiento resulto clave para el éxito en la erradicación total de las células presentes (**Cuadro 14**).

Se puede apreciar una diferencia entre ambas cepas de levadura utilizadas, en que la cepa 1451 presenta una menor resistencia al ozono a un tiempo menor de exposición pero tienden a equipararse a los mayores tiempos de exposición.

Las diferencias observadas son las esperadas para esta experiencia, ya que se plantea que mientras más larga sea la duración de la aplicación, las muestras contaminadas deberán tener un mayor contacto con el agente sanitizante y así obtener un mayor grado de destrucción de sus estructuras celulares (Colil, 2005).

De acuerdo a las condiciones en las que se produjo esta investigación los mejores resultados obtenidos (sobre un 90% de eliminación), solo se apreciaron en el tiempo de mayor de exposición.

Para comprender de mejor manera como actuaron estos factores en la eliminación obtenida a lo largo del ensayo, es imprescindible conocer como estos actuaron en conjunto, conocer

si se potenciaron o no para esto la **Figura 3**, explica como estos factores interactúan entre ellos.

Los gráficos de interacción son de gran utilidad para comprender como los factores presentes en la experiencia se conjugan y mejoran los resultados de esta. La **Figura 3** mostró que la presión siempre mejoro la acción del ozono en un mismo tiempo, solo en el mayor tiempo de exposición (20 minutos) la acción de la presión fue menor. Si uno observa como se comporta el tiempo de exposición, se aprecia claramente que este mejora de mayor manera la eliminación a cualquier presión de trabajo con lo cual se comprueba lo analizado anteriormente en los test de Kruskal-Wallis realizados, donde se afirma que el factor de mayor importancia es el tiempo de exposición.

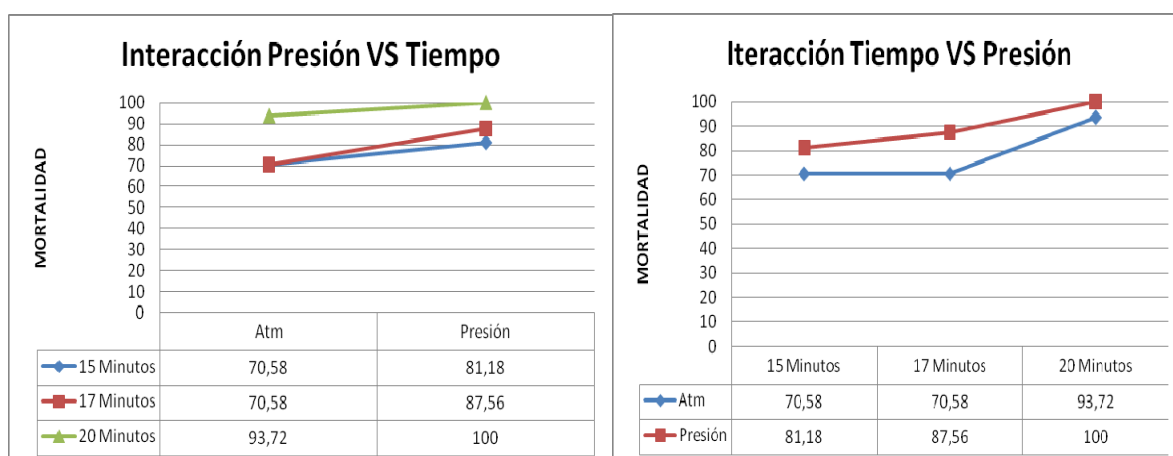


Figura 3. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo.

Efecto a nivel subsuperficial de los tratamientos de ozonización sobre la cepa 1451.

Al igual que lo analizado para el caso de la cepa 1009 es necesario conocer el comportamiento que la cepa 1451 posee a nivel subsuperficial de la madera.

Cuadro 4. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 7 días.

Tratamiento	Conteo	Porcentaje de mortalidad
T0	1339,5 +/- 4,20	0
T7	625 +/- 180,42	53,34
T8	273,43 +/- 149,6	79,58
T9	429,68 +/- 78,12	67,92
T10	195,31 +/- 149,6	85,41
T11	429,68 +/- 196,61	67,92
T12	0 +/-0	100

Conteo expresado en UFC/cm³

La respuesta obtenida por esta cepa es interesante de analizar ya que representa de mejor manera lo esperado en un principio, donde el mayor efecto de eliminación fue producido gracias a la adición de presión a un mismo tiempo. En el cuadro también se aprecia que la eliminación de células viables presentes en los distintos tiempos de aplicación bajo las mismas condiciones de presión (T7, T9 y T11), no se produjo una gran diferencia en el crecimiento obtenido por las células.

Para los tratamientos (T8, T10 y T12) en los cuales se añadió el uso de presión (1,8 bares), el conteo de levaduras viables presentes fue considerablemente menor, tanto así, que para el tratamiento T12 no se apreció crecimiento cuantificable en el periodo de incubación.

En comparación a lo visto para el mismo efecto en la cepa 1009 se noto el menor crecimiento que posee la cepa 1451, pero no significa que sea menos resistente, solo que

sus cinéticas de crecimientos son diferentes (apreciable en los conteos realizados a sus tratamientos testigos).

Como se observa en el **Cuadro 4**, el porcentaje de mortalidad que tuvo la cepa 1451, bajo condiciones de presión atmosférica (T7, T9 y T11) son notoriamente inferiores a los obtenidos en los tratamientos en los cuales se adiciono la condición de trabajo de 1,8 bares de presión (T8, T10 y T12), en especial el tratamiento T12 donde se logro la completa eliminación de las células de *Brettanomyces* bajo las condiciones presentes en este estudio.

Con respecto a los tiempos de aplicación, no se apreció una gran diferencia entre los tratamientos expuesto a las mismas condiciones, para corroborar esto se procedió a realizar una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para cada uno de los factores involucrados en la respuesta obtenida (**Apendice IV**).

El resultado obtenido a partir del Test realizado al factor presión (**Cuadro 15**) manifestó que posee una alta significancia en los efectos obtenidos en la eliminación de células de la cepa 1451 a nivel subsuperficial.

Se observo a partir del **Cuadro 16 (Apéndice IV)**, que las medianas obtenidas son claramente diferentes, siendo mayor el porcentaje de eliminación en el caso de las que se trabajaron bajo presión, con esto se corrobora lo mencionado en el **Cuadro 4**.

El test de Kruskal-Wallis realizado para el factor tiempo de exposición, mostro que este factor no posee una significancia estadística importante para los resultados obtenidos en el ensayo. Si comparamos estos resultados con todos los anteriores test realizados al factor tiempo de exposición, es en el único caso en que el tiempo de exposición al ozono no ejerce una diferencia importante en el resultado obtenido.

Lo mencionado anteriormente queda bien demostrado en la **Figura 4** donde por las pendientes del grafico se ve el real aporte que estos factores poseen en su interacción.

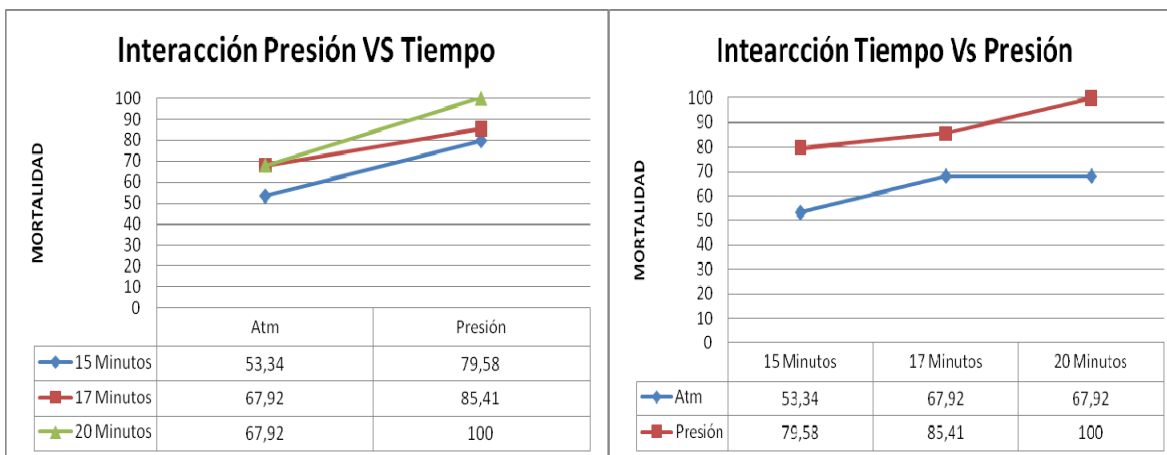


Figura 4. Interacción de los factores tiempo de exposición y presión de trabajo.

En esta figura se aprecia claramente que el factor presión es la que otorga la gran mejoría obtenida en la eliminación de levaduras de la cepa 1451.

Del grafico presentado también se desprende que la mejor combinación (obtener mejor resultado), es el trabajo bajo presión de 1,8 bares y a un tiempo de exposición de 20 minutos donde se obtiene un 100% de eliminación, y con esto se puede asegurar la completa esterilidad de la madera y por lo tanto que el vino que se guarde en ella no será contaminado y de que producirse una contaminación se deberá observar la sanidad que trae la uva de campo o la higiene de los elementos de trabajo en la bodega.

CONCLUSIONES.

Bajo las condiciones en que se realizo este estudio, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

Las dos cepas de *Brettanomyces bruxellensis*_utilizadas en el estudio poseen distintas velocidades de crecimiento poblacional, lo que indicaría que el tiempo en que pueden afectar las características de los vinos es también diferente.

Esta diferencia apreciada en la velocidad de crecimiento de las cepas, no se relaciono con su sensibilidad frente al ozono, ya que en condiciones iguales de aplicación los porcentajes de mortalidad para ambas cepas fueron de igual magnitud.

El tiempo de exposición al ozono fue fundamental para obtener los resultados deseados. Los mejores resultados se obtuvieron con tiempos de aplicación entre los 17 y 20 minutos alcanzando un 100% de eliminación de las levaduras presentes.

Las diferentes presiones utilizadas en la aplicación no mostraron diferencia en la destrucción de las células de levaduras situadas en la superficie de la madera pero mostraron un efecto claro frente a las poblaciones situadas en la madera a nivel subsuperficial. En esta caso, la aplicaciones bajo presión de 1,8 bares, permitieron erradicar completamente la poblaron que colonizaba la madera otorgando un 100% de mortalidad de las colonias de levaduras, asegurando así la completa esterilidad de los bloques de madera utilizados en esta investigación.

De lo anterior se concluye que el ozono posee una alta capacidad sanitizante, con la ventaja de no generar residuos por lo que es un tratamiento recomendable para la sanitización efectiva de barricas de madera contaminada por levaduras *Brettanomyces sp.*

BIBLIOGRAFÍA

CARBÓ. R., M. GINOVART, y M. VIAS.2008. Influencia de *Brettanomyces* en la evolución de la fermentación alcohólica. II Congreso Iberoamericano de Seguridad Alimentaria; V Congreso Español de Ingeniería de los Alimentos, Barcelona, España. 1-6 p.

CHATONNET, P; DUBORDIEU, D. and BOIDRON, J. N.1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera spp.* Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. Am. J. Enol. Vitic, 46 (4): 463-468.

COLIL,F .2005. Efectos del uso de ozono en barricas de roble para el control de *Brettanomyces spp.* Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo Mención Enología y Vitivinicultura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 44p.

FUGELSANG, K., ZOECKLEIN, W., 2003. Populations dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. Am. J. Enol. Viticult. (54): 294–300.

HIDALGO. J. 2003. Tratado de Enología. Ed Mundi-Prensa, Madrid, España. 1423p

LOUREIRO. V and M. MALFEITO-FERREIRA. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. (86): 23–50.

MATTHEW. P., M. KELLY and G. BALDWIN.2003. Mannaging Brett. The Australian and New Zealand Wine Industrial Journal. 18(3). 1-6p

MURAT. M., E.GINDREAU y F.DUMEAU. 2007. Prevención del riesgo de *Brettanomyces* a través de la utilización de herramientas analíticas innovadoras y de la

gestión rigurosa del proceso de elaboración. Laboratorio SARCO, filial de investigación de la empresa Laffort Œnologie, Bordeaux, Francia. 1-7p.

NAVASCUES. E. 2007. *Brettanomyces/Dekkera*: control y detección en bodegas. ACE: Revista de enología, ISSN 1697-4123, (78).

PÉREZ. M. 2008. Soluciones con ozono en la industria vitivinícola. Proyectos I+D, Cosemar-Ozono. Disponible en: http://www.cosemarozono.es/pdf/servicios_31.pdf. Leído el 07 de Octubre 2011

ROBERTS. N. 2010. Efecto de grado alcohólico y concentración de anhídrido sulfuroso sobre el desarrollo de *Brettanomyces bruxellensis* y *Zygosaccharomyces bailli* en el vino tinto. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo Mención Enología y Vitivinicultura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 32 p.

SAAVEDRA. D., D. GODOY., C. NARVÁEZ. , S. ZEPEDA., M. URRUTIA., P.BREVIS y E. Reyes. 2005. *Brettanomyces*, un contaminante en nuestras viñas. Ciencia y Trabajo. 7 (17): 93-96p.

SANZA. M. 2006. Sistemas alternativos al envejecimiento en barricas. ACE: Revista de enología. ISSN 1697-4123, (74).

SEMINARIO. L., J. ACUÑA y S. WILLIAMS. 2007. El ozono y su aplicación en la conservación de alimentos. Revista Ciencia Ahora. 19(10): 1-7 p.

YAP. A, F. SCHMID., V. JIRANEK., P. GRBIN y D. BATES. 2008. Inactivation of *Brettanomyces/Dekkera* in wine barrels by high power ultra sound. Wine industrial Journal.23(5):32-40p.

ZAMORA. F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. Ed Mundi-Prensa, Madrid, España. 224p.

ZOECKLEIN. B., FUGELSANG, K., GUMP. B. and NURY. F. 1995. Wine analysis and production. Ed. Chapman and Hall, New York. 621 p.

APENDICE I

Cuadro 5. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los días. (Superficial).

Tratamiento	Conteo
T0	1322,5 +/- 5,44
T1	562,5 +/-88,38
T2	718,75 +/- 62,5
T3	125 +/- 0
T4	0 +/-0
T5	0 +/- 0
T6	0 +/- 0

Conteo expresado en UFC/cm²

Cuadro 6. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1009 a los 4 días. (Subsuperficial)

Tratamiento	Conteo
T0	3647,25 +/- 6,18
T1	1328,12 +/- 201
T2	468,5 +/- 0
T3	0 +/- 0
T4	0 +/- 0
T5	234,37 +/- 156,25
T6	39,06 +/- 78,12

Conteo expresado en UFC/cm³

APENDICE II

Cuadro 7. Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 4 días.

Tratamiento	Conteo
T0	535 +/-5,65
T7	46,87 +/- 59,83
T8	156,25 +/- 62,5
T9	15,62 +/-31,25
T10	109,37 +/- 59,83
T11	31,25 +/- 36,08
T12	0 +/- 0

Conteo expresado en UFC/cm²**Cuadro 8.** Crecimiento promedio alcanzado por la cepa 1451 a los 4 días.

Tratamiento	Conteo
T0	881,75 +/- 7,9
T7	390 +/- 90
T8	0 +/- 0
T9	117,18 +/- 149,59
T10	39,06 +/- 78,12
T11	195,31 +/- 149,59
T12	0 +/- 0

Conteo expresado en UFC/cm³

APENDICE III

Cuadro 9. Efecto de la presión de trabajo (Test de Kruskal-Wallis).

Presión	N	Median	Clasificación del Promedio	Z	
Atm	12	93,36	10,2	-1,59	n.s
P	12	97,96	14,8	1,59	n.s
General	24		12,5		

n.s.: Sin significancia estadística ($p > 0,05$).

Cuadro 10. Efecto del tiempo de aplicación (Test de Kruskal-Wallis).

Tiempo	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z	
15	8	65,83	4,5	-3,92	C
17	8	96,6	13,1	0,31	B
20	8	99,33	19,9	3,61	A
General	24		12,5		

Las letras mayúsculas distintas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) dentro del factor

Cuadro 11. Efecto de la presión de trabajo (Test de Kruskal-Wallis).

Presion	N	Mediana	Clasificación del Promedio	Z	
Atm	12	95,22	8,8	-2,54	B
P	12	98,34	16,2	2,54	A
General	24		12,5		

Las letras mayúsculas distintas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) dentro del factor.

Cuadro 12. Test de Kruskal-Wallis para factor tiempo de exposición.

Tiempo	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z	
15	8	81,66	5	-3,67	C
17	8	97,51	15,6	1,53	B
20	8	98,34	16,9	2,14	A
General	24		12,5		

Las letras mayúsculas distintas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) dentro del factor.

APENDICE IV

Cuadro 13. Test de Kruskal-Wallis para factor presión de trabajo.

Presión	N	Mediana	Clasificación del Promedio	Z	
Atm	12	88,35	10,8	-1,18	n.s
P	12	93,78	14,2	1,18	n.s
General	24		12,5		

n.s.: Sin significancia estadística ($p > 0,05$).

Cuadro 14. Test de Kruskal-Wallis para factor tiempo de exposición.

Tiempo	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z	
15	8	86,75	5,5	-3,43	C
17	8	91,03	11,5	-0,49	B
20	8	98,45	20,5	3,92	A
General	24		12,5		

Las letras mayúsculas distintas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) dentro del factor.

Cuadro 15. Test de Kruskal-Wallis para factor presión de trabajo.

Presión	N	Mediana	Clasificación del Promedio	Z	
Atm	12	71	6,5	-4,16	B
P	12	94,18	18,5	4,16	A
General	24				

Las letras mayúsculas distintas indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) dentro del factor.

Cuadro 16. Test de Kruskal-Wallis para factor tiempo de exposición.

Tiempo	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z	
15	8	78,95	9,2	-1,62	n.s
17	8	85,48	13,2	0,34	n.s
20	8	91,27	15,1	1,29	n.s
General	24		12,5		

n.s.: Sin significancia estadística ($p > 0,05$).