

Inactivación *in vitro* de patógenos alimentarios mediante radiación UV-C

Santos Mercedes-Cardenas* ; Gianella Chávez-Segura; Gustavo Rodríguez-Ramos; Annel Cadillo-Solano; Deysi Valdiviezo-Quipuscoa

Estudiantes de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Perú. santoslmercedes@gmail.com

Mentor: Ricardo Vejarano, Dr.

Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Perú. ricardo.vejarano@upn.edu.pe

Resumen- El objetivo del trabajo fue evaluar (*in vitro*) el efecto antimicrobiano de la luz ultravioleta-C (UV-C) contra los patógenos *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. Se obtuvo una inhibición total tras 1 minuto de tratamiento para ambas bacterias. Nuestros resultados sugieren el potencial de esta tecnología contra agentes patógenos alimentarios como alternativa a los tradicionales tratamientos térmicos de conservación de alimentos.

Palabras clave: tratamiento con ultravioleta-C, patógenos transmitidos por alimentos, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

Abstract- The aim of this work was to evaluate (*in vitro*) the antimicrobial effect of ultraviolet-C (UV-C) light against the pathogenic bacteria *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. A total inhibitory effect was obtained at 1 minute of treatment for both bacteria. Our results suggest the potential of this technology against food-borne pathogens for food preservation as alternative to traditional thermic treatments.

Keywords: Ultraviolet-C treatment, food-borne pathogens, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

I. INTRODUCCIÓN

La industria actual está encaminada al diseño e implementación de sistemas que permitan controlar diversos parámetros en los alimentos como composición química, atributos sensoriales y presencia de contaminantes, especialmente los contaminantes de origen biológico. Los alimentos están expuestos a diferentes fuentes de contaminación durante la producción, distribución y preparación. Un deficiente control a lo largo de la cadena alimentaria podría generar enfermedades transmitidas por los alimentos, razón por la cual es importante asegurar la ausencia de agentes potencialmente dañinos como bacterias, hongos, toxinas, virus y parásitos [1].

Las enfermedades transmitidas por alimentos son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de personas en el mundo [2], observándose un incremento considerable en los últimos 30 años [3]. Según la Organización Mundial de la Salud [4], cada año se enferman alrededor de 600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados y 420000 mueren por esta misma causa. Se estima que el 42% de enfermedades alimentarias son causadas por microorganismos contaminantes, principalmente bacterias patógenas [5].

Entre los patógenos más comunes se encuentran *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., entre otros [6,7], muchos de los cuales tienen la capacidad para sobrevivir en alimentos con baja humedad [8]. Por ejemplo, *Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino humano, causando infecciones graves tras su ingesta a través de alimentos contaminados con materia fecal. Los síntomas que genera esta bacteria incluyen calambres abdominales y diarrea, y en algunos casos hasta diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) [7].

Dentro de los tratamientos convencionales para eliminar estas bacterias patógenas de los alimentos destacan la pasteurización y la esterilización. No obstante, estos tratamientos presentan algunos inconvenientes como la alteración química de alimentos ricos en vitaminas, compuestos bioactivos y otras moléculas termosensibles [9], motivo por el cual es más recurrente la búsqueda de tecnologías alternativas que minimicen estos inconvenientes.

Una de las tecnologías emergentes con potencial para la inactivación de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., entre otros, es la radiación ultravioleta (UV), especialmente la radiación UV-C, aplicable en alimentos como harina refinada, derivados de papa, agua de coco, jugos de pomelo, piña, manzana, tomate, etc. [10,11,12,13].

El aumento de enfermedades producidas por alimentos y la necesidad de aplicar tecnologías emergentes que minimicen la alteración y pérdida de calidad de los alimentos constituye el punto de partida para llevar a cabo este trabajo de investigación, cuyo objetivo fue evaluar la inactivación *in vitro* de las bacterias patógenas *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* mediante radiación UV-C.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Sistema de irradiación UV

Se utilizó un sistema de irradiación como el mostrado en la Fig. 1, el cual consistió de una cámara de 30 x 20 x 30 cm,

Digital Object Identifier: (to be inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).

cubierta internamente con papel de aluminio a fin de aprovechar al máximo la radiación.

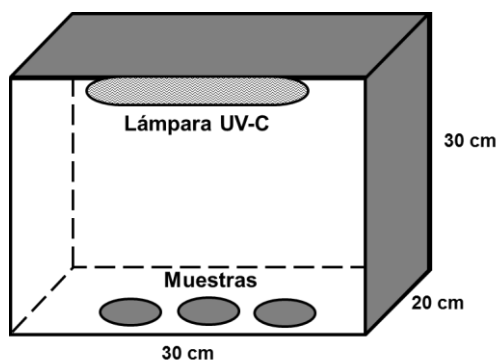


Fig. 1 Esquema del sistema de irradiación utilizado para inactivar a las bacterias *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

En la parte superior de la cámara fue montada una lámpara UV (Ilumedic, Estados Unidos) de intensidad de radiación $0.654 \pm 0.04 \text{ J/cm}^2$ (medida mediante un radiómetro UVP modelo UVX, Fig. 2). La lámpara fue ubicada a 30 cm de distancia de la zona porta-muestras (parte inferior de la cámara), trabajando a longitud de onda de 253.7 nm (UV-C), considerada la de mayor poder germicida [14].



Fig. 2 Radiómetro utilizado para medir la intensidad de radiación ultravioleta de la lámpara.

B. Preparación de muestras a irradiar

El ensayo se llevó a cabo en condiciones *in vitro*. Como medios de cultivo se utilizó agar *Salmonella-Shigella* (*Salmonella* spp.) o agar Mac Conkey (*Escherichia coli*), en los cuales se sembraron las respectivas bacterias.

Previamente, ambas bacterias fueron sembradas para su crecimiento en caldo lactosado, en tubos de ensayo de 15 mL. Los tubos de ensayo fueron incubados a 37 °C por 48 horas. Tras lo cual 25 µL de suspensión de cada tubo de ensayo fueron dosificados en las placas conteniendo el respectivo medio sólido para cada bacteria, procediendo a expandir uniformemente por la superficie con la ayuda de un asa de Drigalsky.

Posteriormente, las placas inoculadas con las bacterias fueron irradiadas en la cámara UV de acuerdo a los tiempos mostrados en la Fig. 3 (primera etapa), a fin de comparar estos tiempos de tratamiento con los reportados en otros estudios previos.

Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas, y transcurrido ese periodo se procedió a verificar el crecimiento o inactivación de la respectiva bacteria.

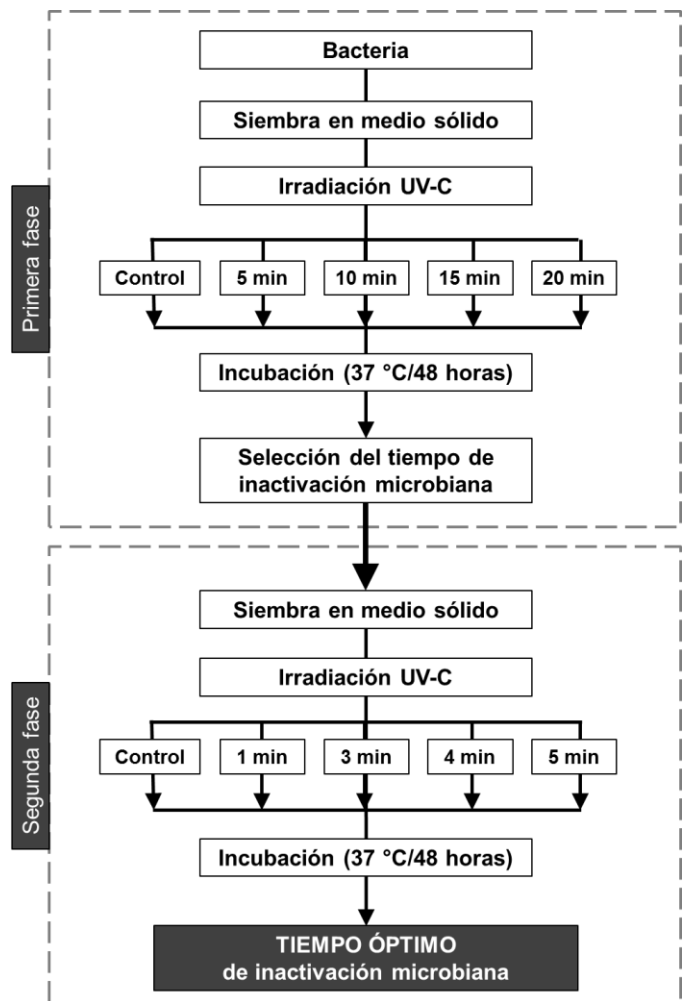


Fig. 3 Esquema experimental para determinar el tiempo de inactivación de las bacterias *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* mediante radiación UV-C.

C. Determinación del tiempo óptimo de inactivación bacteriana

De acuerdo a la Fig. 3, en la primera fase se llevó a cabo una prueba inicial en la cual se sometió a ambas bacterias a tiempos de irradiación de 5, 10, 15 y 20 minutos. Además de un control (C+, placa inoculada sin irradiar). En esta fase se buscaba el menor tiempo de tratamiento que permitiese una inactivación total de las bacterias, el cual se tomaría como el tiempo máximo de tratamiento para la segunda fase. Los resultados obtenidos mostraron que un tiempo de 5 minutos en

esta primera fase sería suficiente para inactivar las células bacterias.

Se procedió a ejecutar la segunda fase, en la cual se evaluaron tiempos de irradiación menores a 5 minutos. Los resultados obtenidos en esta fase permitieron determinar el tiempo óptimo de irradiación, es decir el tiempo en el cual la respectiva bacteria fue totalmente inactivada mediante radiación UV-C. Además, en esta fase se hicieron los recuentos de colonias bacterianas en la superficie de los respectivos medios sólidos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las limitaciones de la radiación UV en el tratamiento de alimentos es que su acción germicida se da a nivel de superficie en las muestras tratadas, motivo por el cual se trabajó en condiciones *in vitro* y sobre superficies homogéneas, como son los medios sólidos, a fin de evaluar la eficacia de esta radiación frente a las dos especies de bacterias patógenas estudiadas: *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

No se consideró la utilización de muestras reales de alimentos, dado que de acuerdo a la bibliografía consultada, la composición del alimento, así como su estructura, pueden interferir con la acción de la radiación incidente, pudiendo requerir mayores dosis de las necesarias. Además, se conoce que el poder germicida de la radiación UV depende de otros parámetros como la dosis de radiación, la distancia desde la fuente de luz hasta la muestra, el tiempo de exposición, así como la naturaleza propia de cada microorganismo [15].

A. SELECCIÓN DEL TIEMPO DE INACTIVACIÓN BACTERIANA

En el presente estudio se tomó como único parámetro de evaluación el tiempo de contacto entre la radiación UV-C y las células bacterianas, considerando que el efecto de la radiación UV depende del tiempo de exposición del ADN microbiano [16], el cual puede sufrir alteraciones en su composición química y por tanto perder su funcionalidad, detener la normal división celular, y en última instancia provocar la muerte bacteriana.

La Fig. 4 muestra los resultados luego de irradiar ambas cepas bacterianas durante 5, 10, 15 y 20 minutos. De acuerdo a los resultados obtenidos, bajo las condiciones del estudio bastaría un tiempo de 5 minutos para lograr una completa inactivación de *Salmonella* spp. y *E. coli*, es decir un recuento microbiano de cero bacterias. Resultados que difieren de los obtenidos por Oviedo *et al.* [17], quienes obtuvieron luego de 5 minutos de tratamiento, recuentos de 2.2 y 2.1 (log UFC/g), para *Salmonella typhimurium* y *E. coli*, respectivamente, y a medida que incrementó el tiempo de exposición, mayor fue la reducción de la población bacteriana.

Cabe indicar que en el mencionado estudio se evaluó una especie específica de *Salmonella*, *S. typhimurium*, mientras que en nuestro estudio la especie no fue identificada, de modo

que los resultados obtenidos deberían ser tomados con prudencia, dado que el efecto de la radiación UV-C depende del tipo de microorganismo [15], incluso con diferentes cepas dentro de la misma especie.

Además, en el estudio de Oviedo *et al.* [17] se trabajó con distancias de exposición (entre la lámpara UV-C y las muestras irradiadas) de hasta 20 cm. En nuestro estudio se trabajó a una distancia de irradiación de 30 cm. Nuestros resultados confirmarían que el efecto de la radiación UV-C depende de la especie de microorganismo evaluado, en concordancia con Domínguez y Parzanese [15], dado que al trabajar a una mayor distancia de exposición y obtener una mayor reducción de la carga microbiana que la obtenida por Oviedo *et al.* [17], se puede considerar que las cepas de *Salmonella* y *E. coli* utilizadas por dichos autores son más resistentes a la radiación UV-C.

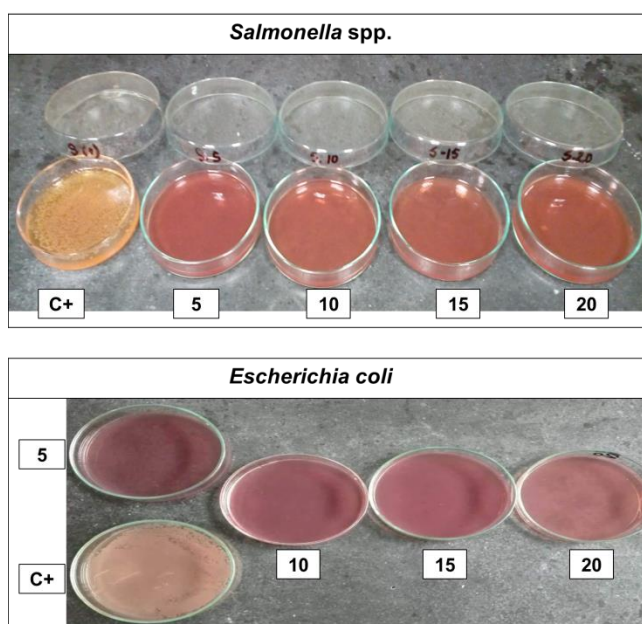


Fig. 4 Inactivación de las bacterias *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* sometidas a radiación UV-C a tiempos de 5, 10, 15 y 20 minutos de tratamiento (C+: control sin radiación UV).

B. TIEMPO ÓPTIMO DE INACTIVACIÓN BACTERIANA

El tiempo es un factor determinante en el efecto de la radiación UV sobre la viabilidad de los microorganismos irradiados [16]. Es posible que, a mayores tiempos de irradiación, algunos microorganismos desarrollen resistencia, y por lo tanto sean necesarias mayores dosis para lograr su inactivación [18]. Se ha reportado que ciertos microorganismos podrían ser capaces de reparar su ADN tras haber sido sometidos a radiación UV, especialmente a longitudes de onda superiores a 330 nm [19].

Así mismo, es posible que tratamientos prolongados puedan inducir la síntesis de sustancias iniciadoras de procesos de oxidación en algunos alimentos [15], afectando por tanto la estabilidad y la calidad sensorial.

De modo que teniendo en cuenta ambas consideraciones, además del ahorro económico que implicarían menores tiempos de tratamiento, se buscó optimizar el tiempo de exposición, tomando como nuevo tiempo máximo de tratamiento los 5 minutos obtenidos en la prueba anterior.

La Fig. 5 muestra los resultados obtenidos, y con solo 1 minuto de tratamiento sería suficiente para inactivar completamente a ambas bacterias.

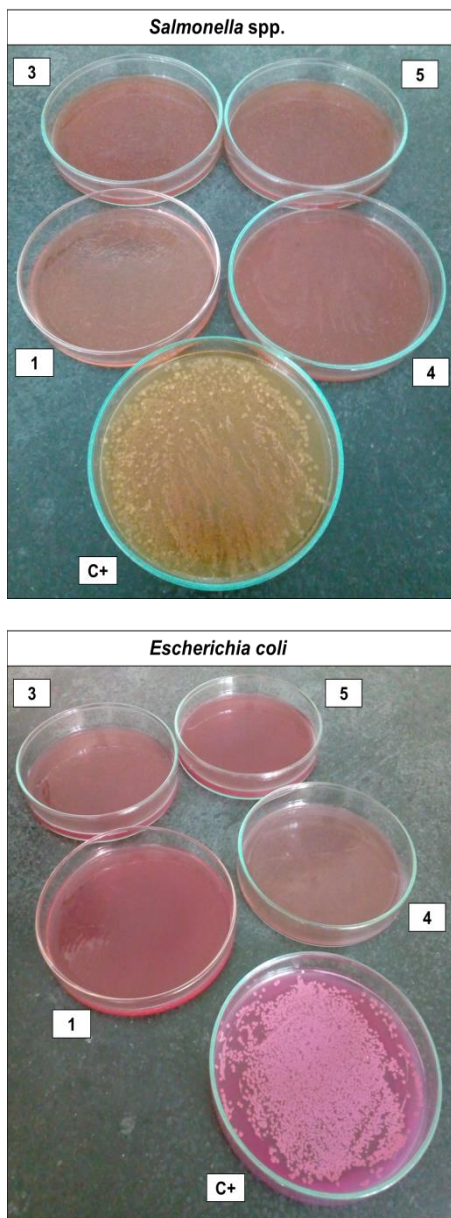


Fig. 5 Tiempo óptimo de inactivación de las bacterias *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* sometidas a radiación UV-C a tiempos de 1, 3, 4 y 5 minutos de tratamiento (C+: control sin radiación UV).

Así mismo en la Tabla 1 se muestran los recuentos para cada una de las bacterias tras ser sometidas a irradiación a tiempos de 1, 3, 4 y 5 minutos. Datos que corresponden a los resultados mostrados en la Fig. 5, donde se observa que a 1

minuto de tratamiento se obtuvo la completa inactivación de ambas bacterias.

TABLA 1
RECUENTOS DE LAS BACTERIAS SOMETIDAS A RADIACIÓN UV-C A TIEMPOS DE 1, 3, 4 Y 5 MINUTOS DE TRATAMIENTO (C+: CONTROL SIN RADIACIÓN UV)

Recuento (células/mL)		
Tiempo (minutos)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
C+	0.9×10^5	1.2×10^5
1	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-

IV. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se pudo determinar en condiciones *in vitro* que un tiempo de irradiación de 1 minuto sería suficiente para inactivar completamente ambas bacterias patógenas. No obstante, cabe resaltar que sólo se ha considerado evaluar la eficacia de la radiación UV-C en una superficie lisa y homogénea (medio sólido para siembra microbiana), observando su potencial eficacia para reducir la carga microbiana en alimentos. Futuros estudios son necesarios, en los cuales se evalúen otros parámetros de tratamiento como la distancia entre la lámpara UV y la muestra, así como el efecto de esta radiación en muestras de alimentos reales, a fin de evaluar su eficacia, por ejemplo, en carnes.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ejecutó en el marco del Proyecto UPN 20171001: “Desarrollo de nuevos productos mediante incorporación de aceites esenciales como conservantes”, de la Universidad Privada del Norte (UPN), sede Trujillo (Perú).

REFERENCIAS

- [1] World Health Organization. 2016. 10 facts on food safety. Ginebra, Suiza.
- [2] Li, W., Wu, S., Fu, P., Liu, J., Han, H., Bai, L., Pei, X., Li, N., Liu, X., Guo, Y. 2018. National molecular tracing network for foodborne disease surveillance in China. *Food Control* 88, 28-32.
- [3] Silva N., Magalhães J., Freirec C., Delerue-Matos C. 2017. Electrochemical Biosensors for *Salmonella*: State of the Art and Challenges in Food Safety Assessment. *Biosensors and Bioelectronics* 99, 667-682.
- [4] World Health Organization. 2017a. Inocuidad de los alimentos. Ginebra, Suiza.
- [5] Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö.G., Soyer, Y., Alpas, H. 2014. Rapid and Standardized Methods for Detection of Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce. *Food Control*, 40, 359-367.
- [6] World Health Organization. 2017b. *Salmonella* spp. Ginebra, Suiza.
- [7] World Health Organization. 2017c. *Escherichia coli*. Ginebra, Suiza.
- [8] Nascimento M., Carminati J., Silva I., Silva D., Bernardi A., Copetti M. 2018. *Salmonella*, *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae in the peanut supply chain: From farm to table. *Food Research International*, 105, 930-935.

- [9] Tomas, M., Jafari, S.M. 2018. Influence of Food Processing Operations on Vitamins. Reference Module in Food Science. Elsevier.
- [10] Adhikari A., Syamaladevi R., Killinger K., Sablani S. 2015. Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on organic fruit surfaces. International Journal of Food Microbiology, 210: 136-142.
- [11] Condón-Abando S., Condón S., Raso J., Lyng J., Álvarez I. 2016. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus plantarum* by UV-C light in flour powder. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 35, 1-8.
- [12] Muhammad H., Un Kim J., Kim S., Park J. 2018. Chapter 18 – The Inactivation of Pathogens in Fruit Juice: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*. Fruit Juices, 341-361.
- [13] Ochoa C., Diaz M., Ávila R., Ruiz I. Corona E., Hernandez P., Lopez A., Guerrero J. 2018. Effect of UV-C light on *Lactobacillus rhamnosus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae* kinetics in inoculated coconut water: Survival and residual effect. Journal of Food Engineering 223, 255-261.
- [14] Tarek A.R., Rasco B.A., Sablani S.S. 2015. Ultraviolet-C light inactivation kinetics of *E. coli* on bologna beef packaged in plastic films. Food and Bioprocess Technology 8(6), 1267-1280.
- [15] Dominguez L., Parzanese M. 2011. Luz ultravioleta en la conservación de alimentos. Alimentos Argentinos 52, 70-76.
- [16] Akdemir-Evrendilek G. 2014. Non-Thermal Processing of Milk and Milk Products for Microbial Safety. In Ozer B., Akdemir-Evrendilek G. (Eds.), *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*, CRC Press, New York, 322-355.
- [17] Oviedo D, Rojas J.M., Borda R.A., Durango M.M. 2013. Efecto de la exposición a la luz ultravioleta UV-C en la viabilidad de especies de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Journal of Engineering and Technology 2(1), 18-28.
- [18] Sastry S.K., Datta A.K., Worobo R.W. 2000. Ultraviolet Light. Journal of Food Science 65(S8), 90-92.
- [19] Liltved H., Landfald B. 2000. Effects of high intensity light on ultraviolet-irradiated and non-irradiated fish pathogenic bacteria. Water Research 34(2), 481-486.