

Efecto bactericida de la luz UV-C y ozono sobre *Escherichia coli* utilizando metodología de superficie de respuestas¹

Óscar Martínez², Ariel Miranda³, Alex Ríos-Moreno⁴

Resumen

Introducción: la radiación ultravioleta (UV-C) y el ozono (O₃) se han convertido en una alternativa reconocida y cada vez más utilizada frente a los desinfectantes químicos, especialmente para el tratamiento del agua potable, residual e industrial de diferentes características. Actualmente, los sistemas de desinfección con UV se pueden adaptar para una gran variedad de usos. **Objetivos:** en el presente trabajo de investigación se evaluó la optimización de las variables (tiempo, distancia y ozono), sobre el crecimiento de colonias de *Escherichia coli*. **Materiales y métodos:** para realizar la investigación se utilizaron lámparas UV-C y generadoras de ozono, con 254 nm de longitud de onda y 25 watts de potencia. Se prepararon un total

de 56 placas con medio nutritivo, se utilizó el método por estrías para la siembra de la bacteria. Estas fueron expuestas en diferentes tiempos y distancias a radiación UV-C y ozono. Los experimentos se desarrollaron mediante un diseño central compuesto, aplicando las combinaciones proporcionadas por el *software* estadístico Minitab 19, se analizaron según un diseño de superficie de respuesta. El recuento bacteriano se efectuó después de 48 horas. **Resultados:** los resultados muestran que el modelo matemático que se obtuvo con el diseño del experimento es significativamente aceptable con un R² (ajustado) de 70,84 %, es aceptado cuando se experimenta con organismos vivos. **Conclusión:** las figuras de Pareto del análisis de varianza del modelo sugieren que el factor distancia es significativo, con un 95 % de confianza para obtener una

1 Artículo original derivado del proyecto de investigación *Empleo de luz ultravioleta en biotecnología* de la Universidad Autónoma de Chiriquí y la Universidad de Panamá, ejecutado entre septiembre de 2021 y marzo de 2022 por el Grupo de investigación Biofisagro (autofinanciado).

2 Doctor en Biotecnología y Bioprocesos industriales de la Universidad de Almería, España. Profesor titular de Biotecnología y Fisiología Animal en la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí, Panamá. Correo: oscar.martínez@unachi.ac.pa, ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0720-8678>.

3 Licenciado en Biología por la escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí, Panamá. Correo: ariel.miranda@unachi.ac.pa, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4269-080X>.

4 Doctor en Ingeniería Agraria, Alimentaria, Sostenible Forestal y del Desarrollo Rural de la Universidad de Córdoba, España. Profesor investigador de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá. Correo: alex.morenom@up.ac.pa, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3117-9659>.

Autor para Correspondencia: alex.morenom@up.ac.pa

Recibido: 31/10/2023 Aceptado: 30/09/2024

*Los autores declaran que no tienen conflicto de interés

mínima contaminación; mientras que el ozono en este diseño no parece ser significativo en la exposición directa a la luz UV-C.

Palabras clave: ácidos nucleicos, contaminación; daño genético, *Escherichia coli*, radiación, superficie de respuestas.

Bactericidal effect of UV -C light and ozone on *Escherichia coli* using response surface methodology

Abstract

Introduction. Ultraviolet light (UV-C) and Ozone (O₃) are well established and increasingly popular alternatives to chemical products for disinfecting of drinking water, wastewater, and industrial water of varying qualities. A wide range of applications can now be accommodated by UV disinfection systems. **Objective.** This study evaluated the optimization of variables (time, distance, and ozone) on the growth of *Escherichia coli* colonies was evaluated. **Materials and methods.** To carry out the study, UV-C lamps and ozone generators were used, with a wavelength of 254 nm and a power of 25 watts. A total of 56 plates with nutrient medium were prepared, and the bacteria were planted using the striae

method. All plates were exposed at different times and distances, to UV-C radiation and ozone. The experiments were developed using a central compound design and applying the combinations provided by the Minitab 19 statistical software. Data were analyzed according to the response surface design. The bacterial count was evaluated after 48 hours and was carried out by the surface area method. **Results.** The results show that the model obtained with the experimental design is significantly acceptable with an R² (adjusted) of 70.84 %, when working with living organisms. **Conclusions.** The Pareto graphs of the analysis of variance suggest that the distance factor is significant with UV-C radiation; with a 95 % confidence interval to obtain a minimum contamination, while the ozone design does not appear to be significant in direct UV-C light exposure.

Keywords: *Escherichia coli*, genetic damage, nucleic acids, pollution, radiation, response surface.

Efeito bactericida da luz UV-C e ozônio em *Escherichia coli* usando metodologia de superfície de resposta

Resumo

Introdução: a luz ultravioleta (UV-C) e o ozônio (O₃) são uma alternativa estabelecida e cada vez mais popular ao uso de produtos químicos para a desinfecção de água potável,

águas residuais e águas industriais de várias qualidades. Os sistemas de desinfecção por UV podem ser projetados para uma ampla gama de aplicações atualmente. **Objetivo:** o presente trabalho de pesquisa, avaliou a otimização das variáveis tempo, distância e ozônio, sobre o crescimento de colônias da bactéria *Escherichia coli*. **Materiais e métodos:** para realizar a pesquisa foram utilizadas lâmpadas de ozônio UV-C, com 25 watts de potência e comprimento de onda de 254 nm. Foram preparadas 56 placas com meio de cultivo, onde foi utilizado o método

por estrias para a sementeira das bacterias. Estes foram expostos, em diferentes momentos e distâncias, à radiação UV-C e o ozônio. Os experimentos foram desenvolvidos em um desenho central composto, aplicando as combinações sugeridas pelo software estatístico Minitab 19, onde foram analisados segundo o desenho da superfície de resposta. A recontagem de bacterias foi realizada depois de 48 horas. **Resultados:** Os resultados mostraram que o desenho matemático que se obteve com o desenho experimental, é significativamente aceitável

com um R^2 ajustado de 70.84 %, o qual é aceito em experimentos com organismos vivos. **Conclusões:** as figuras de Pareto referentes ao modelo de análise de variância sugerem que o fator de distância é significativo, com um intervalo de confiança de 95 % para se obter uma contaminação mínima. Enquanto que com o ozônio, este desenho não parece ser significativo na exposição direta da luz UV-C.

Palavras-chave: ácidos nucleicos, contaminação; danos genéticos, *Escherichia coli*, radiação, respostas de superfície.

Introducción

La luz ultravioleta (UV) y el Ozono (O_3) se han convertido en una alternativa reconocida y en creciente popularidad en comparación con el uso de productos químicos para desinfectar agua potable, aguas residuales y aguas industriales (Gorito *et al.*, 2021). Siempre que se tenga en cuenta la calidad del agua que se desea desinfectar y los objetivos específicos de desinfección, es posible diseñar sistemas de desinfección UV para una amplia variedad de aplicaciones.

La irradiación germicida ultravioleta (IGUV) es un tipo de radiación electromagnética que altera los ácidos nucleicos de los microorganismos, impidiéndoles reproducirse. Las longitudes de onda en el rango UV-C son particularmente perjudiciales para las células, ya que los ácidos nucleicos absorben esta radiación (Roy, 2017). La eficacia germicida de la UV-C varía según la longitud de onda y cada microbio o virus al que se dirige tiene una respuesta única descrita por su espectro de acción germicida (Blatchley *et al.*, 2023). Aunque los principios y detalles de la desinfección mediante luz ultravioleta están bien comprendidos, lo que ha permitido desarrollar sistemas de

desinfección efectivos, la comprensión exacta de cómo la luz ultravioleta afecta a los microorganismos a nivel molecular sigue siendo un tema de estudio.

La mayoría de las naciones utilizan ozono, un potente producto oxidante (Rowen, 2019). Se hizo famoso en las últimas décadas, principalmente debido a su gran actividad oxidativa, que lo caracteriza como un agente potencialmente biocida para actuar sobre bacterias, hongos, virus y helmintos (Chuajedton *et al.*, 2017). La acción principal del ozono sobre los microorganismos ocurre en la pared celular como resultado de la oxidación de glicopéptidos, glicoproteínas y aminoácidos que cambian la permeabilidad y provocan su rápida lisis (Chuajedton *et al.*, 2017). Al ingresar a la célula, el ozono se combina con sustancias que promueven la oxidación de aminoácidos citoplasmáticos y ácidos nucleicos, lo que provoca la escisión y la muerte celular (Padma Ishwarya *et al.*, 2022).

La oxidación e inactivación de bacterias por el ozono suele ser rápida, alcanzando diferentes constituyentes celulares de manera inespecífica. Puede actuar sobre las bases purínicas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos de *Escherichia coli* (Brodowska y Śmigielski,

2015). Sin embargo, la sensibilidad de las bacterias al ozono depende de ciertos factores, como la etapa de crecimiento y la célula, concentración, tipos de microorganismos, medios de cultivo, temperatura, tiempo de exposición y concentración de ozono, entre otros (Chujedton *et al.*, 2017). La práctica de desinfección de microorganismos mediante luz ultravioleta (UV) y Ozono (O₃) es de uso común en superficies de entornos de oficina, hogares, laboratorios, sector industrial, industria alimentaria, hospitales, entre otros, a pesar de ello no existe una claridad en cuanto a dosis que se debe aplicar.

Por otro lado, los procesos de optimización por superficie de respuestas arrojan como resultado, la generación de una ecuación de regresión, que se emplea para representar la relación entre la respuesta y los componentes de los modelos matemáticos. Esta ecuación de regresión actúa como una representación algebraica de la recta de regresión, la cual generalmente se expresa de la siguiente manera:

$$Y = b_0 + b_1x_1$$

Cuando la ecuación incluye más de un término, adopta la forma:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + (...) + b_kx_k$$

A través de una expresión de regresión, Y denota la variable dependiente, b₀ representa la constante o el punto de intersección, mientras que b₁ representa el coeficiente que calcula el término lineal, también conocido como la pendiente de la recta, mientras que x₁ señala el valor del término correspondiente (Mohamed *et al.*, 2016).

En este trabajo de investigación se implementó un método de optimización para evaluar la eficacia de la luz ultravioleta (UV-C) y la presencia de Ozono (O₃), sobre la inactivación del crecimiento de *E. coli*.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Se empleó el crecimiento de *E. coli* como indicador para evaluar los efectos de los tratamientos de radiación de UV-C. Las muestras de *E. coli* fueron facilitadas en el centro de análisis microbiológicos de la FCNyE de la UNACHI. Para determinar el microorganismo bacteriano, se procedió a su aislamiento mediante técnicas bioquímicas y la tinción de Gram.

Preparación de los medios de cultivos

Para la siembra de la bacteria de interés se empleó agar nutritivo. La bacteria *E. coli* se sembró en los platos Petri mediante la técnica de estrías (rayado). La conservación de las cepas bacterianas se realizó con resiembras en tubos con caldo y agar nutritivos inclinado.

Equipo utilizado

Se utilizaron lámparas Black Magic de luz UV-C (luz ultravioleta de onda corta) (G6 Wellness) con una longitud de 254 nm y potencia de 25 watts y lámparas generadoras de ozono (O₃) con una concentración de 500 mg/h ~ 8,33 mg/min. Se utilizó un sistema (caja) donde se colocaron los platos Petri con los medios de cultivo para realizar los tratamientos. Se utilizó un calibrador vernier para medir la zona de crecimiento bacteriano y una cinta métrica para determinar las distancias a la cual se colocó la fuente de luz de la muestra. También se calculó la intensidad de la luz UV-C mediante un medidor de luz UV-C (Santacary Technology Co., Ltd, China).

Tratamientos con luz UV-C

Los distintos tratamientos se establecieron mediante un diseño central compuesto, utilizando el *software* Minitab 19. El *software*

estadístico se configuró con los valores máximos y mínimos de los factores a evaluar (tiempo, distancia y presencia de ozono). Una vez determinados esos valores, se siguió la matriz experimental con las diferentes combinaciones de las variables experimentales (**Tabla 1**).

Diseño experimental

El diseño experimental consistió en un modelo de compuesto central de superficie de respuestas con 56 ensayos a los cuales se les aplicó un tiempo mínimo de 5 minutos y máximo de 30 minutos de exposición de UV-C y UV-C+O₃; en la distancia se emplearon 16 cm como mínimo y 26 cm como máximo. Se realizaron dos réplicas por cada tratamiento. Se utilizó el método de comportamiento del crecimiento bacteriano, frente a la luz ultravioleta (UV-C) y el ozono (O₃), cuya concentración fue de 500 mg/h. Se empleó el tiempo, distancia y la presencia de ozono (O₃) como factores en las pruebas realizadas, con un diseño de superficie de respuesta. Además de la generación de combinaciones de variables, mediante el *software* estadístico Minitab 19.

Supervivencia y recuento bacteriano

Para determinar el crecimiento de la bacteria *E. coli*, se realizó por medio del método de área en la superficie de agar en el plato de Petri (crecimiento promedio en mm²) (Malik *et al.*, 2019). La observación del efecto en el crecimiento se llevó a cabo después de 48 horas de haberse realizado el tratamiento.

Análisis estadístico

Con el fin de determinar los factores y el tipo de modelo del experimento que son significativos ($p \leq 0,05$), se llevó a cabo el análisis de superficie de respuesta, dentro del cual se realizó el análisis de ANOVA (análisis de varianza). Los factores que presentaron mayor significancia ($p \leq 0,05$) en el diseño del experimento se validaron mediante las gráficas de Pareto. Además, se determinó el coeficiente de determinación R² y R² ajustado para saber el porcentaje de cambio de la variable de respuesta (área de contaminación en mm²), y por último se aplicó la desviación estándar (σ) a la optimización de la respuesta. Estos análisis se realizaron utilizando el *software* estadístico Minitab 19 y Microsoft Excel.

Tabla 1.

Matriz experimental para tabular los datos cuantificados del crecimiento de *E. coli*

Orden Est	Orden corrida	Tipo Pt	Bloques	Tiempo de exposición (min)	Distancia (cm)	Ozono	Área de C. mm ²
10	1	1	1	5	26	No	91,75
13	2	0	1	17,5	21	No	9,67
5	3	0	1	17,5	21	Si	66
11	4	1	1	30	26	No	25,75
6	5	0	1	17,5	21	Si	42
2	6	1	1	30	16	Si	0

Orden Est	Orden corrida	Tipo Pt	Bloques	Tiempo de exposición (min)	Distancia (cm)	Ozono	Área de C. mm ²
4	7	1	1	30	26	Si	0
9	8	1	1	30	16	No	54
12	9	0	1	17,5	21	No	44,25
7	10	0	1	17,5	21	Si	0
14	11	0	1	17,5	21	No	10
3	12	1	1	5	26	Si	34,25
8	13	1	1	5	16	No	41
1	14	1	1	5	16	Si	0
27	15	0	2	17,5	21	No	17
25	16	-1	2	17,5	28,07	No	0
19	17	0	2	17,5	21	Si	0
23	18	-1	2	35,17	21	No	46,67
22	19	-1	2	0*	0*	No	188,5
16	20	-1	2	35,17	21	Si	17,33
18	21	-1	2	17,5	28,07	Si	49,5
21	22	0	2	17,5	21	Si	49,8
24	23	-1	2	17,5	13,92	No	5,5
26	24	0	2	17,5	21	No	0
20	25	0	2	17,5	21	Si	66,7
28	26	0	2	17,5	21	No	31,29
17	27	-1	2	17,5	13,92	Si	40
15	28	-1	2	0*	0*	No	190,5
32	29	1	3	30	26	Si	29
37	30	1	3	30	16	No	54,25
30	31	1	3	30	16	Si	0
33	32	0	3	17,5	21	Si	28,6
29	33	1	3	5	16	Si	58,5
36	34	1	3	5	16	No	24
39	35	1	3	30	26	No	5,95
31	36	1	3	5	26	Si	49,75
38	37	1	3	5	26	No	36,2

Orden Est	Orden corrida	Tipo Pt	Bloques	Tiempo de exposición (min)	Distancia (cm)	Ozono	Área de C. mm ²
41	38	0	3	17,5	21	No	0
40	39	0	3	17,5	21	No	16
35	40	0	3	17,5	21	Si	21
34	41	0	3	17,5	21	Si	30
42	42	0	3	17,5	21	No	49,6
55	43	0	4	17,5	21	No	31
51	44	-1	4	35,17	21	No	12
50	45	-1	4	0*	0*	Si	198,5
47	46	0	4	17,5	21	Si	58,67
45	47	-1	4	17,5	13,92	Si	24
53	48	-1	4	17,5	28,07	No	43,17
49	49	0	4	17,5	21	Si	83
46	50	-1	4	17,5	28,07	Si	18,75
52	51	-1	4	17,5	13,92	No	74
43	52	-1	4	0*	0*	Si	185
54	53	0	4	17,5	21	No	41,33
44	54	-1	4	35,17	21	Si	26,33
48	55	0	4	17,5	21	Si	98
56	56	0	4	17,5	21	No	19

Nota. Elaborada por los autores. *No se aplicó al tratamiento UV-C y ozono.

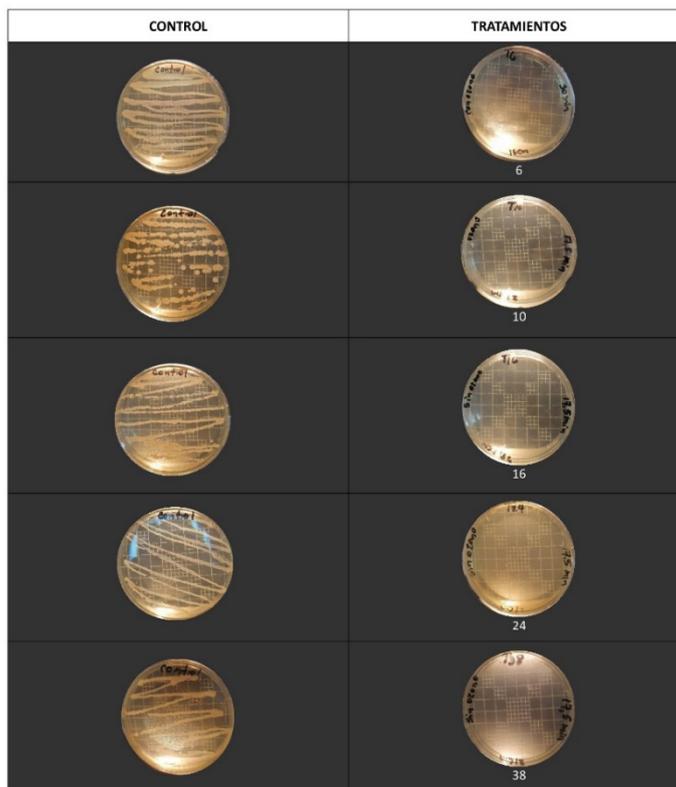
Resultados

Los hallazgos indican que existe una relación inversa en cuanto a la supervivencia de las bacterias frente a el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta, la cual tiene un efecto letal sobre los microorganismos (**tabla 1**). A

medida que aumenta el tiempo de exposición, disminuye el número de bacterias y en las combinaciones de tiempo y distancia, 17,5 a 30 minutos con 16 y 21 cm, de la muestra con respecto a la fuente de luz, no se observa crecimiento de microorganismos bacteriano (**figura 1**).

Figura 1.

Ensayos aplicando UV-C y UV-C +O₃, control y los tratamientos 6, 10, 16, 24 y 38 donde hay evidencia de crecimiento de E. coli.



Nota. Elaborada por los autores

Tabla 2.

Codificación de los términos (factores) utilizados en el diseño del experimento Análisis de varianza (ANOVA)

Término	Coef.	Coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	27,68	4,59	6,04	0,000	
Bloques					
1	-4,34	6,21	-0,70	0,488	1,62
2	-3,70	6,43	-0,50	0,568	1,73
3	-5,47	6,21	-0,88	0,383	1,62
Tiempo de E. (min)	-11,41	6,16	-1,85	0,071	1,81
Distancia (cm)	-2,36	4,47	-0,53	0,601	2,92
Ozono					

Si	2,53	3,56	0,71	0,481	1,07
Tiempo de E. (min)*Tiempo de E. (min)	3,90	6,47	0,60	0,550	1,84
Distancia (cm)*Distancia (cm)	7,58	2,54	2,99	0,00	10,6
Tiempo de E.(min)*(Distancia (cm)	-2,29	5,91	-0,39	0,700	7,55
Tiempo de E. (min)*Ozono Si	-4,06	5,06	-0,80	0,427	1,22
Distancia (cm)*Ozono Si	3,79	2,98	1,27	0,209	1,36

Nota. Elaborada por los autores.

El modelo obtenido con el diseño del experimento es significativamente aceptable, muy bueno cuando se moldean organismos vivos. En este caso el valor de R^2 (ajustado) es de 70,84 %, esto indica que el cambio en la variable dependiente puede ser atribuido a una variable independiente que ha sido evaluada. Esto significa que el resultado del análisis del diseño de experimento que obtendremos es de naturaleza altamente predictiva.

En la **tabla 2** se señala la codificación obtenida para los diferentes factores utilizados en el análisis de superficie de respuesta. Para evaluar si el modelo es capaz de explicar la variación en la respuesta, se comparó el valor

p del modelo con el nivel de significancia establecido para probar la hipótesis nula. En general, un nivel de significancia de 0,05 (también representado como α) es adecuado. Este nivel de significancia sugiere un riesgo del 5 % de error al concluir que el modelo explica la variación en la respuesta.

Los valores que se obtuvieron a través del análisis de varianza nos indican que el modelo matemático obtenido es significativo ($p < 0,05$), validando así la metodología empleada. De igual forma, la distancia en su forma cuadrática es significativa ($p < 0,05$), mientras que el tiempo no es significativo ($p > 0,05$), pero muestra influencia en el diseño (**Tabla 3**).

Tabla 3.

Análisis de varianza del diseño del experimento

	GL	SC Ajust.	MC.Ajust	Valor F	Valor P
Fuente					
Modelo	11	96468	8769,80	13,15	0,000
Bloques	3	2955	984,80	1,48	0,234
Lineal	3	2804	934,50	1,40	0,255
Tiempo de exposición (min)	1	2286	2286,0	3,43	0,071
Distancia (cm)	1	185	185,40	0,28	0,601
Ozono	1	337	337,40	0,51	0,481

Cuadrado	2	7912	3955,90	5,93	0,005
Tiempo de exposición (min)* Tiempo de exposición (min) Distancia(cm)*Distancia (cm)	1	243	242,60	0,36	0,550
	1	5962	5962,30	8,94	0,005
Interacción de dos factores	3	1256	418,70	0,63	0,601
Tiempo de exposición (min)*Distancia (cm)	1	101	100,50	0,15	0,700
Tiempo de exposición (min)*Ozono	1	429	428,80	0,64	0,427
Distancia (cm)*Ozono	1	1083	1082,60	1,62	0,209
Error	44	29350	667,10		
Falta de ajuste	26	20974	806,70	1,73	0,115
Error puro	18	8377	465,40		
Total	55	125818			

Nota. Elaborada por los autores.

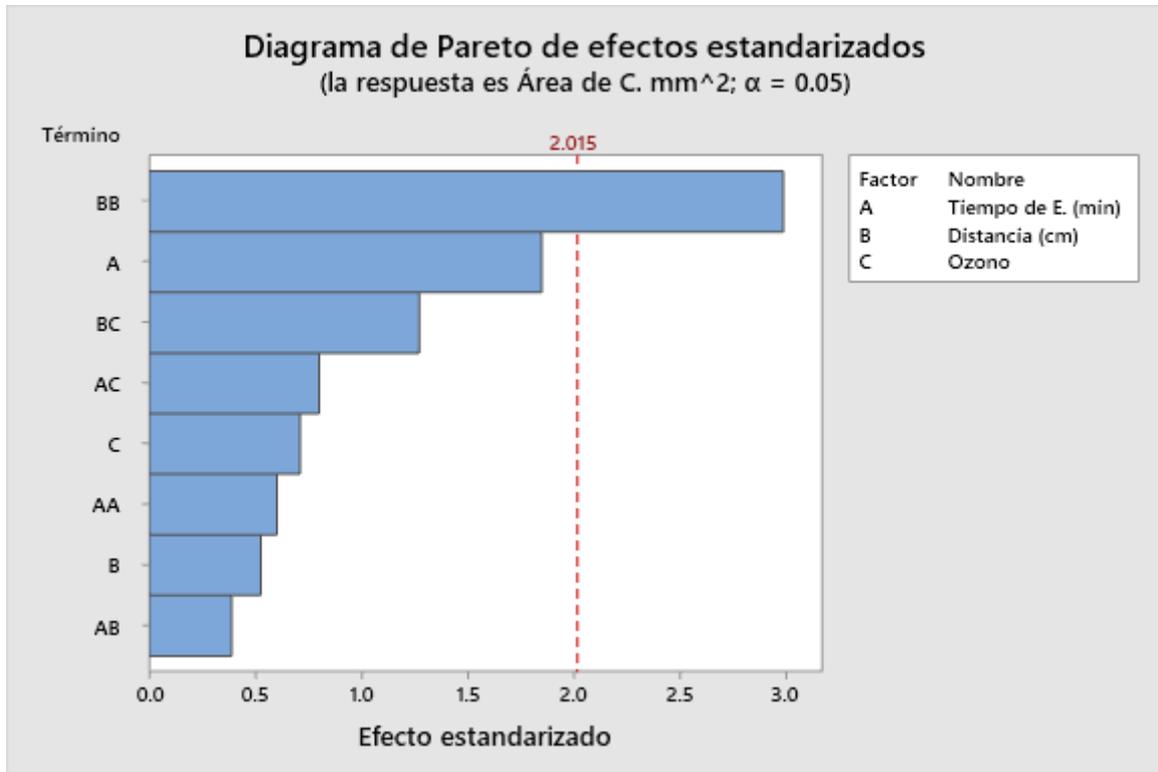
Gráficas de Pareto

La gráfica de Pareto presenta que el factor distancia de forma cuadrática es significativa ($p > 0,05$), y que el factor tiempo

no es estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Sin embargo, al considerarse en la ecuación, se observa que este factor tiene una importante influencia en el modelo con 95 % de confianza (**figura 2**).

Figura 2.

Diagrama de Pareto donde se muestran los factores involucrados y su efecto en el tratamiento



Nota. Elaborada por los autores.

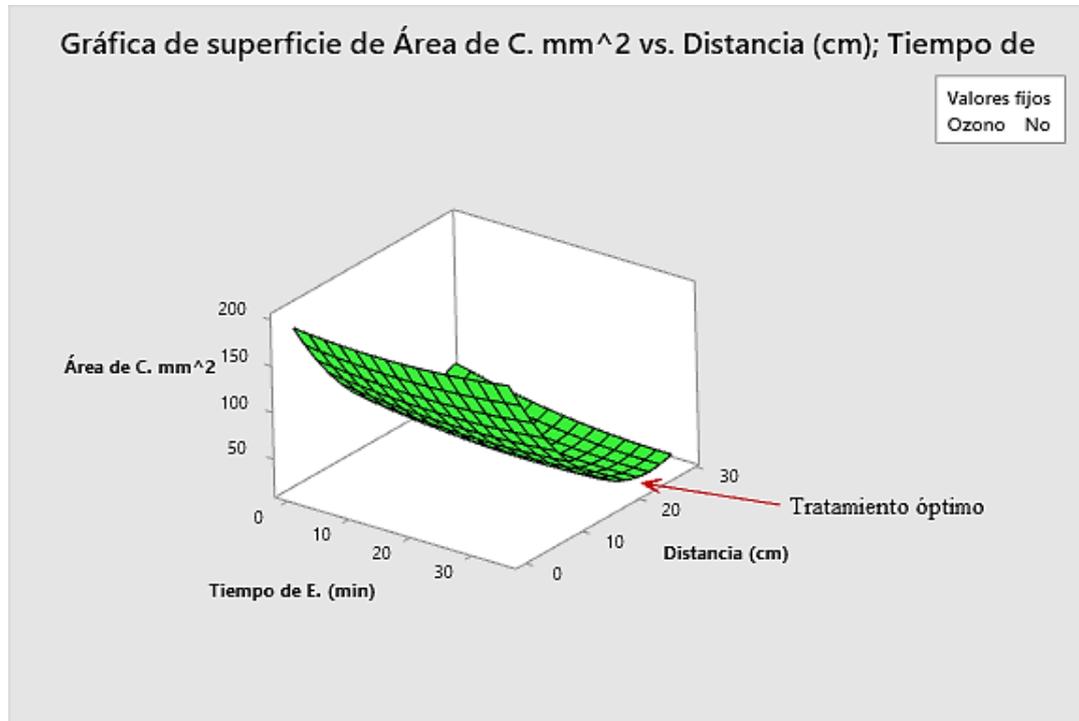
Gráficas de superficies

La grafica de superficie señala que cuando no hay presencia de ozono, y el tiempo es 0 en el tratamiento, el área de contaminación se incrementa. A medida que se aplica la radiación

UV- C, la contaminación bacteriana desciende lentamente. Por el contrario, se observa en el caso del factor distancia hay una caída más pronunciada, lo que sugiere un mayor efecto por el contacto directo con la luz UV-C que por el tiempo de irradiación (**figura 3**).

Figura 3.

Gráfica de superficie que muestra los tratamientos aplicando luz UV - C



Nota. Elaborada por los autores.

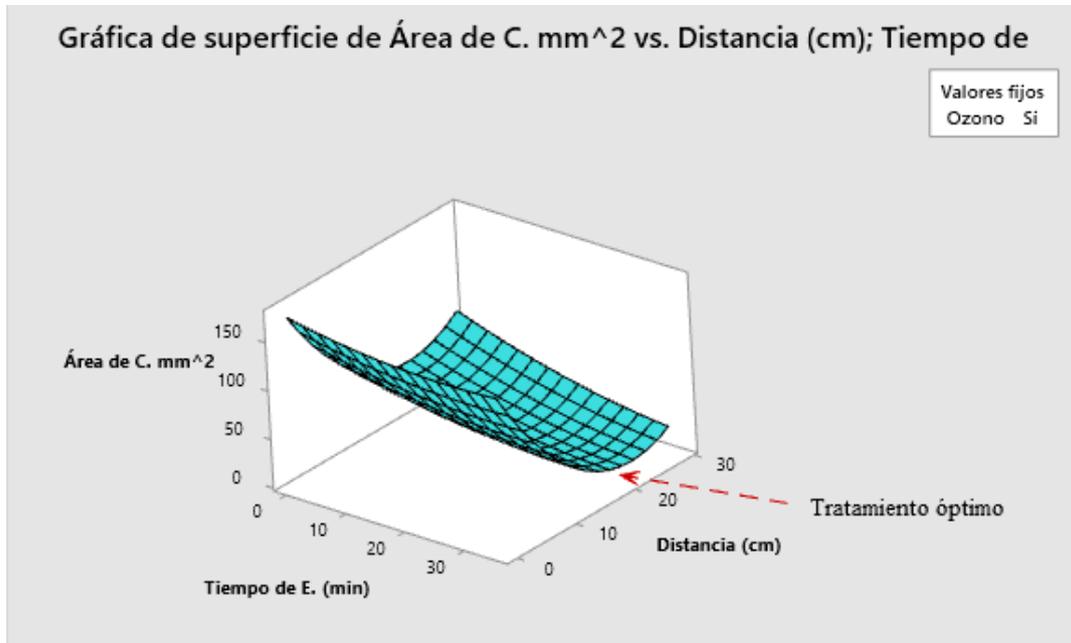
En el caso en el que se aplica ozono, se observa que el tratamiento óptimo para inactivar bacterias es de 30 minutos, a 16 cm de distancia, aplicando una dosis de 117 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, pues se obtuvo 0 mm^2 del crecimiento bacteriano (**figura 4**).

Comprobación del modelo experimental

Teniendo en cuenta la variable de respuesta, el programa estadístico Minitab 19 determina una ecuación para cada condición en cuanto a la presencia o ausencia del factor ozono. Para ajustar el modelo del experimento, se utilizaron dos ecuaciones con las cuales se obtuvieron las condiciones óptimas y sus resultados que fueron comprobados y se evidencian en la **tabla 4**.

Figura 4.

Gráfica de superficie aplicando luz UV-C + ozono (O3) a los tratamientos.



Nota. Elaborada por los autores.

Tabla 4.

Optimización de repuesta: Área de contaminación (mm²)

Solución	Tiempo de exposición (min)	Distancia (cm)	Ozono	Área de C. mm ² Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	31,26	23,82	No	19,29	0,90
Predicción de respuesta múltiple					
Variable	Valor de configuración				
Tiempo de exposición (min)	31,26				
Distancia (cm)	23,81				
Ozono	No				
Respuesta	Ajuste	E.E de ajuste	IC de 95 %	IP de 95 %	
Área de C. mm ²	19,30	10,40	(-1,6; 40,2)	(-36,8; 75,4)	

Nota. Elaborada por los autores

Ecuación 1:

OZONO SI: Área de C. [(mm)]²=173,8-1,34
 Tiempo de E. (min)-11,81 Distancia (cm)+0,0250
 Tiempo de E. (min)² *Tiempo de E. (min)²+0,303
 Distancia (cm)*Distancia (cm)-0,0367Tiempo
 de E. (min)² *Distancia (cm)

Ecuación 2:

OZONO NO: Área de C. [(mm)]²= 189,2-
 0,69 Tiempo de E. (min)²-13,33 Distancia
 (cm)+0,0250 Tiempo de E.*Tiempo de
 E. [(min)]² +0,303 Distancia (cm)*Distancia
 (cm)-0,0367 tiempo de E. (min)²*Distancia (cm)

El dato cuantificado de la desviación estándar indica que se dispersa 2,4 mm² alrededor de la media (16,2 mm²), lo que expone una dispersión menor, mientras que el valor calculado del coeficiente de variación (14,81 %), indica que la media es representativa y presenta homogeneidad, asimismo se muestran los datos que resultaron de la prueba de optimización (comprobación) (**tabla 5**).

Tabla 5.

Datos calculados en la optimización de respuesta

Valor objetivo (esperado)	Valor real	Valor promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación
19,3 mm ²	13,8 mm ²	18,6 mm ²	16,2 mm ²	2,4 $\frac{2,4}{16,2} = 0,148 \times$ 100 = 14,81 %

Nota. Elaborada por los autores

Discusión

Los resultados cualitativos indicaron una disminución considerable en la cantidad de células cultivables de *E. coli* en superficies ricas en nutrientes expuestas a tratamientos con irradiación de luz ultravioleta (UV-C). Se logró una disminución gradual de las células bacterianas viables dentro de un minuto de la exposición a UV-C para la cepa, como lo revela la disminución gradual en la densidad de las colonias que comprenden las rayas después de la incubación. Luego de tres minutos de exposición continua a UV-C, no se observaron

colonias de *E. coli* visibles. Después de cinco minutos, no se encontraron colonias visibles a lo largo de los rastros de rayas en el área expuesta, su crecimiento se vio severamente afectado durante el tiempo de tratamiento. La incubación de 24 h en superficies de agar ricas en nutrientes a una temperatura de crecimiento óptima (37 °C) proporcionó una condición ideal para que ocurriera la reactivación post-UV-C de cualquier célula dañada (Wu, 2008, citado por Chen *et al.*, 2020), sin embargo; no se observó reactivación después de cinco minutos de exposición al UV-C (11,88 mJ/cm²) sugiriendo que es una dosis adecuada para el tratamiento de desinfección de *E. coli*.

Es evidente que la distancia de la muestra con el cultivo de bacterias a la fuente de luz incrementa la dosis de radiación, teniendo así mayor efecto de la atenuación de crecimiento bacteriano, a mayor longitud luz ultravioleta, el incremento de las poblaciones de bacterias aumenta. Esto concuerda con lo observado por Byrns *et al.* (2021) quien señala que el efecto de la radiación UV-C es mayor mientras más cerca se encuentra la muestra a la lámpara.

En un estudio realizado por La Rosa-Nájera *et al.* (2023), no encontraron diferencias significativas entre los tiempos estudiados, sin embargo, es evidente que los segundos de exposición a luz UV-C son determinantes en el incremento del efecto de inhibición del crecimiento bacteriano, la duración de la exposición es un factor clave en la viabilidad de los microorganismos tras ser expuestos a la luz UV-C según estudios que confirman que la duración y dosis de la radiación son esenciales para una inactivación efectiva (Rózańska *et al.*, 2023). La conexión entre la duración y la intensidad de la radiación es el aspecto más importante a considerar al diseñar lámparas UV (Delorme *et al.*, 2020). En nuestro trabajo no resulta determinante el factor tiempo, puede deberse a las que las variaciones en la inactivación bacteriana se dan en segundos de exposición y en este experimento se utilizaron las unidades de minutos para aplicar la dosis de radiación.

Por otra parte, como observamos en nuestros resultados, se evidenció un efecto significativo con el factor distancia, esto concuerda con la investigación de La Rosa-Nájera *et al.* (2023) quienes constataron diferencias significativas en las distancias analizadas ($p \geq 0,05$), lo que podría atribuirse a la interacción entre la distancia y la potencia de la lámpara. En cambio, Jeon y Ha *et al.* (2018) concluyeron que, al utilizar una distancia de 8 pies (243,840 cm) y una lámpara con una potencia de 40 watts, se logra una reducción de cuatro unidades logarítmicas a una

concentración de 1×10^8 ufc/ml. Además, con una distancia promedio y lámparas similares a las utilizadas en este estudio, se obtuvo una reducción de la tasa de crecimiento de *E. coli* de 1,1 y 1,2 log ufc/g (Lee *et al.*, 2021). Los resultados muestran que cuando nos alejamos de la fuente de luz, la zona de infección aumenta, cuando nos acercamos a la fuente de luz, disminuye (Song *et al.*, 1987). El tratamiento óptimo para nuestra investigación fue de 17,5 minutos, 21 cm y 28,07 cm de distancia, con dosis de radiación de $38,85 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ y $93,6 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ se obtuvo 0 mm² de la medición del crecimiento de la bacteria, lo que nos indica que cuanto más cerca se encuentra la muestra con respecto a la fuente luminosa UV-C, aumenta la dosis de radiación y se observa una mejor eficacia en la reducción de la contaminación por parte de la bacteria.

En un estudio de Pihen *et al.* (2023), diferentes dosis de radiación UV-C en unidades de J/cm² se aplicaron a muestras de instrumentos de cocina. Las dosis elegidas para la construcción de la cámara de radiación germicida fueron (34, 44, 311.8, 603.6) J/cm², ya que son suficientemente altas para asegurar una adecuada inactivación de las bacterias *E. coli*. No obstante, la cámara se diseñó para permitir el uso de dosis mayores, con el fin de asegurar una eficaz inactivación de microorganismos que son más resistentes a la luz UV-C, proporcionando así una mayor confianza al usuario. A pesar de ser que la investigación se realizó en superficies distintas, las dosis utilizadas en nuestro trabajo para inactivar *E. coli* se encuentran dentro de los rangos citados. Además, la capacidad de emisión UV-C para reducir el número de bacterias es confirmada por varios autores (Martínez de Alba *et al.*, 2021; Rózańska *et al.*, 2004). La ventaja de esta técnica se basa en la habilidad de la radiación UV-C para provocar daños de diversas intensidades en el ADN celular, lo que impacta la viabilidad de las células microbianas (Setlow y Christie, 2023).

La luz UV-C demostró ser efectiva en la inactivación de ascósporos de los hongos *Aspergillus fischeri* y *Paecilomyces fulvus* en jugo de manzana clarificado. Se lograron hasta 5,7 reducciones logarítmicas para *A. fischeri* y 4,2 reducciones logarítmicas para *P. niveus* en un tiempo de exposición de hasta 10 minutos, usando la mayor irradiancia de 36 W/m² (Menezes, 2020). Se han realizado múltiples experimentos en los que las herramientas quirúrgicas se contaminaron y expusieron a concentraciones variables de bacterias y luego se expusieron a la radiación ultravioleta (Kodoth y Jones, 2015). Esto se hizo para determinar la efectividad de la esterilización UV. Con base en los datos recopilados, los investigadores dedujeron que la esterilización UV es eficaz para matar muchas cepas de bacterias en un período corto de tiempo. Esto hace que la esterilización UV sea ideal para implementar en procedimientos quirúrgicos. Se han realizado experimentos que prueban los efectos de dosis específicas de radiación ultravioleta en la supervivencia de *E. coli* (Shibai *et al.*, 2017). Los investigadores demostraron que la exposición a los rayos UV redujo la cantidad de UFC (Unidades formadoras de colonias) y que la dosis de UV necesaria para reducir la cantidad de UFC aumenta exponencialmente a medida que aumentan las longitudes de onda. Estos hallazgos, a saber, que los rayos UV reducen el número de UFC de *E. coli*, respaldan los resultados de nuestro estudio.

La aplicación directa de ozono no resultó en importantes reducciones en los recuentos de *E. coli*, posiblemente por las condiciones de ensayo no permitieron determinar su eficacia en el control de este patógeno, a diferencia de la luz UV-C, que mostró tener gran efectividad en la disminución de las UFC de *E. coli*. Según los resultados de nuestra investigación, el uso de modelos de superficie de respuestas para determinar las dosis adecuadas, a fin de esterilizar superficies, se podrían utilizar con la finalidad de lograr la inactivación de

otros microorganismos patógenos como virus, hongos y otras especies de bacterias, sobre diferentes sustratos orgánicos e inorgánicos, al complementarse con la presencia de ozono podría permitir mejorar su efectividad sobre sustratos irregulares.

Conclusiones

Se comprobó que la luz ultravioleta tipo C tiene mayor eficacia para la inactivación de microorganismos patógenos (bacterias), en comparación con la luz generadora de ozono (O₃), presentó baja eficacia. Se observó una relación entre el tiempo y distancia de exposición. A medida que disminuye la distancia de la muestra a la fuente de luz, también lo hacía la inactivación de la bacteria, lo que demuestra la importancia del factor distancia y el efecto que aporta el tiempo de exposición para lograr una mayor reducción de área de contaminación. Los parámetros óptimos para lograr desinfectar y esterilizar agentes patógenos se determinó mediante el ANOVA (análisis de varianza), dando como resultado 17,5 minutos y 21 cm de exposición cuando se utiliza luz UV-C; por otra parte, al emplear luz UV-C + Ozono (O₃), se dedujo lo siguiente (30 minutos, 16,0 cm de exposición). En el diseño del experimento mediante el análisis (ANOVA), se evidenció que los factores determinantes son la distancia y el tiempo de exposición, siendo la distancia el factor significativo ($p \leq 0,05$) en el modelo cuadrático; el tiempo no es significativo, pero tiene influencia en los tratamientos ($p \geq 0,550$).

Referencias

- Blatchley, E. R., Brenner, D. J., Claus, H., Cowan, T. E., Linden, K. G., Liu, Y, ... and Sliney, D. H. (2023). Far UV-C radiation: An emerging tool for pandemic control. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 53(6), 733-753. <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2084315>.
- Brodowska, A. J. and Śmigielski, K. (2015). Ozonation—an alternative decontamination method for raw plant materials. *Biotechnology and Food Sciences*, 77(1), 37-43.
- Byrns, G., Barham, B., Yang, L., Webster, K., Rutherford, G., Steiner, G., Petras, D. y Scannell, M. (2021). Usos y limitaciones de la lámpara ultravioleta germicida portátil para la desinfección de superficies. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 18(sup1), S75-S85. <https://doi.org/10.1080/15459624.2021.1877057>.
- Cheng, Y., Chen, H., Sánchez Basurto, L. A., Protasenko, V., Bharadwaj, S., Islam, M. y Moraru, C. I. (2020). Inactivation of *Listeria* and *E. coli* by Deep-UV LED: effect of substrate conditions on inactivation kinetics. *Scientific reports*, 10(1), 3411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.0138/s41598-020-60459-8>.
- Chuaqedton, A., Aoyagi, H., Uthaibutra, J., Pengphol, S. y Whangchai, K. (2017). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 by treatment with different temperatures of micro-bubbles ozone containing water. *International Food Research Journal*, 24(3), 1006-1010.
- Delorme, M. M., Guimarães, J. T., Coutinho, N. M., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, R., Margalho, L., Pimentel, T., Silva, M., Freitas, M., Granato, D., Santana, A., Duart, My Cruz, A. G. (2020). Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. *Trends in food science & technology*, 102, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.001>.
- Gorito, A. M., Pesqueira, J., Moreira, N. F., Ribeiro, A. R., Pereira, F. R., Nunes, O.C., Almeida, M. R. y Silva, A. M. (2021). Ozone-based water treatment (O₃, O₃/UV, O₃/H₂O₂) for removal of organic micropollutants, bacteria inactivation and regrowth prevention. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105315. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105315>.
- Jeon, M. J. y Ha, J. W. (2018). Efficacy of UV-A, UV-B, and UV-C irradiation on inactivation of foodborne pathogens in different neutralizing buffer solutions. *Lwt*, 98, 591-597. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.030>.
- Kodoth, V. y Jones, M. (2015). The Effects of Ultraviolet Light on *Escherichia coli*. *Journal of Emerging Investigators*, 102, 23-28.
- La Rosa-Nájera, D., Rebolledo-Ramírez, F. L., Segura-Ceniceros, E. P., Mendoza, F. J. y Vargas-Segura, A. I. (2023). Evaluación del efecto bactericida de la luz UV-LED sobre impresiones de alginato. *Avances en Odontoestomatología*, 39(1), 42-48.
- Lee, C. L., Kim, G. H. y Yoon, K. S. (2021). Effects of combined aerosolization with ultraviolet C light-emitting diode on enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* attached to soft fresh produce. *Foods*, 10(8), 1834. <https://doi.org/10.3390/foods10081834>.

- Malik, S. A., Swee, T. T., Nik-Malek, N., Yaha, A., Emoto, T., Akutawa, M., Meng, L., Hou, T., Alang, T and Chia-Hiik, K. L. (2019). Effectiveness of visible and ultraviolet light emitting diodes for inactivation of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*: A comparative study. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(4), 572-576. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v15n4.1207>.
- Martínez de Alba, A. E., Rubio, M. B., Morán-Diez, M. E., Bernabéu, C., Hermosa, R. y Monte, E. (2021). Microbiological evaluation of the disinfecting potential of UV-C and UV-C plus ozone generating robots. *Microorganisms*, 9(1), 172. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010172>.
- Menezes, N. M. (2020). Inactivation of heat-resistant filamentous fungi in corn soil by ultraviolet light (UV-C).
- Mohamed, O. A., Masood, S. H. y Bhowmik, J. L. (2016). Mathematical modeling and FDM process parameters optimization using response surface methodology based on Q-optimal design. *Applied Mathematical Modelling*, 40(23-24), 10052-10073.
- Padma Ishwarya, S., Ahmad, M. H., Nandu Lal, A. M., Silpa, V. y Venkatesh, T. (2022). Non-electro-Technologies: Gamma Rays, UV Light, Ozone, Photodynamic and Membrane Processing. In *Nonthermal Processing in Agri-Food-Bio Sciences: Sustainability and Future Goals* (pp. 253-308). Cham: Springer International Publishing.
- Pihen, C., Mani-López, E., Franco-Vega, A., Jiménez-Munguía, M. T., López-Malo, A. y Ramírez-Corona, N. (2023). Performance of UV-LED and UV-C treatments for the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 in food model solutions: Influence of optical and physical sample characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 85, 103314. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103314>.
- Roy, S. (2017). Impact of UV Radiation on Genome Stability and Human Health. In: S. Ahmad (eds) *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 996. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_17.
- Rowen, R. J. (2019). Ozone and oxidation therapies as a solution to the emerging crisis in infectious disease management: a review of current knowledge and experience. *Medical Gas Research*, 9(4), 232-237. Doi: 10.4103/2045-9912.273962.
- Rózańska, A., Walkowicz, M., Bulanda, M., Kasperski, T., Synowiec, E., Osuch, P. y Chmielarczyk, A. (2023). Evaluation of the Efficacy of UV-C Radiation in Eliminating Microorganisms of Special Epidemiological Importance from Touch Surfaces under Laboratory Conditions and in the Hospital Environment. *Healthcare*, 11(23), 3096. <https://doi.org/10.3390/healthcare11233096>.
- Setlow, P. y Christie, G. (2023). New thoughts on an old topic: secrets of bacterial spore resistance slowly being revealed. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 87(2), e00080-22. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00080-22>.
- Shibai, A., Takahashi, Y., Ishizawa, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Ying, B. W. y Tsuru, S. (2017). Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli*.

Scientific Reports, 7(1), 14531. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15008-1>.

Song, C., Wen, R., Zhou, J., Zeng, X., Kou, Z., Li, Y., Yung, F. y Wu, R. (2022). UV C light from a light-emitting diode at 275 nanometers shortens wound healing time in bacterium-and fungus-infected skin in mice. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e03424-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03424-22>.