



Original

Artículo español

Nulo efecto bactericida de la radiación ultravioleta emitida por diodos LED.

Null bactericidal effect of ultraviolet radiation emitted by LEDs.

Francisco Alcántara Muñoz, Rafael Moreno-Rojas, Alicia Moreno Ortega, José Emilio Muñoz Cañete y Rafael Gómez Díaz

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba. Campus Rabanales. Córdoba. España

Resumen

El objetivo de esta investigación ha sido evaluar el efecto bactericida de la luz ultravioleta emitida mediante dispositivos LEDs sobre el crecimiento en placa de Petri de microorganismos sobre los que se establecen límites legales en los alimentos.

Se ha diseñado un equipo de alimentación eléctrica con temporización precisa y cámara para evitar fugas lumínicas en el que se han conectado dos dispositivos de emisión de radiación ultravioleta mediante tecnología LEDs a diferentes longitudes de onda: mediante una matriz de LEDs (array) que emiten en torno a 350nm y mediante un único LED específico de emisión a 280nm.

Se han usado 1000 ufc de *E. Coli* y *S. aureus* sembradas sobre PCA, como prototipos de bacterias gram negativas y positivas, respectivamente, sobre las que se ha irradiado en diferentes intervalos de tiempos con luz ultravioleta, mediante ambos dispositivos, realizando toda la experiencia con ambos dispositivos por triplicado.

En las tres series de tratamientos a ambas longitudes de onda, no se han observado reducciones del crecimiento microbiano. La serie de siembras en PCA, contemplaba placas sin siembra, por las que se ha podido descartar la posibilidad de recontaminaciones posteriores.

Palabras clave

Radiación ultravioleta, bactericida, diodo.

Abstract

This research has aimed to assess the bactericidal effect of ultraviolet light emitted by LEDs on the growth on Petri dishes of microorganisms whose legal limits in foods have been established.

An electrically fed apparatus has been designed with precise timing and a camera to prevent light spillage, in which two ultraviolet radiation emission devices were connected by LED technology at different wavelengths: through an array of LEDs emitting at around 350nm, and a single specific emission LED at 280nm.

1000 cfu of *E. Coli* and *S. aureus* sown on PCA were used as prototypes of gram negative and positive bacteria, respectively, onto which ultraviolet light was radiated at different time intervals, by means of both devices, with the whole experiment being carried out in triplicate.

In none of the three series of treatments at the two wavelengths were reductions in microbial growth observed. The series of sowings on PCA were done on unseeded plates in order to be able to discard the likelihood of subsequent recontamination.

KEYWORDS

Ultraviolet Rays, Bactericidal, diode.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rafael.moreno@uco.es (Rafael Moreno – Rojas).

Recibido el 31 de agosto de 2016; aceptado el 8 de septiembre de 2016.



Introducción:

En países desarrollados, la seguridad microbiológica es una garantía que se sobreentiende que debe tener cualquier producto alimenticio. Tradicionalmente, para garantizar un mínimo riesgo por gérmenes patógenos, se han utilizado tratamientos térmicos de diferente intensidad y duración, que amén de garantizar la reducción drástica del riesgo por gérmenes patógenos, ocasiona efectos indeseables sobre los nutrientes y en ocasiones sobre los atributos organolépticos de los alimentos tratados. Es por tanto un desafío de la industria alimentaria moderna, la búsqueda de una efectiva reducción de la carga de gérmenes en un alimento, sin modificar sustancialmente sus características nutricionales y organolépticas. Para resolverlo se han desarrollado técnicas alternativas como el uso de atmósferas modificadas, altas presiones hidrostáticas, biocidas naturales, etc.

Entre las técnicas alternativas al tratamiento térmico se encuentra el uso de radiación ultravioleta. Dicha luz que corresponde a una pequeña zona del espectro electromagnético que va desde 100 a 400 nm, dentro del cual se suele subdividir en tres subzonas UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (200-280 nm) ⁽¹⁾.

Cuando la luz ultravioleta incide sobre la materia puede provocar absorción, reflexión, refracción y dispersión (scattering). Además de estas formas de interacción, la longitud de onda e intensidad de la radiación son decisivas en cuanto al efecto que puedan producir sobre un compuesto químico o un ser vivo.

La radiación UV-C presenta carácter bactericida frente microorganismos como bacterias, virus, protozoos, mohos y levaduras, presentando el mayor efecto bactericida en el rango de longitudes de onda comprendidas entre 250 y 270 nm ⁽²⁾ variando el efecto dependiendo de los factores de la matriz que pueden desplazar el pico de absorción correspondiente al ADN.

La emisión de radiación a la longitud de onda de 254 nm es utilizada para la desinfección de superficies, agua y algunos alimentos líquidos ^(1, 3).

Cuando irradiamos un microorganismo con luz ultravioleta en el rango de 235 a 310 nm provocamos daños en la estructura de ADN, estos daños podrán variar su intensidad dependiendo de tres factores: tipo de pared celular, su espesor y su composición. Obviamente se pretende que el daño ocasionado sea superior a la capacidad de reparación de ADN que presenta.

La dosis necesaria para la reducción microbiana depende también de la naturaleza de ésta y se cuantifica mediante el parámetro D (mJ/cm^2), que nos informa de la sensibilidad a la radiación de cada tipo de microorganismo. Este valor D medido a 253.7 nm ⁽⁴⁾ para enterobacterias estaría entre 2 y 8, en tanto para cocos entre 1.5 y 20. En ambos casos se encuentran entre los valores más bajos, lo que presupone que son de los microorganismos más sensibles a la radiación ultravioleta ⁽⁴⁾.

La idea de utilizar radiación ultravioleta se fundamenta por la capacidad de uso de ésta tecnología a bajas temperaturas (método de desinfección no térmico), lo que presenta las siguientes ventajas frente a los tratamientos térmicos ⁽⁵⁾:

- Es una técnica limpia, con ausencia de residuos o subproductos.
- No generan olores ni sabores indeseables.
- No necesita grandes requerimientos energéticos frente a los tratamientos térmicos convencionales, pasteurización ó esterilización.
- Las pérdidas de aromas y vitaminas durante el tratamiento son muy pequeñas.
- No provoca cambios de color en el alimento.

La justificación para utilizar LED se basa en sus ventajas frente a las lámparas de emisión ultravioleta convencionales de mercurio ⁽⁶⁾:

- Menor consumo energético.
- Menor tiempo de emisión.
- Ambientalmente inocuo.
- Rango de longitudes de onda sintonizable y radiación más focalizada.
- Posibilidad de miniaturización.
- Menor efecto contaminante en su reciclado

Si bien este efecto bactericida de la radiación ultravioleta es bastante conocido, la aplicación actual en el campo agroalimentario es muy limitado, limitándose casi exclusivamente al tratamiento de aguas.

Objetivos:

El objetivo del presente estudio es comprobar el efecto bactericida que produce la aplicación de radiación ultravioleta mediante diodos LEDs a dos longitudes de onda, sobre microorganismos potencialmente patógenos, centrándonos en los más lábiles a la radiación, tanto gram positivos, como negativos.

Material y métodos:

Todo el equipamiento electrónico aplicado en este proyecto ha sido diseñado y desarrollado exprofeso para el mismo, al no existir en este momento en el mercado ningún dispositivo de estas características (figura 1).

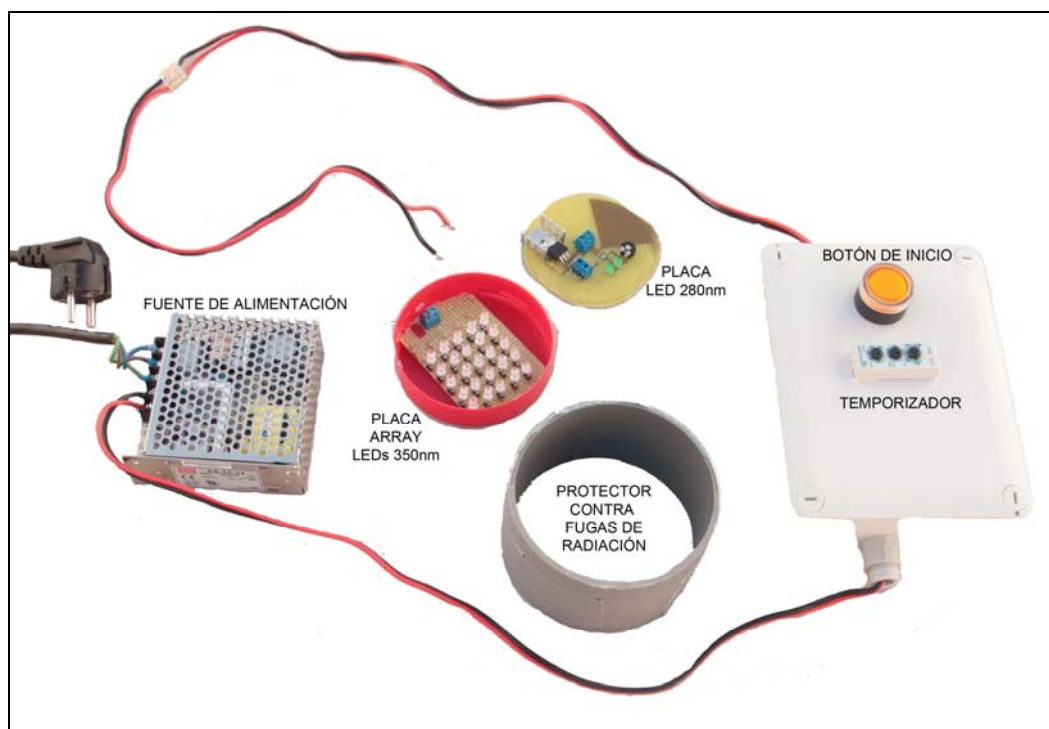


Figura 1.- Componentes del equipo de emisión de luz ultravioleta mediante leds.

Emisión ultravioleta mediante array de 350nm

Dado que no existe disponibilidad comercial en España de diodos LEDs que trabajen a las longitudes de onda que se sabe que presentan mayor rango bactericida (270-280nm), se optó por un primer montaje de un equipo de emisión con LEDs UV convencionales cuya longitud de onda se encuentra en torno a los 350nm.

Se preparó una placa de circuito impreso con una cuadrícula de 5 x 5 soportes para LEDs separados un centímetro, sobre los que se ubicaron los 25 diodos convencionales. El objetivo de esta cuadrícula era cubrir uniformemente con radiación la superficie de una placa de Petri convencional. El uso de soportes para los LEDs permite la rápida sustitución de los mismos en caso de un fallo en el funcionamiento.

Como fuente de alimentación se utilizó una fuente conmutada industrial, capaz de suministrar 24 voltios a 2 amperios (aproximadamente 50W). Se ajustó mediante resistencias y reguladores para que el voltaje de salida fuera de 3.2 V y 64 mW por LED lo que supone unos 100 mA de consumo y 16 V. Obviamente, todos los cálculos de consumo y potencia se realizaron para garantizar una intensidad lumínica suficiente a la vez que la máxima durabilidad de los LEDs. Para ello, se utilizaron resistencias variables que permiten realizar una sobrealimentación de los LEDs en caso de necesitar dotarlos de mayor intensidad, o por el contrario reducir la potencia, en caso de presentar problemas de fundidos frecuentes de los LEDs. Los consumos se calcularon y regularon por líneas de 5 para evitar que el fallo fortuito de un LED inutilice la emisión en toda la placa, limitando la posible afectación a sólo una línea de 5 LEDs.

Ya que la emisión lumínica de los LEDs está fuera del alcance del ojo humano, además de poder ser lesivo para el mismo, la constatación del funcionamiento de los LEDs se realiza por cálculo de consumo en el laboratorio electrónico y como testigo se incorpora un LED coloreado que evidencia el funcionamiento del circuito (de al menos una hilera de 5 LEDs). Además, como medida de seguridad, durante la emisión de luz ultravioleta una lámpara testigo en el disparador avisa de dicho funcionamiento.

Para la aplicación de forma exacta de los tiempos de radiación se diseñaron dos sistemas. El primero consistió en un control mediante un ordenador a través de puerto RS232 y un software específico. Este software se diseñó para poder aplicar "pulsos" lumínicos en caso de ser necesario. Dado que el desarrollo del software se realizó a bajo nivel (lenguaje de compilación) se estimó que era demasiado complejo para interactuar con el mismo a nivel de laboratorio, por lo que se desestimó su uso hasta que se desarrolle un interfaz amigable que sea fácilmente manipulable por el usuario. El segundo sistema diseñado, que fue el finalmente aplicado consistió en un temporizador seriado en tres niveles que permite un control preciso de la exposición desde décimas de segundo hasta horas.

Para evitar que salida fortuita de luz ultravioleta pudiera tener efectos lesivos sobre los ojos de los usuarios, además de montar la placa de LEDs en un recipiente de plástico que focaliza la radiación en una única dirección, se utilizó un cilindro totalmente opaco, para que al usarlo, una vez iniciada la radiación fuera imposible la salida de luz al exterior del habitáculo formado.

En una primera prueba se observa que las tiras de diodos consumen 30mA en vez de 20mA (entra dentro del rango permitido). Sin embargo, esto hace que la resistencia variable utilizada se caliente. Se rehace el sistema con una resistencia con mayor capacidad de disipar el calor producido.

Emisión ultravioleta a 280nm

Especificaciones técnicas

En nuestra investigación se han usado diodos LEDs 5050 modelo 'TH-UV280T-5050L' fabricante Zhuhai Tianhui Electronic Co., Ltd que presenta una emisión media a 280 nm, con una desviación típica de 10 nm. Este rango de emisión corresponde con la longitud de onda de desestabilización del ADN/ARN, teniendo en cuenta el efecto de desplazamiento hacia longitudes de onda superiores, debido a que las muestras para las que puede tener uso este tipo de tratamiento se encuentran en disolución acuosa y en medio salino.

El diodo presenta un ángulo de emisión de la radiación respecto a la perpendicular a su base en torno a 30 grados, lo cual se tuvo en cuenta a la hora de calcular la distancia del diodo a la placa para que la superficie irradiada fuese equivalente a toda la placa de Petri. Todas las especificaciones indicadas son para una intensidad de 20 mA.

Desarrollo:

Este tipo de diodos no se suelen comercializar en Europa y se pueden conseguir por importación directa de fabricantes en EEUU y en China, que no suelen vender al por menor.

Para el segundo montaje estaba diseñado utilizar como fuente de emisión tres diodos que presentan un máximo de emisión en torno a una longitud de onda de 280nm a una intensidad de 20 mA y una tensión directa de 6.8 V.

Estos diodos con este formato (soporte plástico), son extremadamente sensibles a la temperatura de soldadura, así como a las diferencias de tensión. Esta extrema sensibilidad hizo que se perdieran dos diodos LEDs de los adquiridos. Uno de ellos por alcanzar una elevada temperatura al soldar. El otro se perdió por suministrar una tensión de 0,4V superior al máximo permitido para el diodo en cuestión, lo cual se produjo dado que cada diodo de forma individual viene calibrado para una tensión concreta. Lamentablemente al montar el diodo en cuestión se usó la de otro de los diodos suministrados que era superior.

Estos factores limitan la utilidad de los dispositivos, a lo que se debe sumar su expectativa de vida útil, que según el fabricante, es de apenas unas decenas de horas.

Se diseñó un circuito regulador de tensión altamente fiable y se limitó a la vez la corriente suministrada con dos diodos LEDs en paralelo (consumo máximo 10mA cada uno) que limitan la corriente. El hacerlo con LEDs de emisión en el rango óptico en lugar de resistencias fue para comprobar además que el circuito está funcionando correctamente.

Por otro lado, en la placa diseñada para integrar el diodo (circular, del tamaño de una placa de Petri), se incorporó un disipador de temperatura (pista de cobre), que al estar en contacto con la superficie caliente del diodo permite que pueda disipar más calor. Para alimentar el circuito y temporizar, se utilizó el mismo circuito de potencia y temporizador que en el montaje anterior.

De nuevo se diseñó un minicubículo en el interior del cual se ubica de manera ajustada la placa de Petri, evitando cualquier fuga de luz ultravioleta, de especial interés ya que a esta longitud de onda su incidencia es aún más lesiva para el ojo humano.

Preparación microbiológica

Como soporte para la inoculación de los microorganismos se utilizó agar-agar, (Scharlau), con pectona como medio nutriente, usándose 35g en 1 litro de agua destilada. Esterilizándose posteriormente.

Como medio de dilución del microorganismo se utilizó NaCl de Panreac, al 8.5% en peso, para realizar las posteriores diluciones decimales. Se realizaron seis diluciones decimales del microorganismo, que tras las 24 horas de incubación presentaron una concentración aproximada de 10^9 uC/ml, hasta llegar en la sexta dilución a una concentración de 10^3 uC/mL, que fue la dilución que se tomó para el recuento posterior de microorganismos.

La elección de los microorganismos a usar fue, como bacteria gramnegativa: *Escherichia coli* O157:H7 ; y como grampositiva: *Staphylococcus aureus*. En ambas está documentado que su ADN es especialmente lábil frente a radiaciones UV⁽⁴⁾.

Se tomó como medio de cultivo para *E.coli* TCB (3ml), llevándolo a una estufa de incubación durante 24 horas a 37°C. Se usó una placa control sin microorganismo para detectar visualmente cualquier anomalía durante el desarrollo del crecimiento microbiano. Para el caso del *Staphylococcus aureus* el tratamiento fue análogo. En adelante a ambos microorganismos los denominaremos inóculo.

La metodología se desarrolló en la cabina de flujo laminar, previamente desinfectada. Sobre placas de Petri con PCA, usando la quinta dilución de nuestro microorganismo; con una micropipeta tomamos 0.1 ml de concentración 10^4 uC/mL lo que equivale a 1000 Uc por placa de Petri, el inóculo se extendió con una varilla de manera que quedara homogéneamente repartido.

Tratamientos de radiación ultravioleta

Tanto en el caso del equipo de emisión de array a 350nm como con el de 280nm se siguió el mismo protocolo de actuación lumínica: aplicamos la radiación emitida por los diodos sobre la placa con el inóculo, a distintos tiempos de exposición, 1, 5, 20, 40 y 70 minutos, utilizándose tres placas por cada exposición temporal.

También se utilizaron tres placas inoculadas a las que no se les aplicó la radiación, ya que las utilizamos como referencia de crecimiento microbiano en ausencia de radiación.

Por último se usaron tres placas de Petri sin inóculo y sin radiación para comprobar que ninguna contaminación fortuita pudiera desvirtuar el experimento.

Posteriormente introducimos todas las placas en una estufa a 37°C y 24 horas para su incubación y posterior recuento.

Cada experiencia completa de tiempos de radiación sobre placas por triplicado para cada microorganismo y método de radiación se repitió tres veces.

Resultados y Discusión:

Desafortunadamente, los resultados obtenidos verifican la hipótesis nula de que la irradiación con LEDs ultravioleta no atenúan el crecimiento microbiano ni para *E. coli*, ni para *S. aureus* para ninguna de las longitudes de onda utilizadas (350nm y 280nm). Es decir, no se observa ninguna reducción de *E.coli* ni de *S. aureus*, para ningún tiempo de exposición en los dos sistemas de emisión LED que se han utilizado, red de 25 diodos convencionales (350nm) y 1 diodo (280nm), frente al control inoculado no radiado.

La experiencia se ha repetido en tres ocasiones para cada sistema de los dos diferentes longitudes de onda, comprobando la integridad de los componentes electrónicos para cerciorarse de su adecuado funcionamiento.

Los controles sin inóculo se mantienen limpios en todos los casos tras la incubación, lo cual nos informan que no existe ningún tipo de contaminación en el interior de la cámara de flujo laminar.

A pesar de estos resultados negativos, consideramos oportuno realizar algunas consideraciones sobre los resultados obtenidos individualmente en cada sistema utilizado.

Ultravioleta array de 350nm

En el caso del primer montaje, red de 25 diodos (350nm) la ausencia de efecto bactericida podría estar justificada debido a que la máxima emisión se encuentra a una longitud de onda a la cual, según la bibliografía, no se producen daños en la estructura de ADN. A pesar de ello, *Yagi Noriyuki y col.* ⁽⁷⁾ encuentran efectos bactericidas, aunque refieren que la máxima actividad puede estar en un rango de entre 235nm a 310nm. *Okamoto y col.* ⁽⁸⁾ indican que a mayor tiempo de irradiación de UV-A mediante LEDs, producía un mayor efecto bactericida sobre *Helicobacter pylori*. *Nakahashi y col.* ⁽⁹⁾ comprueban sobre *Vibrio parahaemolyticus* en agua, el efecto con LEDs de UV-A.

A pesar de conocer la menor eficacia de esta zona de longitudes de onda, los resultados positivos encontrados por los autores citados y los menores costes y dificultades técnicas para desarrollar esta emisión, fundamental en su posterior implantación industrial, fueron los motivos de incluirla en el modelo experimental.

Ultravioleta a 280nm

Los resultados del segundo sistema de irradiación son aún más inesperados, ya que se trata de un diodo mucho más específico, donde el fabricante (Zhuhai Tianhui Electronic Co.,Ltd) asegura su aplicación como bactericida en tratamientos de depuración de agua, con los mismos ó menores tiempos de radiación y a una distancia de aplicación incluso mayor y con un flujo laminar de agua. Este efecto es previsible al presentar el máximo de emisión de longitud de onda en torno a 280nm, que se encuentra dentro del rango de alteración del ADN ⁽⁷⁾.

Kaur y col. ⁽¹⁰⁾ demuestran que la atenuación en *Aeromonas hydrophila* con UV-C es mayor que con fotocatalización con dióxido de titanio, aunque menos efectiva que los ultrasonidos. *Nakahashi y col.* ⁽⁹⁾ comprueban sobre *Vibrio parahaemolyticus* en agua el efecto con LEDs de UV-C, si bien el efecto se incrementa con la aplicación simultánea o secuencial de UV-A.

Los resultados negativos obtenidos, suponemos que se debe principalmente a una baja intensidad en la luz emitida, ya que la reducción microbiana por radiación no depende únicamente de la elección de la longitud de onda, sino que se debe tener en cuenta un factor que es crítico: la dosis aplicada. Esta idea de la baja intensidad de luz se puede avalar por el hecho de que en la placa, que coincidía con la totalidad de la zona radiada, no presentaba ningún halo de menor densidad microbiana, como cabría esperar. Aunque se comprobó la longitud de onda a la que emitían los dos sistemas de diodos LEDs mediante un espectrofotómetro, no pudimos establecer la intensidad de radiación emitida, que puede ser inferior a la indicada por las especificaciones del fabricante en este segundo sistema. En todas las desactivaciones microbianas es necesario aplicar una dosis D (J/m^2) superior a la umbral, por lo que posiblemente no se llegara a alcanzar en nuestra investigación dicho umbral.

Conclusiones:

La actuación mediante radiación ultravioleta de hasta 70 minutos a 350nm y 280nm resultaron ineficaces para la reducción del crecimiento microbiano de *E.coli* y *S. Aureus*. Aunque no tenemos constatación fehaciente, es posible que el factor decisivo en la falta de inactivación con el diodo de 280nm se deba a baja intensidad lumínica.

Propuestas

Es imprescindible comprobar si la intensidad de la radiación, medida como dosis D (J/m^2) es superior al umbral, antes de desarrollar este tipo de experiencias.

Sería conveniente testar inicialmente el efecto bactericida en agua de los diodos LEDs a 280nm (avalada por el fabricante) y posteriormente llevarlo a cabo sobre agar-agar.

Dada la ausencia de investigaciones del efecto de los diodos LEDs UV sobre materia orgánica, consideramos muy interesante continuar esta línea por las posibles aplicaciones que pudieran derivarse para la industria alimentaria.

Referencias

1. Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *FOOD SCI TECHNOL INT.* 2004; 10: 137–148.
2. Bintsis T, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK. Review: Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry. *J SCI FOOD AGR.* 2000; 80(6): 637-645
3. Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. *J FOOD PROCESS ENG.* 2005; 28, 437–452.
4. Koutchma, T. Review: Advances In Ultraviolet Light Technology for Non-thermal Processing of Liquid Food. *FOOD BIOPROCESS TECH.* 2009; 2, 138-155.
5. Tran M. T. T., Farid M: Ultraviolet treatment of orange juice. *INNOV FOOD SCI EMERG.* 2004; 495-502
6. U.S. Environmental Protection Agency. Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Analytical Methods for the Biological Pollutants in Wastewater and Sewage Sludge; Final Rule. U.S. Federal Register; 2007.
7. Yagi N, Mori M, Hamamoto A, Nakan M, Akutagawa M, Tachebana S, Takahashi A, Ikehara T, Kinouchi Y, Ieee: Sterilization using 365 nm UV-LED. In *29th Annual International Conference of the IEEE-Engineering-in-Medicine-and-Biology-Society, Aug 22-26; Lyon, FRANCE.* 2007.
8. Okamoto T, Nishikawa J, Yanai H, Nakamura H, Takeuchi H, Kurai S, Akada JK, Sakaida I. In vitro bactericidal effects of near-ultraviolet light from light-emitting diodes on *Helicobacter pylori*. *SCAND J GASTROENTERO.* 2013; 48(12):1484-1486.
9. Nakahashi M, Mawatari K, Hirata A, Maetani M, Shimohata T, Uebanso T, Hamada Y, Akutagawa M, Kinouchi Y, Takahashi A. Simultaneous Irradiation with Different Wavelengths of Ultraviolet Light has Synergistic Bactericidal Effect on *Vibrio parahaemolyticus*. *PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG.* 2014; 90(6):1397-1403
10. Kaur J, Karthikeyan R, Pillai SD. Effectiveness of ultrasound, UV-C, and photocatalysis on inactivation kinetics of *Aeromonas hydrophila*. *J ENVIRON SCI HEAL A.* 2015; 50(12):1223-1229.