



Estudio de fotoreactivación en cultivos microbiológicos obtenidos de carga microbiana de la superficie de fresas sometidas a diferentes dosis de luz ultra violeta de onda corta UV-C

Study of photoreactivation in microbiological crops obtained from microbial loading of the surface of strawberries subject to different doses of short-wave UV-C ultraviolet light

Gustavo Andres Lara Oviedo¹, Maria Camila Navarro², Jean Atencio Altamiranda³

Recibo: 11.20.2017 Aceptado: 20.03.2018

Lara, G., Navarro, M. y Altamiranda, J. (2018). Estudio de fotoreactivación en cultivos microbiológicos obtenidos de carga microbiana de la superficie de fresas sometidas a diferentes dosis de luz ultra violeta de onda corta UV-C. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. 5(1), 32-40. doi:<http://dx.doi.org/10.23850/24220582.1148>

Resumen

Actualmente la agencia de gobierno de los Estados Unidos FDA (Administración de alimentos y Drogas), aprobó el uso de luz ultravioleta de onda corta (UV-C), en la desinfección de frutas, debido a que la exposición de estos rayos es capaz de disminuir la carga de microorganismos patógenos que pueda contener en su superficie y así alargar la vida útil de los productos, favoreciendo a los productores. Sin embargo, el mal uso de la luz ultravioleta puede tener sus riesgos frente a la estimulación de la resistencia de dichos microorganismos a la UV-C a través de un proceso conocido como fotoreactivación. Por ello esta investigación pretendió determinar el grado de fotoreactivación en cultivos microbiológicos que han sido sometidos a diferentes dosis de luz ultra violeta de onda corta UV-C. Se tomaron muestras de fresas comunes a los cuales se aplicaron diferentes dosis de UV-C incluyendo la convencional. Se analizó el efecto antibiótico del UV-C en la superficie de las fresas mediante un cultivo pre – post. Se obtuvo como resultado que la muestra sometida a la distancia usada actualmente por la industria (30 cm de la fuente UVC por 7.5 min), demostró ser la distancia eficaz para amenguar el crecimiento microbiano. Sin embargo, a una dosis elevada (20 cm de la fuente y 7,5 min) los cultivos de bacterias coliformes y levaduras mostraron un crecimiento microbiano exponencial frente a las demás muestras (prueba realizada por duplicado), lo que prueba la antítesis de la teoría que entre mayor fuese la dosis de rayos UV-C, mayor sería el daño del ADN de las bacterias inhibiendo su crecimiento dando fuerza a la teoría de a mayor dosis, mayor estímulo de fotoreactivación y resistencia al UV-C.

Palabras clave: rayos UV de onda corta, fotoreactivación, crecimiento microbiano, coliformes, levaduras.

¹Universidad del Sinú seccional Cartagena; andresoviedofcv@gmail.com , <https://orcid.org/0000-0001-8087-7387>; Colombia

²Universidad del Sinu seccional; Colombia

³Universidad del Sinu seccional; Colombia

Abstract

Currently the government agency of United States FDA (Food and Drug Administration) has approved the use of (UV-C) ultraviolet short-wavelength light disinfection of fruit, because exposure to ultraviolet light can reduce load of pathogenic microorganisms that may contain on their surface and thus extend the life of products favoring producers. However, misuse of ultraviolet light may also have risks, developing resistance of microorganisms to UV-C through a process known as photoreactivation. The objective of this research is to determine the degree of photoreactivation in microbiological cultures that have undergone different doses of ultra violet light short-wave UV-C. Samples of common strawberries to which different doses of UV-C were applied including conventional were taken. The antibiotic effect of UV-C on the surface of the strawberries was analyzed by pre – post culture. The results showed that the sample under the distance currently used by industry (30 cm from the UVC source for 7.5 min) proved to be the most effective distance for decrease microbial growth. However, at a high dose (20 cm from the source and 7.5 min) cultures of coliform bacteria and yeasts showed an exponential microbial growth compared to the other samples (test performed in duplicate), which proves the antithesis of theory that the higher was the dose of UV-C rays would be greater DNA damage by inhibiting microorganism's growth giving strength to the theory that the higher the dose, the greater stimulus photoreactivation and UV-C resistance.

Keywords: UV rays shortwave, photoreactivation, microbial growth, coliforms, yeast.

Introducción

En la actualidad, a nivel de pérdidas en países desarrollados, las frutas y verduras en mal estado significan más de un 20 % de los productos que se suelen perder después de la cosecha, lo que fácilmente ayudaría a un país en desarrollo a salir de una crisis alimentaria (Fernández, Saume, Rondón, 1982).

Tras lo anterior, se ha aumentado el interés de investigadores por buscar soluciones urgentes para evitar la descomposición de este tipo de alimentos, y como solución expertos han comenzado a utilizar la luz ultravioleta tipo C (UV-C) desde hace décadas para desinfectar a través de la irradiación la “superficie” de frutas y verduras pos cosecha reduciendo su descomposición temprana alargando así su vida útil en mercados y almacenes de cadena (Artes-Calero, Aguayo, Gómez y Artés-Hernandez, 2009).

Para el año de 1986, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), aprobó la radiación con UVC de frutas y verduras, y posteriormente, para 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS), avaló nuevamente el uso de UVC en alimentos en concordancia con la FDA y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Dicha alternativa favorecería, además disminuir el uso de higienizantes clorados y pesticidas utilizados en los procesos de desinfección de productos hortofrutícolas, siendo una técnica respetuosa con el medio ambiente al no generar residuos durante el proceso de descontaminación, convirtiéndose a su vez en una técnica favorable para el productor ya que es de inversión económica, mantenimiento y operación baja (Wright y Cairns, 1990).

En Colombia, el uso de UVC está reglamentado bajo la NTC 3525 solo para la desinfección de aguas (NTC, 2012).

Sin embargo, a pesar de que este tratamiento puede alargar la vida útil del producto destruyendo los microorganismos más relacionados con el deterioro temprano como hongos y levaduras (Silva, 2015), una dosis inadecuada podría sobre contaminarlo con otros microorganismos patógenos, debido a un proceso conocido como fotoreactivación (Domínguez y Parzanese, 2012); la fotoreactivación se trata de un proceso de reparación directa del ADN catalizado por una reacción enzimática, en la que dos dímeros de pirimidina unidos covalentemente (producto de una fotolesión previa), son monomerizados y restaurados tras ser expuestos a luz visible (Friedberg, 2016). Estos últimos podrían no causar deterioro del alimento, pero si convertirse en un riesgo alto para el consumidor final de contraer una enfermedad de transmisión alimentaria (Anderson, 2005; Merino, 2008).

La luz UVC, tiene un alto poder germicida. La longitud de onda a 253.7 nm es absorbida en un 85 % por el núcleo de la célula inactivándola y evitando su reproducción (Quintero-Cerón, Bohórquez-Pérez, Valenzuela-Real y Solanilla-Duque, 2013). Por tanto, todos los microorganismos que contienen ADN (virus, bacterias, esporas, mohos, etc.) son factibles de ser inactivados usando UVC. En cualquier caso, los parámetros más importantes respecto a la desinfección son la potencia de emisión del equipo y la dosis UV requerida para inactivar el microorganismo, evitando que la luz emitida genere daños en el fruto (Andrade-Cuvi, Moreno-Guerrero, Henríquez-Bucheli, Gómez-Gordillo, Concellón, 2010; González-Aguilar, Villegas-Ochoa, Cruz-Valenzuela, Vásquez, Ayala-Zavala, 2006).

Sin embargo, una dosis insuficiente, permitiría que la reproducción de los microorganismos no se vea afectada y si al contrario fuese excesiva, favorecería la aparición del fenómeno conocido como fotoreactivación, generando cierto tipo de resistencia al UV-C especialmente bacterias, estimulando a su vez la reproducción

a niveles exponenciales como mecanismo de supervivencia (McClellan, 2006).

Los ensayos in vitro que aún siguen realizándose con este tipo de tratamiento de desinfección, han demostrado que cuando la cantidad de luz que llega a los productos no es la idónea, vuelve a contaminarse el producto, tras un periodo de tiempo en el que se reproducen los microorganismos durante las condiciones de transporte, distribución comercial, etc. Pero poco se ha investigado aplicando que condiciones podrían darse aplicando la fotoreactivación.

En la actualidad, se han formulado dos teorías que podrían explicar este fenómeno. Stevens, Smith, Ryan, Podobnik & Mihailovic (1998), afirman que el tratamiento con UVC es capaz de activar una enzima conocida como “fotoliasa” la cual, es capaz de monomerizar los dímeros de tiamina, formados después de la irradiación, permitiéndole así al microorganismo nuevamente multiplicarse. Más recientemente, López-Díaz, Palou y López-Malo (2012), expusieron la teoría de la existencia de “fotoreceptores” en los microorganismos que una vez expuestos a dosis extremas de UVC permitían la expresión génica como mecanismo de defensa y supervivencia del microorganismo, de factores proteínicos reparadores del ADN dañado estimulando así el regeneramiento y la reproducción exponencial del microorganismo.

Debido a esto, nace el interés de determinar el grado de fotoreactivación en cultivos microbiológicos obtenidos de la carga microbiana de la superficie de fresas que han sido sometidos a diferentes dosis de luz ultravioleta de onda corta – UVC.

Materiales y métodos

Para la realización de este estudio, se utilizaron fresas comunes (*Fragaria x ananassa*),

variedad Diamante de mayor disponibilidad en el mercado colombiano. Las muestras fueron clasificadas en cuatro grupos (Muestra control, Muestra A, Muestra B, Muestra C), las cuales se lavaron con agua destilada para luego ser pesadas después del lavado con una balanza electrónica marca Lexus Dexter 3 calibrada. Por otra parte, Se analizaron las características organolépticas como olor y color de las muestras según lo expuesto en el manual para fresas de la Cámara de Comercio de Bogotá. La aplicación de irradiación UVC se realizó, a través de una lámpara marca Sylvania referencia G30 T6 germicida de longitud de onda 253.7nm (medido con radiómetro) manteniendo la muestra control fuera de su alcance a la cual, no se le aplico tratamiento.

Actualmente, en la industria alimentaria, la dosis para el tratamiento UV-C aplicado en fresas es 7,5 minutos a 30cm de una lámpara UV-C de 30 Watts (Silva, 2015), dosis que fue aplicada a la muestra B. Se experimentó con el tratamiento convencional (Muestra B) y se intensificó manteniendo la misma potencia y tiempo mencionada con anterioridad a: 20cm de la fuente (Muestra C) y disminuyó la dosis en

distancia a: 40cm de la fuente (Muestra A) en las muestras para determinar respectivamente el nivel mínimo de efecto germicida y la dosis estimulante de fotoreactivación. (Figura 1). Así mismo, se analizó cambios de peso en las fresas después del tratamiento con una balanza electrónica marca Lexus Dexter 3 calibrada.

Se analizó el efecto antibiótico del UV-C en las fresas, determinado mediante un cultivo pre – post tratamiento evaluado por medio de un recuento total, hongos, levaduras, y coliformes totales, utilizando en cajas Petri (en medios de *Patata Glucosa* (Mohos y levaduras) y *ChromoCult®* (*E. coli* y Coliformes totales) y siembras a profundidad de acuerdo a normas técnicas colombianas NTC 4458 y 5698-2 en cámara de flujo laminar previamente desinfectada marca ESCO con certificado ISO14644.1 Air cleanliness Class 3, de acuerdo a la norma.

Los tres tratamientos se realizaron por duplicado, siguiendo las respectivas normas de laboratorio y protección para la calidad de los resultados.

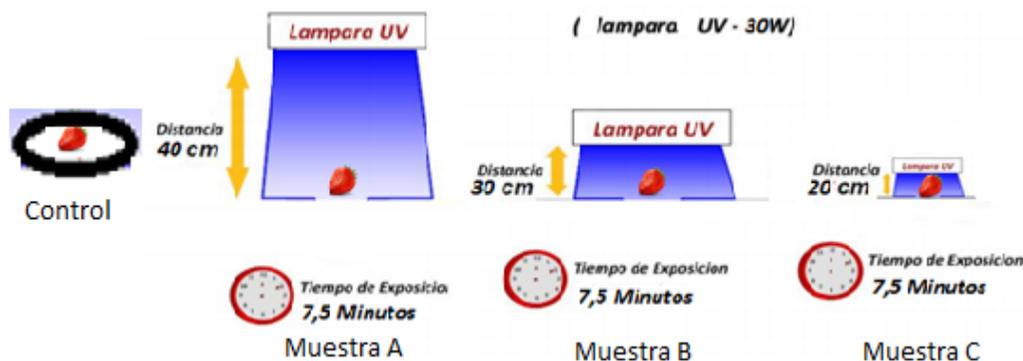


Figura 1. Metodología de aplicación de Luz UVC a las muestras de fresas a dosis industrial (n=B), dosis aumentada (n=C) y dosis disminuida (n=A).

Fuente: Propia de los investigadores

Resultados

En cuanto a olor y color, las fresas no presentaron cambios, lo que demuestra la amigabilidad de este tipo de energía con las características organolépticas básicas de las fresas.

Por otro lado, al evaluar el peso y comparar la cantidad de masa antes y después del tratamiento con UV-C, se pudo observar una reducción de peso, aunque no significativa luego del procedimiento (Tabla 1). Parcialmente es de gran importancia establecer que la muestra sometida a la distancia usada actualmente por

la industria (30cm de una fuente de 30W de potencia por 7,5min) demostró ser la distancia eficaz en cuanto a la inhibición del crecimiento microbiano de coliformes totales ($0 \text{ UFC} \times 10^0$ en el cultivo de la muestra post irradiación) (NTC, 2012).

Por otro parte, de los 40 cm de la fuente se demostró poca acción de los rayos UV-C como germicida de acuerdo al conteo de colonias a las 24 horas de incubación ($6 \text{ UFC} \times 10^0$ en el cultivo de la muestra post irradiación) (NTC 4458).

Tabla 1.

Peso de las muestras antes y después de tratamiento con UVC

Peso de las fresas en pre y post tratamiento UVC				
	Control	1A	1B	1C
Peso pre-UVC	14g	13g	10,8g	11,5g
Peso post-UVC	-	12,8g	10,6g	11g

Fuente: Propia de los Investigadores

Tabla 2.

Resultados de cultivos microbiológicos por recuento de unidades formadoras de colonias de muestras antes y después de tratamiento con UVC

Resultados de los cultivos pre-post tratamiento de coliformes totales			
	Distancia UVC	Pre – tratamiento	Post - tratamiento
Tratamiento			
Control	-	$1 \text{ UFC} \times 10^0$	-
A	40 cm	$35 \text{ UFC} \times 10^0$	$6 \text{ UFC} \times 10^0$
B	30 cm	$10 \text{ UFC} \times 10^0$	$0 \text{ UFC} \times 10^0$
C	20 cm	$18 \text{ UFC} \times 10^0$	$244 \text{ UFC} \times 10^0$

Fuente: Propia de los Investigadores

Sin embargo, a solo 20cm de la fuente (prueba realizada por duplicado), los cultivos mostraron un crecimiento microbiano exponencial frente a las demás muestras ($244 \text{ UFC} \times 10^0$

en el cultivo de la muestra post irradiación) (NTC 4458), confirmando la reactivación del microorganismo (Tabla 2 y Figura 2).

Con respecto a crecimiento de hongos, la muestra sometida a la distancia usada actualmente por la industria (30cm de una fuente de 30W de potencia por 7,5min) demostró ser más eficaz en la inhibición del crecimiento microbiano de levaduras (15UFC x 10⁰ Lev y 0UFC x 10⁰ mohos en el cultivo de la muestra post irradiación) (NTC 5698-2) en comparación a la muestra a 40 cm de la fuente (75UFC x 10⁰ y 0UFC x 10⁰ mohos en el cultivo de la muestra post irradiación).

Al igual que en el cultivo de coliformes totales, a solo 20cm de la fuente (prueba

realizada nuevamente por duplicado), los cultivos mostraron un crecimiento microbiano exponencial de levaduras frente a las demás muestras (339UFC x 10⁰ de Levaduras en el cultivo de la muestra post irradiación) confirmando que la reactivación y resistencia al UVC también puede darse a nivel de levaduras (Tabla 3 y Figura 3).

Con respecto a los Mohos no se observó ningún cambio, esto debido a que probablemente no se encontraban en la pre muestra en el momento del experimento (Tabla 4).

Tabla 3.

Resultados microbiológicos por recuento de unidades formadoras de colonias antes y después de tratamiento – levaduras

Resultados de los cultivos pre-post tratamiento de Levaduras			
Tratamiento	Distancia UVC	Pre – tratamiento	Post - tratamiento
Control	-	117 UFC x 10 ⁰	-
A	40 cm	39 UFC x 10 ⁰	75 UFC x 10 ⁰
B	30 cm	144 UFC x 10 ⁰	15 UFC x 10 ⁰
C	20 cm	106 UFC x 10 ⁰	339 UFC x 10 ⁰

Fuente: Propia de los Investigadores

POST - TRATAMIENTO

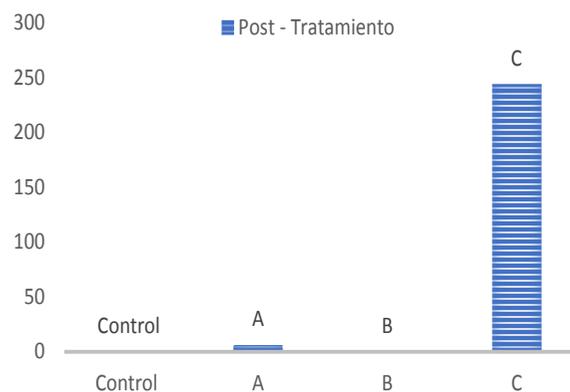


Figura 2. Resultado muestras Control, A, B y C Post tratamiento de coliformes totales (xUFC)

Fuente: Propia de los Investigadores

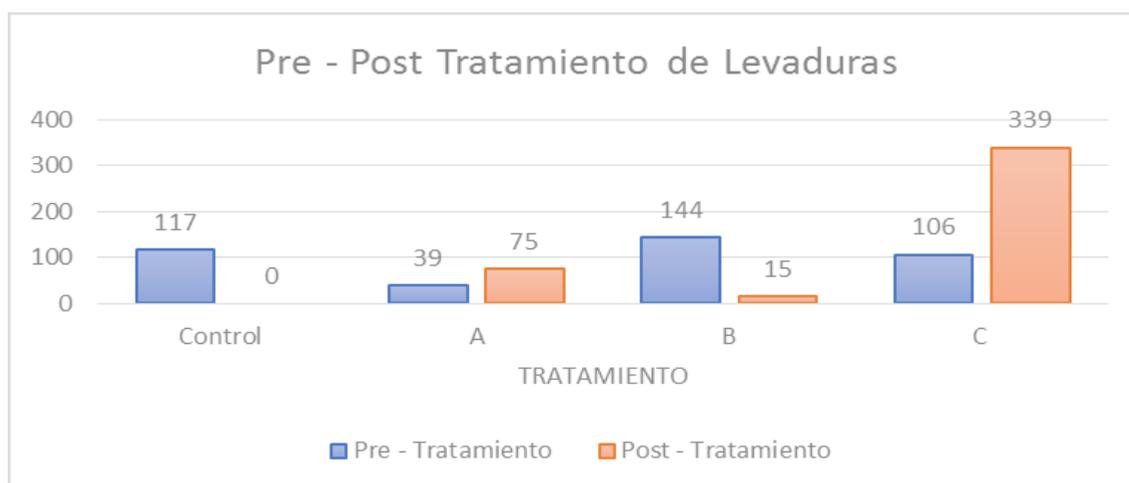


Figura 3. Resultado muestras Control, A, B y C Pre y pos tratamiento de levaduras (xUFC).
Fuente: Propia de los Investigadores.

Tabla 4.

Resultados microbiológicos por recuento de unidades formadoras de colonias antes y después de tratamiento – mohos.

Tratamiento	Distancia UVC	Pre – tratamiento	Post - tratamiento
Control	-	0 UFC x 10°	-
A	40 cm	1 UFC x 10°	0 UFC x 10°
B	30 cm	0 UFC x 10°	0 UFC x 10°
C	20 cm	4 UFC x 10°	0 UFC x 10°

Fuente: Propia de los Investigadores.

Discusión

Analizando los resultados del estudio, después de las pruebas microbiológicas y organolépticas realizadas manteniendo estándares de calidad requeridos por la normatividad colombiana, es evidente la existencia de un proceso de resistencia al tratamiento por parte de coliformes totales y levaduras en las muestras estudiadas irradiadas a dosis extremas de UVC frente a la convencional.

Se comprobó que el empleo de UV-C al tratarse de un sistema físico de desinfección, los micro-organismos no son capaces de generar resistencia a la desinfección y en los cuales se basaron los diferentes entes gubernamentales como la FDA y la OMS para su aprobación

en la industria de alimentos. Por otro lado, el crecimiento microbiano exponencial frente a las demás muestras evidencia que entre mayor es la dosis de rayos UV-C, mayor sería el daño del ADN de los microorganismos inhibiendo su crecimiento dando fuerza a la teoría de a mayor dosis, mayor estímulo de fotoreactivación y resistencia al UV-C.

Ahora bien, si existen los suficientes estudios que permitan determinar el grado de riesgo por la aplicación de este tipo de germicida tecnológico, ya que su aplicación puede alargar la vida del producto beneficiando al productor, pero con un alto riesgo de producir resistencia al UVC y sobre contaminación del producto por microorganismos patógenos que no dañan el producto pero que podrían afectar la salud del consumidor final.

Finalmente, la literatura reporta que la resistencia se produce porque el ADN puede ser reparado por factores proteínicos (Yajima *et al.*, 1995), cuando los microorganismos dañados se exponen a longitudes de onda superiores a 330 nm (Liltved y Landfald, 2000; Domínguez y Parzanese, 2012). Sin embargo, se demostró que a longitudes menores de 300nm también puede darse el fenómeno ya que la longitud de onda utilizada en este estudio fue de 253.7nm de acuerdo a la información de la lámpara utilizada para las irradiaciones.

Conclusiones y recomendaciones

Puede concluirse que el tratamiento con luz ultravioleta tipo C actualmente recomendado en la industria comercializadora de fresas es adecuado para disminuir la carga microbiológica a nivel de la superficie. Sin embargo a pesar de que el tratamiento no afecta características organolépticas, estimuló el sobrecrecimiento de bacterias coliformes y levaduras a dosis extremas de UVC convirtiéndose en un hallazgo que da fuerza a la teoría de que los microorganismos pueden desarrollar resistencia a los tratamientos con UVC, advirtiendo así a los entes gubernamentales encargados de la regulación de dichos sistemas de tratamiento tecnológico una mayor inversión en estudios del mismo y considerar sus posibles riesgos a largo plazo.

Referencias

- Anderson, M. (2005). *Enfermedades de origen alimentario: su prevención*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Andrade-Cuvi, M., Moreno-Guerrero, C., Henríquez-Bucheli, A., Gómez-Gordillo, A., Concellón, A. (2010). Influencia de la radiación UV-C como tratamiento postcosecha sobre carambola (*Averrhoa carambola L.*) mínimamente procesada almacenada en refrigeración. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11 (1), 18-27.
- Artes-Calero, F., Aguayo, E., Gómez, P., y Artés-Hernandez, F. (2009). Productos vegetales mínimamente procesados o de la cuarta gama. *Horticultura Internacional*, 69, 52-59.
- Domínguez, L. y Parzanese, M. (2012). *Ultravioleta en la conservación de alimentos*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina: Alimentos Argentinos. Recuperado de: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=513>
- Fernández, M., Saume, F. y Rondón, A. (1982). Contaminación de hortalizas y frutas con residuos de insecticidas en Venezuela, debido al uso irracional e inapropiado de plaguicidas químicos. Congreso Anual de la Soc. Americana de Ciencias Hortícolas Región Tropical. I Congreso Venezolano de Horticultura. Caracas (Venezuela).
- Friedberg, E. A. (2016). A history of the DNA repair and mutagenesis field: The discovery of base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 37, 35-39. doi:10.1016/j.dnarep.2015.12.003
- González-Aguilar, G., Villegas-Ochoa, M., Cruz-Valenzuela, F., Vásquez, F., Ayala-Zavala, J. (2006). *Irradiación UV-C de mango fresco cortado y su capacidad en la actividad antioxidante*. Recuperado de: <http://www.hoticom.com/pd/imagenes/65/983/65983.pdf>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00159-1)
- López-Díaz, A. S., Palou, E. y López-Malo, A. (2012). Radiación ultravioleta en jugos de frutas: fundamentos y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6 (2), 79-93.
- Mcclean, J. (2006). Comparación de Mecanismos de Reparación Microbiana con Lámparas UV de Baja y Mediana Presión. *Agua Latinoamericana*, 6(4), 12-14.
- Merino, L. (2008). *Importancia de los vegetales que se consumen crudos en la transmisión de enfermedades de origen alimentario*. Buenos Aires, Argentina: SIIC SALUD.
- NTC (2012). NTC 3525. *Agua envasada*. Bogotá, Colombia: ICONTEC Internacional
- Quintero-Cerón, J.P., Bohórquez-Pérez, Y., Valenzuela-Real, C. y Solanilla-Duque, J. (2013). Avances en la aplicación de luz ultravioleta de onda corta (UVC) en frutas y vegetales enteros y mínimamente procesados: revisión. *Revista Tumbaga*, 1(8), 29-60.
- Silva, M. (2015). Irradiación uvc y tiempo de almacenamiento en características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras en *ananas comosus var. Cayena lisa*, mínimamente procesada. *Cientifi-k*, 2 (1), 47-61.
- Stevens, C. J., Smith, D. C., Ryan, J. F., Podobnik, B. & Mihailovic, D. (1998). Stevens *et al.*, Reply *Phys. Rev. Lett.* 80, 36-65. doi:<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.80.3665>
- Wright, H. B. y Cairns, W. L. (1990). Luz ultravioleta. *Canadá*, 23, 20-21.
- Yajima, H., Takao, M., Yasuhira, S., Zhao, J.H., Ishii, C., Inoue, H., & Yasui, A. (1995) A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light., *EMBO*, 14(10), 2393-9.