

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD GERMICIDA DE LA LUMINARIA LED UV OVNI100UVC

El objetivo de este estudio es comprobar la capacidad germicida de la luminaria LED UV (OVNI100UVC) de GEALÉD, S.L.

Datos del solicitante:

Nombre: GEALÉD, S.L.

Dirección: Calle Senda de les Animes 205, 46470 Catarroja (Valencia)

Teléfono: 96 126 00 07



Lugar y fecha de realización del ensayo:

Laboratorio: LAB Laboratoris, S.L.

- ✓ ISO 9001:2015 para la toma de muestras y análisis microbiológicos y físico-químicos en aguas, alimentos, cosméticos y superficies.

Fechas: 05/08/2020 – 10/08/2020

Dirección: Calle Molí 40, 46120 Alboraya (Valencia)

Teléfono: 96 185 75 11

Informe elaborado por:

Laura Calzado Herreros

Graduada en Biotecnología

Máster en Contaminación, Toxicología y Sanidad Ambientales

Tabla de contenido

Información	3
Cepas	3
Medio de cultivo	3
Inóculos	3
Características de los experimentos	3
Metodología	5
Experimento 1	5
Experimento 2	7
Experimento 3	9
Resultados	11
Resultados Experimento 1	11
Cálculos reducción logarítmica.....	11
Resultados Experimento 2	15
Cálculos reducción logarítmica.....	15
Resultados Experimento 3	18
Cálculos reducción logarítmica.....	18
Conclusiones	22
Perspectivas futuras	22

Información

Cepas

Las cepas que se mencionan a continuación han sido las empleadas en el siguiente estudio.

- ➡ Cepa: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach 1884 CECT 239
- ➡ Cepa: *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 CECT 516

Dichas cepas han sido obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para ambas cepas es el Agar Triptona-Soja (**TSA**). Se trata de un medio general con un excelente valor nutritivo. Dicho medio es apto para el crecimiento y aislamiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, así como para favorecer el desarrollo de la mayoría de microorganismos exigentes.

Inóculos

Las fechas de los inóculos empleados en los experimentos se recogen en la siguiente tabla.

Nº de experimento	Día del experimento	Día del inóculo <i>Escherichia coli</i>	Día del inóculo <i>Staphylococcus aureus</i>
1	5 de agosto de 2020	3 de agosto de 2020	3 de agosto de 2020
2	6 de agosto de 2020	3 de agosto de 2020	6 de agosto de 2020
3	7 de agosto de 2020	6 de agosto de 2020	6 de agosto de 2020

Todas las diluciones empleadas proceden de un inóculo inicial del orden de 10^8 ufc/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro).

Características de los experimentos

La distancia entre las placas de cultivo y la luminaria LED UV es de 55cm.

El tiempo de exposición a la luminaria LED UV es de 15 minutos.

Todos los experimentos se han realizado en dos modalidades:

- Sobre la placa vacía con el inóculo depositado en forma de “gota” siendo esta irradiada con la luminaria LED UV y posteriormente añadiendo el medio TSA.
- En superficie con el inóculo extendido por la placa de TSA siendo esta irradiada directamente con la luminaria LED UV.

La potencia media de la luminaria LED UV empleada en cada uno de los experimentos realizados se encuentra en la siguiente tabla.

Nº de experimento	Potencia (Wattios)
1	109 W
2	109,7 W
3	110 W

Metodología

Experimento 1

➤ Escherichia coli

De una dilución de *Escherichia coli* de 10^{-3} con una concentración del orden de 10^5 ufc/mL se siembran 0.1mL (a modo gotas) en 4 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa vacía (Control)
- 0.1mL placa TSA
- 0.1mL placa TSA (Control)

En las placas de TSA se extiende el inóculo con asa Digrafsky.

En cada una de las 4 placas hay del orden de 10^4 ufc.

Se guardan las placas Control y se exponen las otras 2 placas bajo la luz UV durante un periodo de 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, se extraen las placas de la luz UV y se procede a añadir el medio TSA a las placas vacías, tanto la que ha sido sometida a luz UV como la placa Control que no ha sido sometida a dicha luz. Se remueve la placa con el medio TSA líquido para que se homogenice el inóculo durante varios segundos en todas direcciones. Esperamos a que se gelifique el medio. Una vez gelificado, se introducen todas las placas de *Escherichia coli* en la estufa de $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

➤ Staphylococcus aureus

De una dilución de *Staphylococcus aureus* de 10^{-3} con una concentración del orden de 10^5 ufc/mL se siembran 0.1mL en 4 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa vacía (Control)
- 0.1mL placa TSA
- 0.1mL placa TSA (Control)

En las placas de TSA extendemos el inóculo con asa Digrafsky.

En cada una de las 4 placas habrá del orden de 10^4 ufc.

Se guardan las placas Control y se exponen las otras 2 placas bajo la luz UV durante un periodo de 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, se extraen las placas de la luz UV y se procede a añadir el medio TSA a las placas vacías, tanto la que ha sido sometida a luz UV como la placa Control que no ha sido sometida a dicha luz. Se remueve la placa con el medio TSA líquido para que

se homogenice el inóculo durante varios segundos en todas direcciones. Esperamos a que se gelifique el medio. Una vez gelificado, se introducen todas las placas de *Staphylococcus aureus* en la estufa de $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Los resultados del *Experimento 1* se leerán a las 24 y 48 horas para comprobar la eficacia de la luminaria LED UV.

Experimento 2

Se repite el *Experimento 1* para ratificar los resultados.

➤ *Escherichia coli*

De una dilución de *Escherichia coli* de 10^{-3} con una concentración del orden de 10^5 ufc/mL se siembran 0.1mL (a modo gotas) en 4 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa vacía (Control)
- 0.1mL placa TSA
- 0.1mL placa TSA (Control)

En las placas de TSA se extiende el inóculo con asa Digralsky.

En cada una de las 4 placas hay del orden de 10^4 ufc.

Se guardan las placas Control y se exponen las otras 2 placas bajo la luz UV durante un periodo de 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, se extraen las placas de la luz UV y se procede a añadir el medio TSA a las placas vacías, tanto la que ha sido sometida a luz UV como la placa Control que no ha sido sometida a dicha luz. Se remueve la placa con el medio TSA líquido para que se homogenice el inóculo durante varios segundos en todas direcciones. Esperamos a que se gelifique el medio. Una vez gelificado, se introducen todas las placas de *Escherichia coli* en la estufa de $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

➤ *Staphylococcus aureus*

De una dilución de *Staphylococcus aureus* de 10^{-3} con una concentración del orden de 10^5 ufc/mL se siembran 0.1mL en 4 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa vacía (Control)
- 0.1mL placa TSA
- 0.1mL placa TSA (Control)

En las placas de TSA extendemos el inóculo con asa Digralsky.

En cada una de las 4 placas habrá del orden de 10^4 ufc.

Se guardan las placas Control y se exponen las otras 2 placas bajo la luz UV durante un periodo de 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, se extraen las placas de la luz UV y se procede a añadir el medio TSA a las placas vacías, tanto la que ha sido sometida a luz UV como la placa Control que no ha sido sometida a dicha luz. Se remueve la placa con el medio TSA líquido para que se homogenice el inóculo durante varios segundos en todas direcciones. Esperamos a que

se gelifique el medio. Una vez gelificado, se introducen todas las placas de *Staphylococcus aureus* en la estufa de $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los resultados del *Experimento 2* se leerán a las 24 horas.

Experimento 3

➤ *Escherichia coli*

De una dilución de *Escherichia coli* de 10^{-3} con una concentración del orden de 10^5 ufc/mL se siembran 0.1mL (a modo gotas) en 4 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa vacía (Control)
- 0.1mL placa TSA
- 0.1mL placa TSA (Control)

En las placas de TSA se extiende el inóculo con asa Digrafsky.

En cada una de las 4 placas hay del orden de 10^4 ufc.

De una dilución de *Escherichia coli* de 10^{-1} con una concentración del orden de 10^7 ufc/mL se siembran 0.1mL (a modo gotas) en 2 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa TSA

En las placas de TSA se extiende el inóculo con asa Digrafsky.

En cada una de las 2 placas hay del orden de 10^6 ufc.

Se guardan las placas Control y se exponen las otras 4 placas bajo la luz UV durante un periodo de 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, se extraen las placas de la luz UV y se procede a añadir el medio TSA a las placas vacías, tanto la que ha sido sometida a luz UV como la placa Control que no ha sido sometida a dicha luz. Se remueve la placa con el medio TSA líquido para que se homogenice el inóculo durante varios segundos en todas direcciones. Esperamos a que se gelifique el medio. Una vez gelificado, se introducen todas las placas de *Escherichia coli* en la estufa de $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

➤ *Staphylococcus aureus*

De una dilución de *Staphylococcus aureus* de 10^{-3} con una concentración del orden de 10^5 ufc/mL se siembran 0.1mL en 4 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa vacía (Control)
- 0.1mL placa TSA
- 0.1mL placa TSA (Control)

En las placas de TSA extendemos el inóculo con asa Digrafsky.

En cada una de las 4 placas habrá del orden de 10^4 ufc.

De una dilución de *Staphylococcus aureus* de 10^{-1} con una concentración del orden de 10^7 ufc/mL se siembran 0.1mL en 2 placas:

- 0.1mL placa vacía
- 0.1mL placa TSA

En las placas de TSA extendemos el inóculo con asa Digrafsky.

En cada una de las 2 placas habrá del orden de 10^6 ufc.

Se guardan las placas Control y se exponen las otras 4 placas bajo la luz UV durante un periodo de 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, se extraen las placas de la luz UV y se procede a añadir el medio TSA a las placas vacías, tanto la que ha sido sometida a luz UV como la placa Control que no ha sido sometida a dicha luz. Se remueve la placa con el medio TSA líquido para que se homogenice el inóculo durante varios segundos en todas direcciones. Esperamos a que se gelifique el medio. Una vez gelificado, se introducen todas las placas de *Staphylococcus aureus* en la estufa de $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los resultados del *Experimento 3* se leerán a las 72 horas.

Resultados

A continuación se muestran los resultados obtenidos por Experimento.

Resultados Experimento 1

A continuación se muestra una tabla con los resultados del *Experimento 1* (en ufc) obtenidos a las 24 y 48 horas.

Placas	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Placa vacía Control	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
Placa vacía	2	2	150	150
Placa TSA Control	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
Placa TSA	2	2	1	1

Como se observa en la tabla anterior, la luminaria LED UV tiene efecto germicida. No existe diferencia en el crecimiento bacteriano entre las 24 y las 48 horas posteriores a la aplicación de luz LED UV. En los controles se observa la viabilidad del cultivo y en las placas “vacía” y “TSA” se observa reducción logarítmica.

Cálculos reducción logarítmica

- Placa vacía 10^{-3} *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 4

$$\ln(10^4) - \ln(2 \times 10^0) = 3.7 \approx 4$$

- Placa TSA 10^{-3} *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 4

$$\ln(10^4) - \ln(2 \times 10^0) = 3.7 \approx 4$$

- Placa vacía 10^{-3} *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 2

$$\ln(10^4) - \ln(1.5 \times 10^2) = 1.8 \approx 2$$

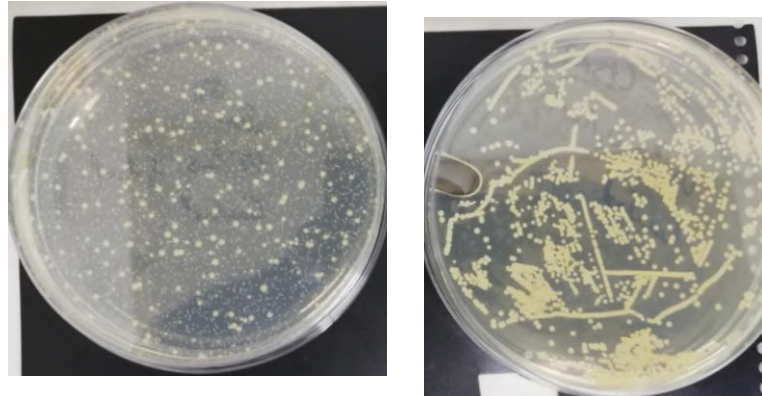
- Placa TSA 10^{-3} *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 4

$$\ln(10^4) - \ln(1 \times 10^0) = 4$$

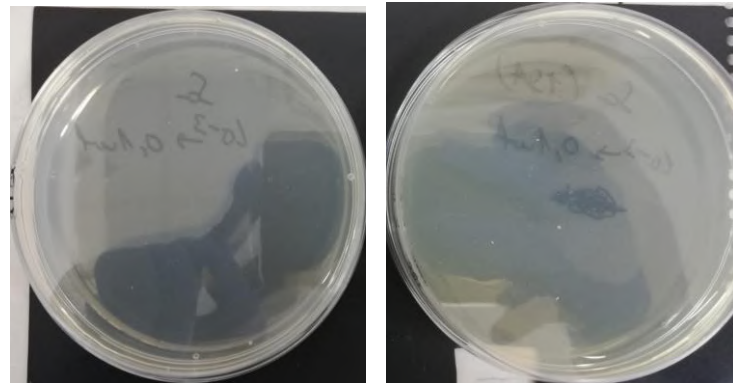
El hecho de que la placa vacía de *Escherichia coli* presente una menor reducción logarítmica pone de manifiesto la capacidad que presenta el agua de disipar la luz UV. En estas placas, los microorganismos no se encuentran extendidos sobre la superficie, sino que se encuentran en una única gota de agua que tras la aplicación de luz UV se diluirá en el medio

TSA. En función de la ubicación del microorganismo en dicha gota, recibirá una mayor o menor dosis de luz UV. A pesar de ello, este caso es el menos relevante, pues la finalidad de la luminaria de GEALÉD SL es desinfectar superficies (donde se ha obtenido una reducción logarítmica de 4).

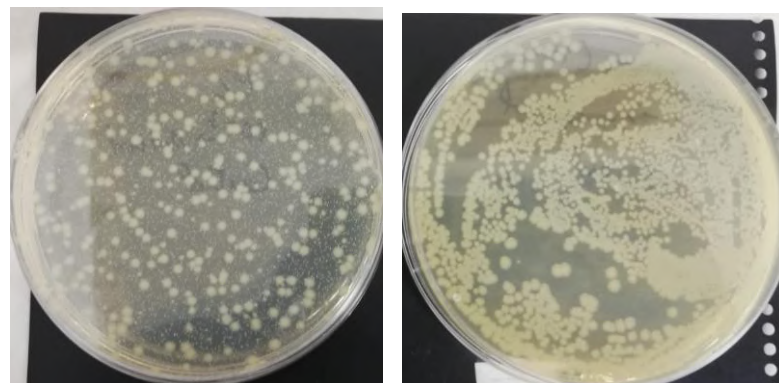
A continuación se presentan las imágenes de las placas a las 24 y 48 horas.



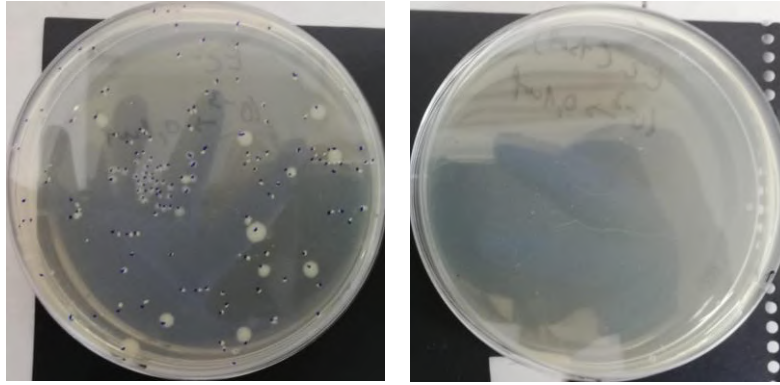
Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h



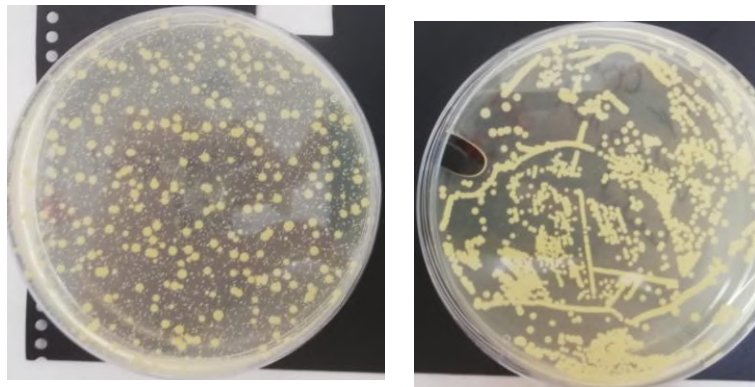
Izq: Placa vacía 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h



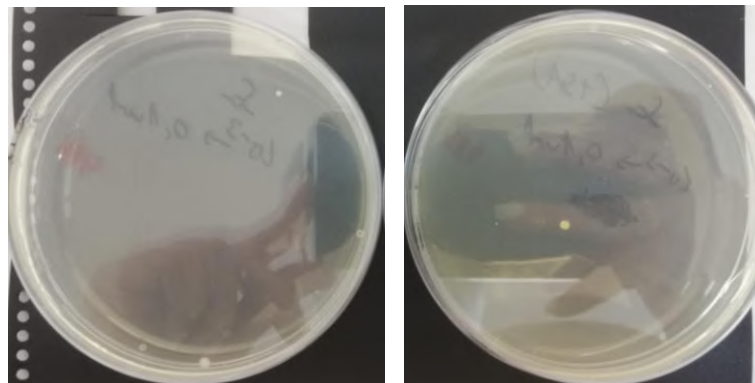
Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Escherichia coli* 24h



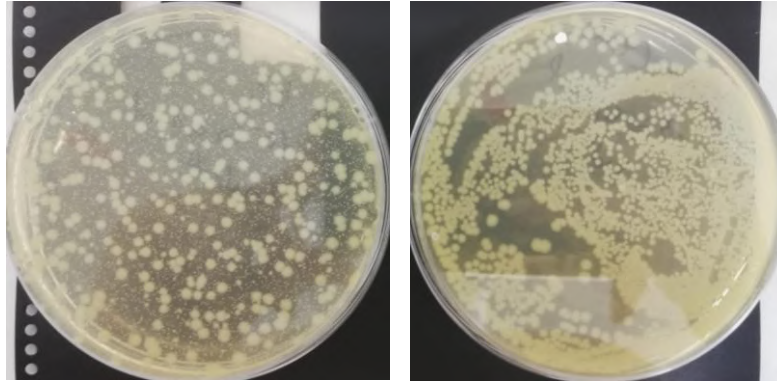
Izq: Placa vacía 10^{-3} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Escherichia coli* 24h



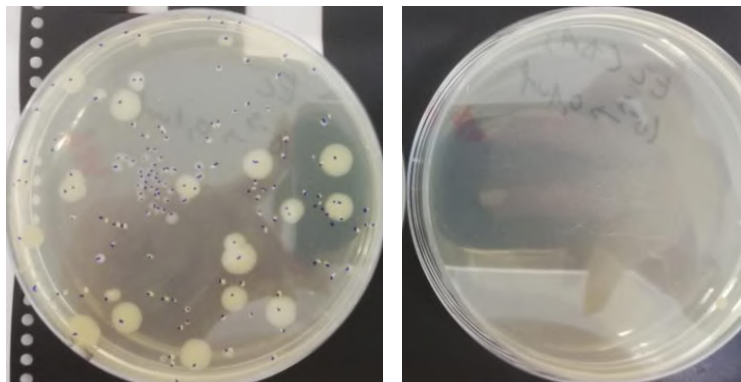
Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 48h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 48h



Izq: Placa vacía 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 48h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 48h



Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Escherichia coli* 48h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Escherichia coli* 48h



Izq: Placa vacía 10^{-3} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Escherichia coli* 24h

Resultados Experimento 2

A continuación se muestra una tabla con los resultados del *Experimento 2* (en ufc) obtenidos a las 24 horas.

Placas	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
	24 horas	24 horas
Placa vacía Control	Incontable	Incontable
Placa vacía	0	190
Placa TSA Control	Incontable	Incontable
Placa TSA	1	1

Del mismo modo que en el *Experimento 1*, como se observa en la tabla anterior, la luminaria LED UV tiene efecto germicida. En los controles se observa la viabilidad del cultivo y en las placas “vacía” y “TSA” se observa reducción logarítmica.

Cálculos reducción logarítmica

- Placa vacía 10^{-3} *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 4

$$\ln(10^4) - \ln(0) = 4$$

- Placa TSA 10^{-3} *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 4

$$\ln(10^4) - \ln(1 \times 10^0) = 4$$

- Placa vacía 10^{-3} *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 2

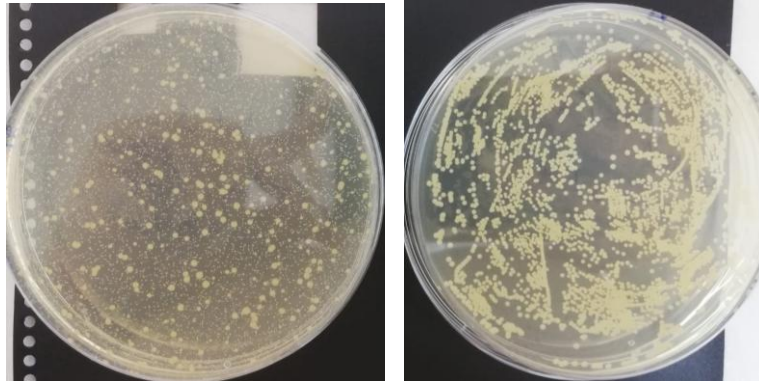
$$\ln(10^4) - \ln(1.9 \times 10^2) = 1.7 \approx 2$$

- Placa TSA 10^{-3} *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 4

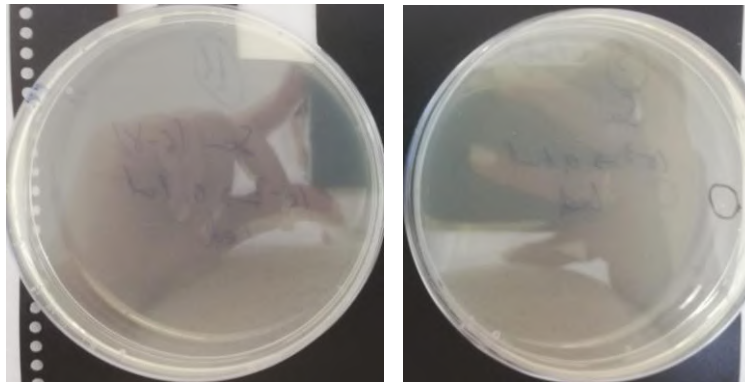
$$\ln(10^4) - \ln(1 \times 10^0) = 4$$

En este experimento se vuelve a poner de manifiesto la capacidad que presenta el agua de disipar la luz UV. Del mismo modo que anteriormente, este caso es el menos relevante, pues la finalidad de la luminaria de GEALD SL es desinfectar superficies (donde se ha obtenido una reducción logarítmica de 4).

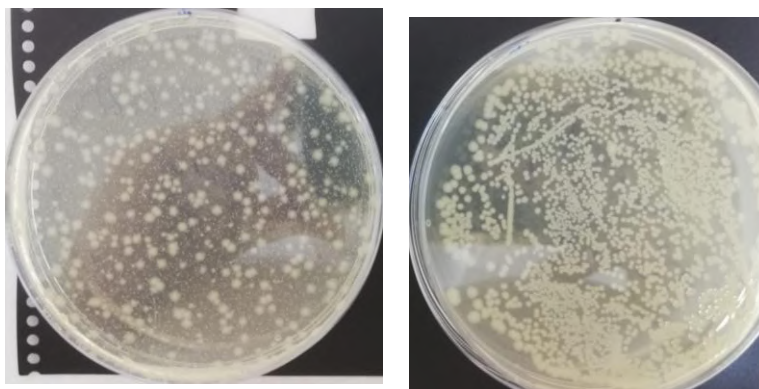
A continuación se presentan las imágenes de las placas a las 24 horas.



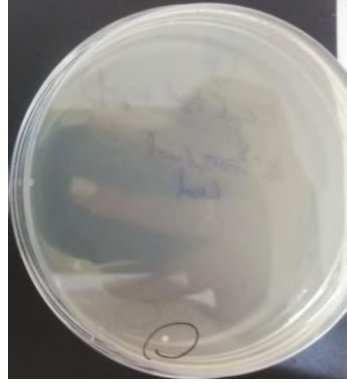
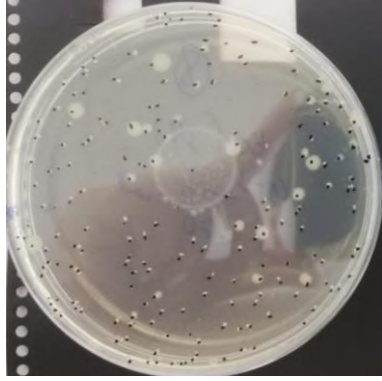
Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h



Izq: Placa vacía 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h



Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Escherichia coli* 24h



Izq: Placa vacía 10^{-3} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Escherichia coli* 24h

Resultados Experimento 3

A continuación se muestra una tabla con los resultados del *Experimento 3* (en ufc) obtenidos a las 24 horas.

Placas	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
	24 horas	24 horas
Placa vacía Control 10 ⁻³	Incontable	Incontable
Placa vacía 10 ⁻³	5	6
Placa vacía 10 ⁻¹	82	200
Placa TSA Control 10 ⁻³	Incontable	Incontable
Placa TSA 10 ⁻³	18	150
Placa TSA 10 ⁻¹	11	200

Del mismo modo que en el *Experimento 1* y *2*, como se observa en la tabla anterior, la luminaria LED UV tiene efecto germicida. En los controles se observa la viabilidad del cultivo y en las placas “vacía” y “TSA” se observa reducción logarítmica.

Cálculos reducción logarítmica

- Placa vacía 10⁻³ *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 3

$$\ln(10^4) - \ln(5 \times 10^0) = 3.3$$

- Placa vacía 10⁻¹ *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 4

$$\ln(10^6) - \ln(8.2 \times 10^1) = 4.1 \approx 4$$

- Placa TSA 10⁻³ *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 3

$$\ln(10^4) - \ln(1.8 \times 10^1) = 2.7 \approx 3$$

- Placa TSA 10⁻¹ *Staphylococcus aureus* → Reducción logarítmica de 5

$$\ln(10^6) - \ln(1.1 \times 10^1) = 4.9 \approx 5$$

- Placa vacía 10⁻³ *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 3

$$\ln(10^4) - \ln(6 \times 10^0) = 3.2 \approx 3$$

- Placa vacía 10⁻¹ *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 4

$$\ln(10^6) - \ln(2 \times 10^2) = 3.7 \approx 4$$

- Placa TSA 10^{-3} *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 4

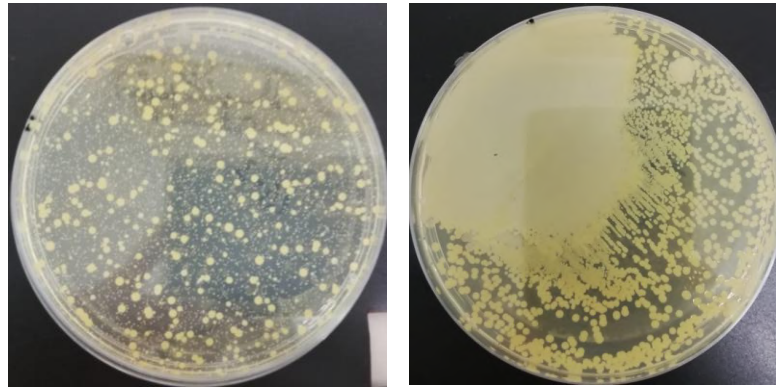
$$\ln(10^4) - \ln(1.5 \times 10^2) = 4$$

- Placa TSA 10^{-1} *Escherichia coli* → Reducción logarítmica de 4

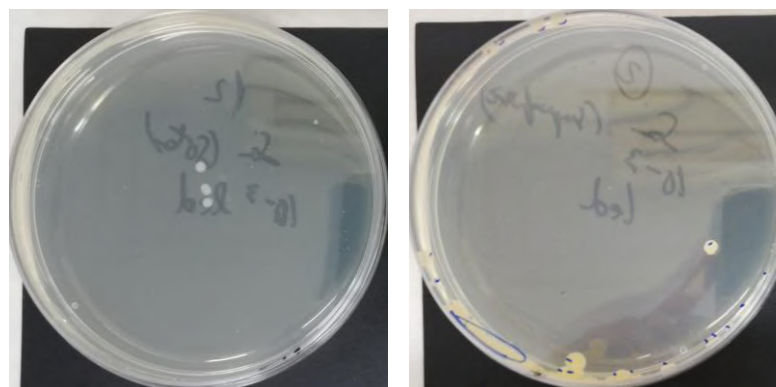
$$\ln(10^6) - \ln(2 \times 10^2) = 1.8 \approx 2$$

En este experimento se ha trabajado con dos concentraciones diferentes para comprobar la reducción logarítmica. Efectivamente, se vuelve a comprobar la capacidad que presenta el agua de disipar la luz UV. Del mismo modo que anteriormente, se pone de manifiesto en todos los casos la reducción logarítmica, siendo la mayor reducción en el caso de las placas de TSA, donde reside el interés de GEALD SL, pues como se ha mencionado anteriormente, su finalidad es desinfectar superficies.

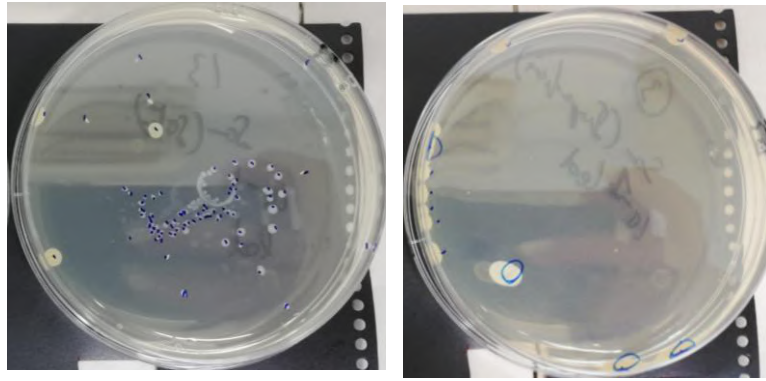
A continuación se presentan las imágenes de las placas a las 24 horas.



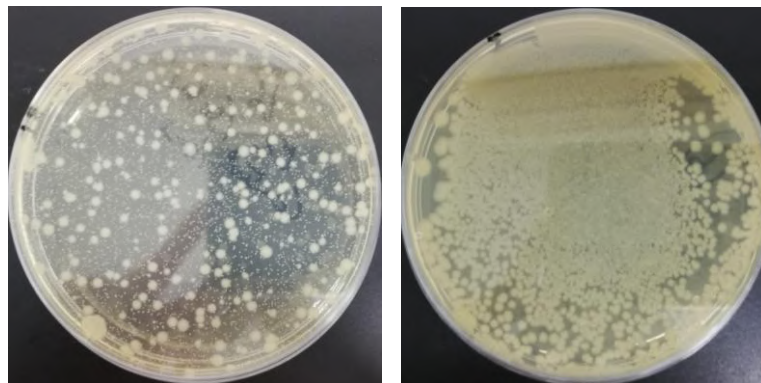
Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h



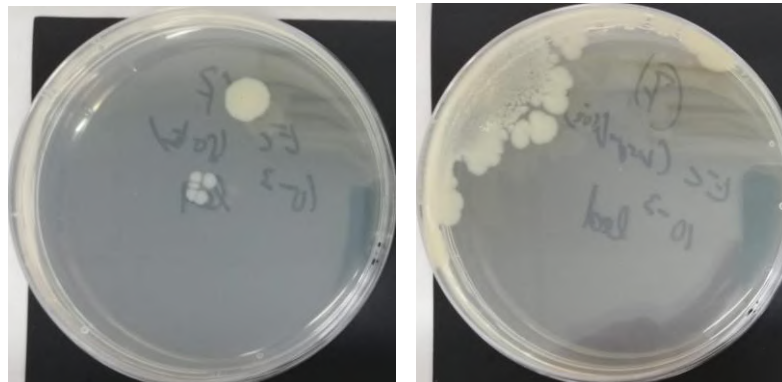
Izq: Placa vacía 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h



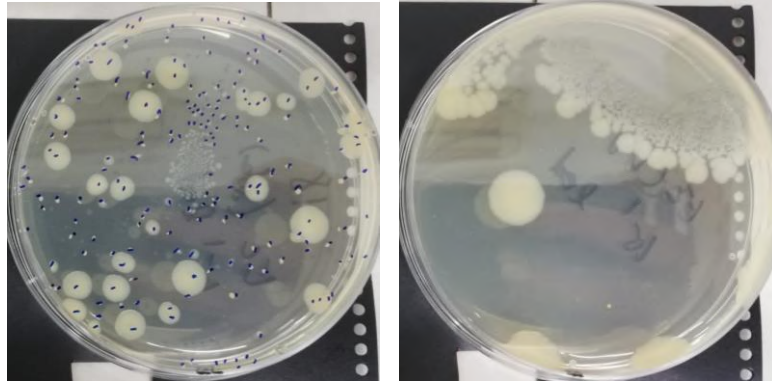
Izq: Placa vacía 10^{-1} *Staphylococcus aureus* 24h / Der: Placa TSA 10^{-1} *Staphylococcus aureus* 24h



Izq: Placa vacía Control 10^{-3} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA Control 10^{-3} *Escherichia coli* 24h



Izq: Placa vacía 10^{-3} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA 10^{-3} *Escherichia coli* 24h



Izq: Placa vacía 10^{-1} *Escherichia coli* 24h / Der: Placa TSA 10^{-1} *Escherichia coli* 24h

Nota: En las imágenes “Placa TSA Control 10^{-3} *Staphylococcus aureus* 24h” y “TSA Control 10^{-3} *Escherichia coli*” se observa que existe un crecimiento en masa, debido a la humedad que presentaban las placas de TSA en el momento de la inoculación de los microorganismos.

En todas las placas de TSA del *Experimento 3* (imágenes de la derecha) se observa que existe crecimiento bacteriano por los bordes de la placa. Esto se debe a la ubicación de las placas bajo la luz LED UV, donde los bordes de plástico de la placa forman sombras (el plástico es opaco a la luz UV). Dichas zonas de sombra propician el crecimiento bacteriano, tal y como se observa en las imágenes.

Conclusiones

Tras los experimentos realizados y detallados a lo largo de este informe y en base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la luminaria **LED UV OVNI100UVC**, propiedad de **GEALED, S.L.**, es capaz de alcanzar una reducción logarítmica de 4 en superficies, objetivo fundamental de la misma, y por tanto, **presenta capacidad germicida**.

Perspectivas futuras

Desde GEALED, S.L. se trabaja en una mejora de la luminaria, pues existe la posibilidad de conseguir una mayor reducción logarítmica aumentando la potencia y reduciendo la longitud de onda de la misma.