



“Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando el equipo UV 2000”

ELABORADO POR:

BIOTECNOS S.A.

- MAYO 2020 -

	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		2
		Fecha de emisión: 04 - 05 - 2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

BIOTECNOS S.A.

Avenida Brasil
N°2104, tercer piso
Valparaíso, Chile

El presente documento es propiedad de Biotecnos S.A. Este documento solamente puede ser usado para los propósitos para el cual fue preparado y que se relacionan con la elaboración de una Propuesta Técnica destinada a responder a los requerimientos de los Términos de Referencia. La información de este documento se encuentra protegida, además, por la Ley N° 17.336 sobre propiedad intelectual, publicada en el Diario Oficial N° 27.761, del 2 de octubre de 1970.

 biotecnos INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		3
		Fecha de emisión: 04-05-2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

“Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando el equipo UV 2000”

Solicitado por:

NEXT-NODE

Elaborado por:

Biotecnos S.A.

Avenida Brasil N°2104, Valparaíso

Fonos: 56 32 2372972

 biotecnos INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		4
		Fecha de emisión: 04-05-2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

Profesionales Responsables

Dr(c). Carlos Calderón A.
Ingeniería y Biotecnología

Mg. Oscar Evrard A.
Ingeniería y Biotecnología

	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		5
		Fecha de emisión: 04-05-2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

CONTENIDO

Tabla de contenido

“Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando el equipo UV 2000”	1
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	7
3. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO	8
4. RESULTADOS.....	9
5. CONCLUSIONES.....	10
6. ANEXO	11

	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		6
		Fecha de emisión: 04-05-2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

1. INTRODUCCIÓN

Una alternativa para verificar la efectividad y la eficiencia con que un equipo de luz ultravioleta es capaz de esterilizar y generar un efecto en la tasa de crecimiento de un grupo de microorganismos determinados, tales como las bacterias y los virus, es mediante ensayos de crecimiento bacteriano. Estos ensayos se basan en un tiempo de exposición a luz ultravioleta, de agentes bacterianos propios del ser humano y del medio ambiente. Proporcionando un tiempo determinado, es simple determinar la efectividad de un equipo utilizando diferentes muestras de materiales que puedan ser expuestos a la luz UV.

Con el fin de determinar la efectividad de esterilización mediante luz UV utilizando el equipo UV 2.000 (Next-Node), se realizará un ensayo de crecimiento bacteriano utilizando un medio de cultivo sólido en placas Petri, llamado LB o Caldo de Lisogenia. Este medio corresponde a un medio nutricionalmente rico que se utiliza principalmente para el cultivo de bacterias. Las muestras que serán sometidas a diferentes intervalos de exposición a luz UV, serán de materiales comunes tales como vidrio, cartón, lata, algodón y plástico.

Los coronavirus son miembros del grupo Coronaviridae y contienen un genoma de ARN de cadena positiva y sentido positivo rodeado de una envoltura helicoidal en forma de corona (Ryan, 1994). Se han publicado aproximadamente 100 secuencias del genoma del SARS-CoV-2 y esto sugiere que hay dos tipos, Tipo I y Tipo II, de los cuales este último provenía del mercado Huanan en China, mientras que la cepa Tipo I provenía de una ubicación desconocida (Zhang 2020). El genoma consta de 29,751 pares de bases (NC_045512.2) y el genoma es aproximadamente un 80% homólogo con los virus del SARS (NCBI 2020, Fisher 2020). Los coronavirus tienen un rango de tamaño de 60-140 nm, con un tamaño medio de 0,10 micras (Zhu 2020).

Según los estudios realizados en Coronavirus bajo exposición a la luz ultravioleta, con las especies específicas indicadas como más idénticas genéticamente al COVID-19, el valor D90 de 2 a 60 minutos indica la dosis ultravioleta para una inactivación del 90% del virus. El rango de valores D90 para los coronavirus es de 7-241 J / m², cuya media es 67 J / m², debe representar adecuadamente la susceptibilidad ultravioleta del virus SARS-CoV-2 (COVID-19), según el estudio realizado por Kirawa el año 2004.

	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		7
		Fecha de emisión: 04-05-2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del experimento, primero se inoculó un medio líquido LB (10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona en 1 L de agua) con un mix de bacterias crecidas toda la noche a 37 °C, las que se usaron como control positivo. Este cultivo bacteriano posteriormente se separó en 7 tubos de 1,5 mL para su posterior uso. A su vez, se diseccionó cada uno de los materiales en piezas de 4 cm², con el fin de realizar las pruebas individuales de exposición a luz ultravioleta durante períodos de 15, 30, 45, 60, 75 y 120 segundos.

Para observar si posteriormente a la exposición a luz UV de las muestras y los controles positivos existe crecimiento bacteriano, se preparó placas de medio de crecimiento LB sólido (15 g de agar, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona en 1 L de agua).

De cada una de las muestras, luego de someterse al tratamiento de esterilización por el tiempo determinado, se realizó un frotis con una torula estéril (121 °C por 15 minutos, a 1,2 bares de presión), y se sembró en estas placas de medio de cultivo.

Se dejaron crecer durante 48 horas a 37 °C, monitoreando el crecimiento bacteriano cada 8 horas y realizando recuento de colonias bacterianas, con el fin de establecer el resultado de efectividad de tratamiento de esterilización con luz UVC.

	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		8
		Fecha de emisión: 04-05-2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

3. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

- Preparación y esterilización de torulas y medios de cultivo, 121 °C por 15 minutos a 1,2 bares de presión.
- Preparación de medio de cultivo líquido con inoculación de mix de bacterias, crecimiento a 37 °C toda la noche para utilización como control positivo.
- Plaqueo del medio sólido de crecimiento en placas Petri, solidificación del medio y guardado a 4 °C para posterior uso.
- Limpieza control del equipo, por 20 minutos con exposición a luz UVC.
- Disección de muestras de los diferentes materiales a probar, de tamaños de 4 cm² sin esterilizar.
- Siembra en placas de medio sólido de tiempo 0 como control positivo de la contaminación presente en las muestras, antes de someterlas a tratamiento UVC.
- Siembra en placas de medio sólido de controles negativos (medio sólido sólo) y control del equipo previamente esterilizado (control equipo).
- Exposición de las muestras disectadas anteriormente, a tiempos con intervalos de 15 segundos, finalizando en 120 segundos.
- Raspado con torula estéril, de superficies de muestras expuestas a UVC y posterior siembra en medio de cultivo sólido de cada uno de los tiempos de exposición.
- Crecimiento bacteriano a 37 °C durante toda la noche.
- Monitoreo de crecimiento bacteriano cada 8 horas posterior al crecimiento overnight, hasta un período de 48 horas post inoculación.
- Recuento de las colonias bacterianas en las diferentes placas de cultivo, al finalizar el tiempo de crecimiento.

4. RESULTADOS

A partir de los resultados de crecimiento bacteriano, se pudo establecer que el tiempo mínimo necesario para que exista una inhibición del crecimiento bacteriano, de al menos 120 segundos, según la Tabla 1, que describe el comportamiento del crecimiento bacteriano de acuerdo al recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

Tabla 1. Inhibición de crecimiento bacteriano en materiales sometidos a radiación UVC durante diversos períodos de exposición a esterilización.

	Tiempo de exposición a luz UVC						
	Exposición (0 seg)	Exposición (15 seg)	Exposición (30 seg)	Exposición (45 seg)	Exposición (60 seg)	Exposición (75 seg)	Exposición (120 seg)
Vidrio	100% crecimiento	5% crecimiento	5% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento
Plástico	100% crecimiento	75% crecimiento	60% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento
Lata	100% crecimiento	90% crecimiento	75% crecimiento	25% crecimiento	10% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento
Algodón	100% crecimiento	100% crecimiento	100% crecimiento	85% crecimiento	70% crecimiento	15% crecimiento	0% crecimiento
Cartón	100% crecimiento	25 % crecimiento	1.8 % crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento
Control positivo	100% crecimiento	100% crecimiento	100% crecimiento	75% crecimiento	100% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento
Control negativo	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento
Control Equipo	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento	0% crecimiento

	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO	EDICIÓN / REVISIÓN 1/1		10
		Fecha de emisión: 04-05-2020	Elaborado por: Biotecnos S.A.	

5. CONCLUSIONES

- La luz UVC es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano luego de 120 segundos de exposición en 5 diferentes materiales de uso común.
- La utilización de un control positivo nos permite corroborar el efecto inhibitorio de la luz UVC, independiente del recuento de bacterias y cantidad inicial de las mismas.
- Es posible establecer que existe un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano en diferentes tiempos, dependiendo del material a tratar, principalmente por la capacidad de absorción de la luz UVC de los materiales.
- El equipo UV 2000 de Next-Node proporciona esterilización tanto por luz UVC como por producción de Ozono, lo que garantiza la mortalidad del 100% de las bacterias presentes en la muestra, y de un 90% de los virus presentes, según bibliografía.

6. ANEXO

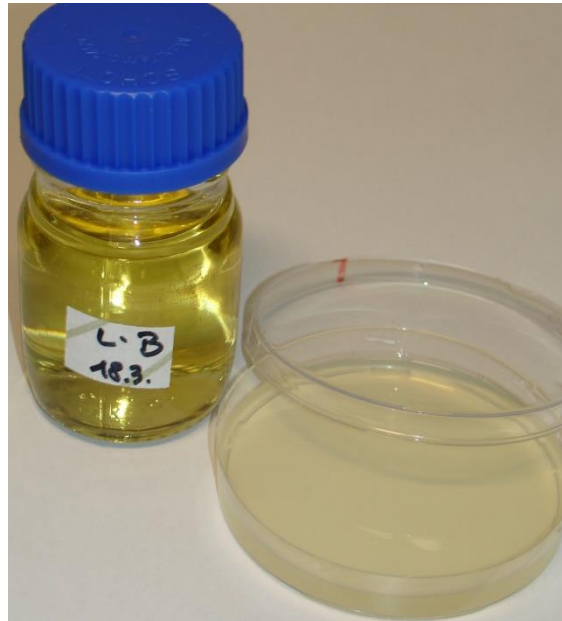


Figura 1. Medios de cultivo sólido y líquido estéril, sin crecimiento bacteriano.

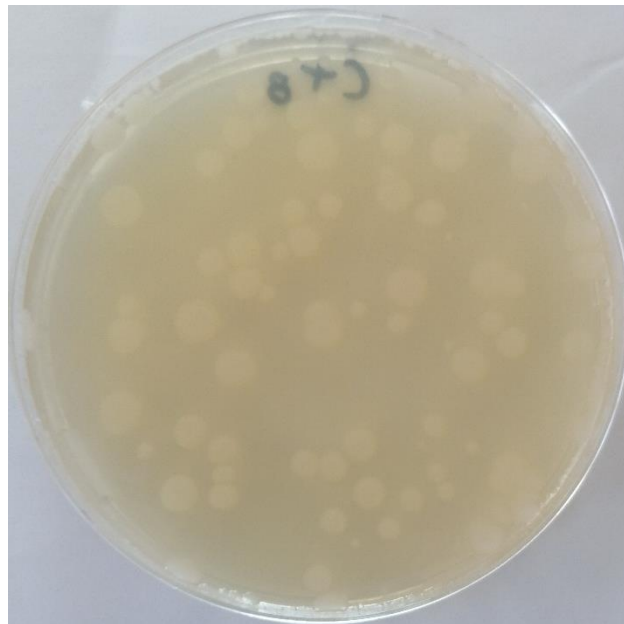


Figura 2. Medios de cultivo sólido con crecimiento bacteriano, control positivo de mix bacteriano .

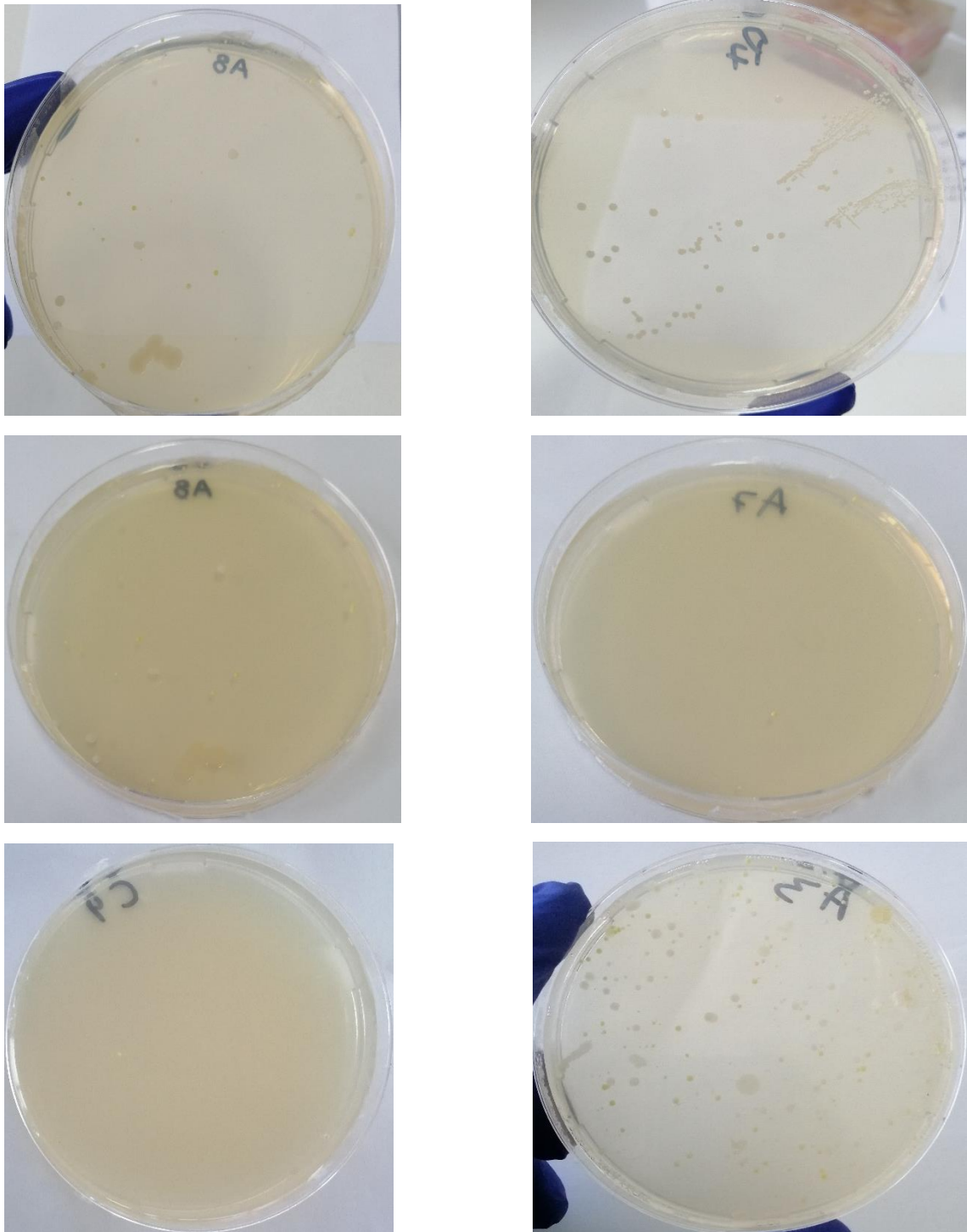


Figura 2. Ejemplo de medios de cultivo sólido con crecimiento bacteriano. A: algodón, P: plástico, C: cartón. Los números corresponden a tiempos de exposición diferentes a luz UVC.