

## 6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1. Reducción de la población microbiana con luz UVC

La concentración inicial de las semillas inoculadas obtenidas por el conteo en placa, siguiendo el método de la cuenta estándar, fue de  $10^4$  -  $10^5$  UFC/g. La media obtenida por el recuento en placa para cada tratamiento de exposición a la luz UVC a los diferentes tiempos, y con la aplicación o no de la agitación, se muestran en la Tabla VII.

Tal como menciona Castro-Rosas (2000), aún cuando las concentraciones de patógenos usadas en el estudio, pudieran no ocurrir en condiciones reales, el riesgo que pueden causar debe ser enfatizado.

**Tabla I.** Cuenta estándar de las siembras de los tratamientos de UVC a diferentes tiempos en agar Nutritivo y agar VRB, mesófilos aerobios y coliformes, respectivamente.

| Tiempo (min) | Mesófilos aerobios |             | Coliformes  |             |
|--------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|
|              | UFC/g              |             | UFC/g       |             |
|              | c/agitación        | s/agitación | c/agitación | s/agitación |
| 2            | 3.7E+05            | 4.7E+05     | 2.5E+05     | 2.2E+05     |
| 4            | 1.8E+05            | 3.6E+05     | 1.2E+05     | 1.9E+05     |
| 6            | 1.0E+05            | 3.6E+05     | 1.1E+05     | 1.3E+05     |
| 8            | 1.4E+05            | 3.3E+05     | 7.4E+04     | 1.3E+05     |
| 16           | 5.2E+04            | 2.2E+05     | 2.4E+04     | 7.4E+04     |

En la tabla IV, las UFC/g de mesófilos aerobios son el resultado del conteo de las diluciones sembradas en Agar Nutritivo, mientras que las UFC/g de coniformes, corresponden a las sembradas en Agar VRB.

Cabe mencionar que para llevar a cabo la cuenta estándar, únicamente se tomaron en cuenta las cajas que contenían entre 25-250 UFC (NOM-089-SSA1-1994).

Debido a que cada siembra se hizo, por lo menos, hasta la cuarta dilución, cumplir esa condición no fue ningún problema.

Para valorar el efecto desinfectante de los tratamientos con luz UVC se calcularon las reducciones logarítmicas correspondientes a las condiciones de cada tratamiento. Donde la reducción logarítmica se expresa de la siguiente manera:

$$\log_{10} \frac{N_0}{N}$$

$N_0$  = UFC/g inicial (control)

$N$  = UFC/g en cada tratamiento

**Tabla II.** Reducciones logarítmicas de los tratamientos con luz UVC

| Tiempo (min) | Coliformes   |               | Mesófilos aerobios                                       |               |
|--------------|--|---------------|--|---------------|
|              | Reducción microbiana ( $\log_{10}$ UFC/g) <sup>a,b</sup> |               | Reducción microbiana ( $\log_{10}$ UFC/g) <sup>a,b</sup> |               |
|              | c/agitación  | s/agitación   | c/agitación  | s/agitación   |
| 2            | A 0.86 . 0.56  | B 0.77 . 0.58 | C 0.93 . 0.54  | D 0.80 . 0.45 |
| 4            | A 1.18 . 0.29  | B 1.04 . 0.46 | C 1.20 . 0.54  | D 0.86 . 0.24 |
| 6            | A 1.22 . 0.42  | B 0.87 . 0.25 | C 1.39 . 0.39  | D 0.88 . 0.41 |
| 8            | A 1.36 . 0.25  | B 0.88 . 0.36 | C 1.24 . 0.47  | D 0.74 . 0.34 |
| 16           | A 1.62 . 0.30  | B 1.13 . 0.45 | C 1.69 . 0.12  | D 1.19 . 0.12 |

<sup>a</sup> En el mismo renglón, los valores que no son precedidos por la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05)

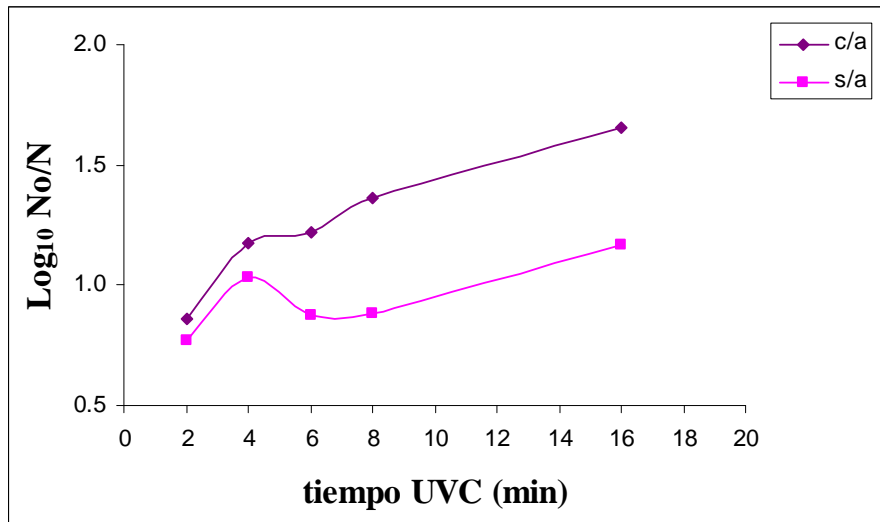
<sup>b</sup> En la misma columna, los valores que no son precedidos por la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05)

□ Desviación Estándar

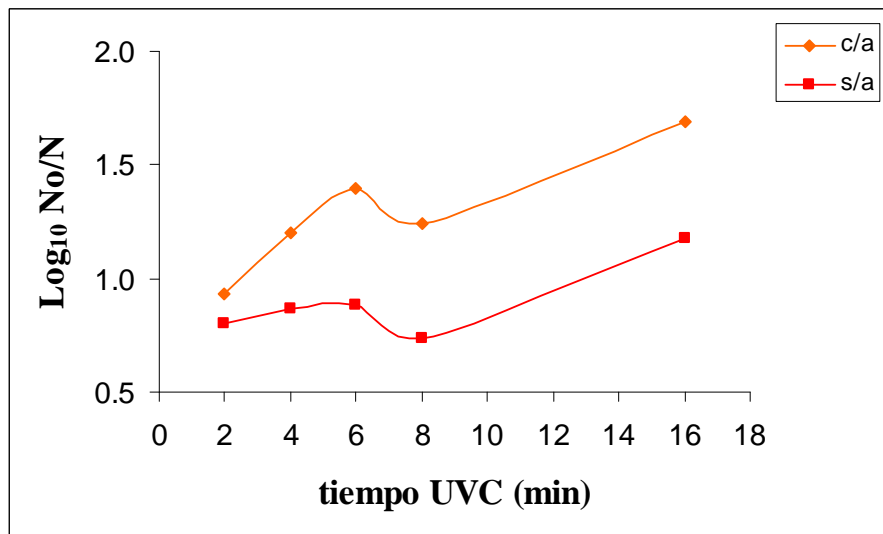
En la tabla VIII se muestran las medias de las reducciones logarítmicas con sus desviaciones estándar, correspondientes a cada tratamiento mencionado en la tabla VII.

Asimismo, en las Figuras 12 y 13, se observan las gráficas de las reducciones logarítmicas obtenidas en ambos agares, es decir, tanto para coniformes totales como

para mesófilos aerobios, a los diferentes tiempos de exposición a la luz UVC, y con o sin agitación intermedia.



**Figura 1.** Reducción logarítmica de la población microbiana sembrada en Agar VRB, para los tratamientos de exposición a diferentes tiempos con y sin agitación intermedia.



**Figura 2.** Reducción logarítmica de la población microbiana sembrada en Agar Nutritivo, para los tratamientos de exposición a diferentes tiempos con y sin agitación intermedia.

La reducción mayor obtenida tanto en los mesófilos aerobios como en los coliformes totales, corresponde al tratamiento de 16min de exposición a la luz UVC, con agitación a los 8min transcurridos. En los coliformes, en este caso *Escherichia coli*, ya que durante todo el experimento siempre se aseguró de que el inóculo fuera puro, la reducción en la población microbiana fue de 1.62 log<sub>10</sub>, mientras que para los mesófilos

aerobios fue de  $1.69 \log_{10}$ . Sin embargo, el análisis estadístico de varianza realizado (ANOVA) demostró que la diferencia de inactivación a los diferentes tiempos de exposición a la luz UVC no es significativa ( $\alpha=0.05$ ). (Ver Apéndices B y C).

## 6.2. Efecto de la luz UVC en el porcentaje de germinación

En la tabla VI se muestra el promedio los porcentajes de germinación obtenidos para las semillas de alfalfa inoculadas, sometidas a los tratamientos con luz UVC a los diferentes tiempos. Se incluye también el control, es decir, el porcentaje de germinación de semillas no inoculadas, y por lo tanto, sin desinfectar.

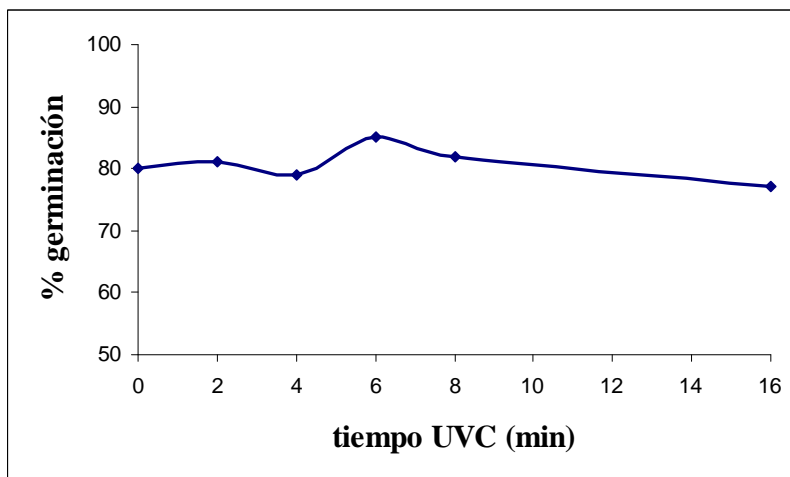
**Tabla III.** Porcentajes de germinación de las semillas de alfalfa

| Tiempo de exposición a la luz UVC (min) | Porcentaje de germinación promedio (%) |
|---|--|
| 0                                       | 80                                     |
| 2                                       | 81                                     |
| 4                                       | 79                                     |
| 6                                       | 84                                     |
| 8                                       | 82                                     |
| 16                                      | 77                                     |

La siguiente figura muestra la variación en el porcentaje de germinación a los diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta de onda corta. Tal como se observa, el porcentaje de germinación no se vio afectado por la luz UVC, aún en el lapso más largo (16min).

Los resultados expresan que no fue posible erradicar al *E.coli* de las semillas de alfalfa inoculadas, sin embargo, se logró una reducción de aproximadamente 95% de la

población microbiana, sin afectar la viabilidad de las semillas, es decir, su porcentaje de germinación.



**Figura 3.** Variación en los porcentajes de germinación de las semillas de alfalfa tratadas con luz UVC.

### **6.3. Reducción de la población microbiana por métodos combinados (luz UVC más soluciones de hipoclorito de calcio)**

La concentración de las soluciones de hipoclorito de calcio que se utilizaron se decidió después de hacer las siembras en profundidad y la cuenta estándar correspondiente a cada una de las concentraciones mencionadas en el plan de investigación en el punto 4.2.

La reducción logarítmica obtenida con 100, 200 y 300ppm fue menor a  $0.5 \log_{10}$  UFC/g, mientras que para las concentraciones de 2500, 5000 y 10000, la reducción fue tan alta que fue imposible contar las colonias en las cajas sembradas ( $<10$  UFC/g), aún en la primera dilución. Dado que se necesitaban concentraciones que redujeran la población de manera similar al resultado obtenido con la luz UVC, se optó por emplear concentraciones de 500 y 1000ppm de cloro libre en las soluciones.

Los experimentos se hicieron por triplicado, dando un promedio en las reducciones logarítmicas para 500 y 1000ppm, de 0.82 ( $\log_{10}$  UFC/g) y 1.26 ( $\log_{10}$  UFC/g), respectivamente.

El tiempo de exposición a la luz UVC fue de 4min, ya que entre 2, 4, 6, 8 y 16min la diferencia no fue significativa, se decidió elegir un tiempo intermedio. Cabe mencionar que los tratamientos se llevaron a cabo sin agitación.

Los tratamientos por métodos combinados se llevaron a cabo por triplicado, reportándose el promedio de las reducciones logarítmicas con sus desviaciones estándar en la tabla X.

**Tabla IV.** Tratamientos por métodos combinados (UVC más hipoclorito de calcio)

| Concentración | Reducción logarítmica ( $\log_{10}$ UFC/g) |                |              |
|---------------|--|----------------|--------------|
|               | Solución + UVC                             | UVC + Solución | UVC/Solución |
| 500ppm        | 1.36 ± 0.10                                | 2.35 ± 0.18    | 0.92 ± 0.12  |
| 1000ppm       | 1.56 ± 0.12                                | 3.49 ± 0.31    | 2.89 ± 0.20  |

UVC + solución = exposición a la luz UVC seguido del remojo en la solución.

Solución + UVC = remojo en la solución seguido de exposición a la luz UVC.

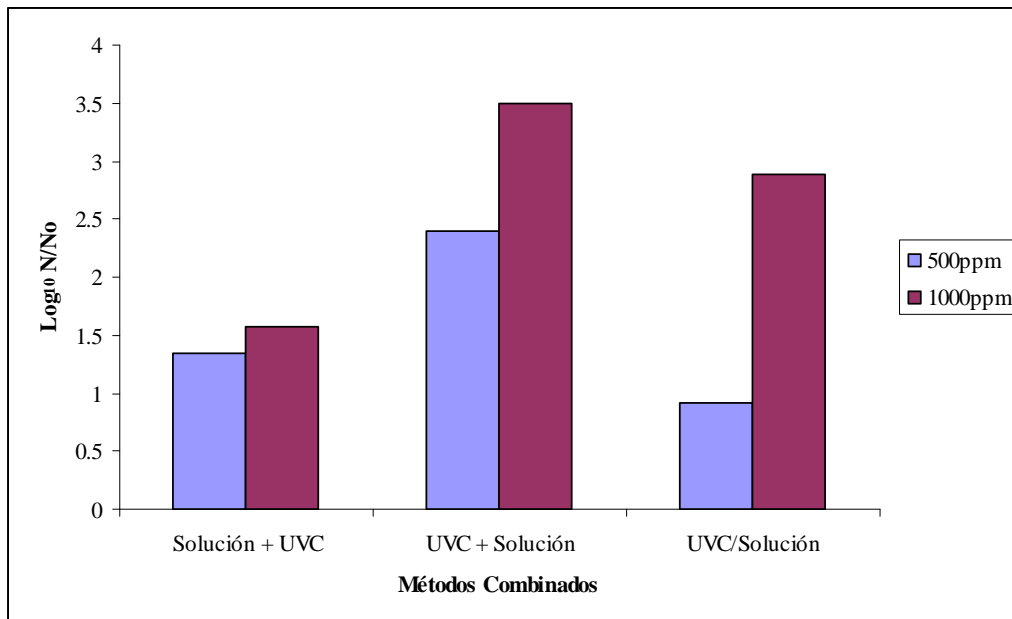
UVC/solución= Remojo y exposición simultánea a la luz UVC, seguidos de remojo en la solución el tiempo restante.

Los tiempos de exposición y de remojos en las soluciones de hipoclorito de calcio, así como la metodología empleada para llevar a cabo los tratamientos y las siembras, se observan detalladamente en el punto 5.7.

Se varió el orden en los tratamientos para valorar el efecto en la reducción microbiana. Con ambas concentraciones la reducción mayor se logró al aplicar primero

la luz UVC seguida del remojo en la solución de hipoclorito de calcio, siendo 2.40 ( $\log_{10}$  UFC/g) para 500ppm y 3.49 ( $\log_{10}$  UFC/g) para 1000ppm.

En la figura 15 se observan las reducciones obtenidas por métodos combinados para ambas concentraciones.



**Figura 4.** Reducción logarítmica por métodos combinados

Con la aplicación de luz UVC más el remojo en solución de hipoclorito de calcio de 1000ppm no se logró la desinfección total de las semillas, sin embargo, la reducción fue de casi 4 ciclos logarítmicos (~99.99%).

Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Beuchat en 1997, en los que obtuvo reducciones de 3 ciclos logarítmicos con concentraciones de 1800 y 2000ppm de cloro libre en soluciones de hipoclorito de calcio. (NACMCF, 1999).

A pesar de que no se evaluaron los porcentajes de germinación para métodos combinados de luz UVC más hipoclorito de calcio, ya que en la sección anterior, el porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa no se afecta con la exposición a la luz UVC, y que existen reportes como el de Beuchat en 1997, donde el porcentaje de germinación no se ve disminuido con concentraciones de 1800ppm de hipoclorito de calcio; y que la FDA recomienda el uso de hipoclorito de calcio con concentraciones de 20000ppm, asegurando no afectar el porcentaje de germinación, las probabilidades de mantener la viabilidad de la semilla de alfalfa desinfectada por 4min de UVC + hipoclorito de calcio (1000ppm) son altas.