

Actividad antimicrobiana de los subproductos generados por la reacción del ozono con los microorganismos

Irán Fernández-Torres, Mayra Bataller-Venta, Carlos Hernández-Castro, Elaine Sánchez-Urrutia y Yamelis Morales-Chacón.

Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6414, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: iran.fernandez@cnic.edu.cu

Recibido: 1ro. de septiembre de 2009.

Aceptado: 18 de diciembre de 2009.

Palabras clave: ozono, peroxidación lipídica, subproductos de reacción, acciones oxidantes.
Key words: ozone, lipid peroxidation, reaction by-products, oxidant action.

RESUMEN. La capacidad germicida del ozono está ampliamente reconocida, la cual está dada por su elevado poder oxidante y su rápida velocidad de reacción con diferentes moléculas biológicas. Se conocen estudios acerca de la cinética de inactivación que sigue el ozono sobre los microorganismos. Sin embargo, aunque se sabe que el ozono genera compuestos (subproductos) al reaccionar con los microorganismos, no existen estudios sobre el posible efecto que presentan estos subproductos en el proceso de inactivación sobre aquellos microorganismos que aún permanecen viables en el medio. Luego, la información que se obtenga alrededor de este efecto puede ampliar el conocimiento sobre las dosis de ozono a aplicar en los procesos de desinfección de aguas y el mejor funcionamiento en las plantas de tratamiento. El presente trabajo evaluó los efectos oxidantes de los subproductos generados de la reacción del ozono con los microorganismos, sobre dos especies microbianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella enterica var. thyphimurium* ATCC 12048, en cuanto a viabilidad y su efecto sobre algunos componentes de la membrana plasmática. Se realizó un estudio cinético a bajas concentraciones de ozono y se determinó la actividad antimicrobiana de los subproductos de reacción. Además, se evaluó la variación de los niveles de peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana plasmática. Los resultados de las cinéticas de inactivación mostraron dos constantes cinéticas para ambos microorganismos. Esto está relacionado fundamentalmente con el agotamiento del ozono disuelto desde los primeros instantes y a la actividad antimicrobiana mostrada por los subproductos de reacción, al generar muerte celular aun cuando no se detecta ozono disuelto. El ozono afectó la permeabilidad de la membrana de los microorganismos y se observó un aumento en las concentraciones de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico debido a los procesos de peroxidación lipídica.

ABSTRACT. The ozone germicidal capacity is well documented in national and international papers; it is given by its high oxidant power and its rapid rate of reaction with different biological molecules. Many studies about the kinetics of inactivation of ozone on microorganisms have been reported. However, although it is known that ozone generates compounds (by-products) when reacts with microorganisms, there are not studies of the effect on inactivation process that these generated compounds present on those organisms that remain viable in the medium. The information obtained of this effect can spread knowledge about the ozone dose applied in water disinfection processes and improve functioning in treatment plants. The aim of this paper was to evaluate the oxidant effects of ozone on two microbial strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, y *Salmonella enterica var. thyphimurium* ATCC 12048, in relation to their viability and the ozone effect on some components of the plasmatic cell membrane. Kinetic studies of the ozone reaction with these microorganisms, at low ozone concentration, as well as the antimicrobial activity of by-products were carried out. The lipid peroxidation levels of unsaturated fatty acids present in the membrane were determined. The inactivation kinetic showed two kinetic constants for both microorganisms, this could be due to the rapid decomposition of ozone from the first instants. The reaction by-products showed antimicrobial activity and it could be the cause of the cellular death, even when ozone is not detected in the liquids. The ozone affected the membrane permeability and induces an increase in the levels of thio-barbituric acid-reactive substances due to the lipid peroxidation processes.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades germicidas del ozono permiten que pueda ser utilizado tanto en la desinfección de agua potable, aguas residuales, alimentos y locales.¹⁻⁶ Estudios recientes han evaluado la capacidad de desinfección del ozono a través de las cinéticas de inactivación de diferentes microorganismos y se han obtenido remo-

ciones de microorganismos coliformes en el orden de tres logaritmos y de *Pseudomona aeruginosa* superior a dos logaritmos.⁷ Otros reportes plantean que para la inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* es suficiente una concentración de ozono disuelto de 2 mg/L durante 5 min para inactivar 10³ unidades formadoras de colonias/mililitro (UFC/mL).^{8,9} En los estudios realizados por

Lezcano y col. se reporta que concentraciones de ozono disuelto en el orden de 1,5 mg/L fueron suficientes para inactivar cinco niveles logarítmicos de *Candida albicans* en un tiempo menor de 3 min y de dos min para dos cepas de *Streptococcus faecalis*.¹⁰

El poder germicida del ozono está bien documentado, las cinéticas de inactivación muestran una rápida disminución del número inicial de microorganismos debido a la acción del ozono bajo concentraciones de ozono disuelto superiores a 0,4 mg/L. El proceso de ozonización en medio acuoso descrito por Hoigné y Staehelin, involucra dos especies químicas, el ozono molecular (O₃) y los radicales hidroxilo (OH·). En este sentido, el empleo de la ozonización para inactivar microorganismos se ha estudiado bajo condiciones experimentales que evalúan la desinfección por la acción del ozono molecular o por vía radicálica a través de los radicales hidroxilo que se generan de la descomposición del ozono en el medio acuoso.¹¹⁻¹⁵

Sin embargo, no existen reportes del efecto germicida que pudieran tener los subproductos generados de la reacción del ozono con los microorganismos, así como la interacción de estos con moléculas de la membrana.

Varios estudios sobre el efecto del ozono sobre moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos han sido desarrollados con el objetivo de establecer su mecanismo de acción sobre los microorganismos, el cual es complejo y aún no ha sido establecido.¹⁶⁻¹⁷

El diseño y la operación de las plantas de tratamiento pueden mejorarse teniendo en cuenta el conocimiento del mecanismo de acción y su relación con parámetros tales como el tiempo de contacto y la concentración de ozono disuelto en el líquido.⁵ Es por esto, que se hace necesario profundizar en estudios dirigidos a evaluar los efectos de la ozonización bajo diferentes condiciones experimentales sobre los microorganismos con el propósito de avanzar en el conocimiento y la dilucidación del mecanismo de acción de este gas. Hecho que coloca este tipo de estudio entre las prioridades de los especialistas.

En este sentido, el presente trabajo se propuso determinar algunos efectos oxidantes del ozono y de los subproductos de reacción con los microorganismo en su acción bactericida, en cuanto a viabilidad y su efecto sobre la membrana plasmática, en dos especies bacterianas, de gran incidencia y prevalencia en las aguas, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* var. *typhimurium*. Además, comprobar la actividad antimicrobiana de los productos de reacción de los microorganismos con el ozono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Para la realización de los ensayos se emplearon las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, y *Salmonella enterica* var. *typhimurium* ATCC 12048.

A partir de un cultivo en placas en agar triptonsoya, se tomaron de tres a cinco colonias que fueron inoculadas en 10 mL de caldo triptonsoya en zaranda a 100 r/min, durante 18 h a 35 °C. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 3 000 r/min durante 10 min, se desechó el sobrenadante. Las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en agua bidestilada estéril. El valor final de densidad óptica de la suspensión fue medido en un espectrofotómetro a 405 nm y ajustado en un intervalo de 0,305 a 0,370.

Condiciones de ozonización

La mezcla gaseosa ozono-oxígeno se obtuvo a partir de un ozonizador modelo AQOZO, CIOZONO (Cuba) partiendo de oxígeno puro. La ozonización fue llevada

a cabo en un reactor encamisado, de vidrio y 100 mL de capacidad, a un flujo de 3,6 L/h. El seguimiento y control de la concentración de ozono disuelto en el líquido fue determinado con un espectrofotómetro a 256 nm (Fig. 1). Los experimentos se realizaron con una concentración inicial de ozono disuelto en el agua de 0,24 mg/L, para lograr daños en las células bacterianas sin alcanzar una elevada inactivación y evaluar las alteraciones que ocurren en los microorganismos. Una vez obtenida la concentración de ozono en el agua contenida dentro del reactor, se inoculó el microorganismo y se detuvo la ozonización.

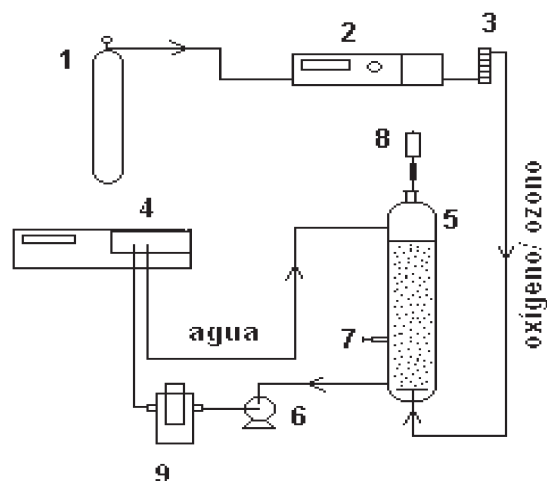


Fig. 1. Instalación experimental de laboratorio.

1. Botellón de oxígeno, 2. Ozonizador, 3. Flujómetro, 4. Espectrofotómetro, 5. Columna de burbujeo, 6. Bomba peristáltica, 7. Válvula para toma de muestra, 8. Destructor de ozono, 9. Medidor de ozono disuelto Dulcometro.

Cinéticas de Inactivación

Cada experimento tuvo una duración de 10 min. Se tomaron dos mililitros de muestra a los tiempos 0, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 y 600 s de iniciado el contacto de la suspensión de microorganismo y el ozono disuelto, las que fueron sembradas en agar para conteo en placas a partir de diluciones seriadas. Las curvas de inactivación fueron realizadas por triplicado y el conteo de viables en cada punto fue realizado por triplicado.

Actividad antimicrobiana de los productos de reacción del ozono con los microorganismos

De la misma manera que se realizaron las cinéticas de inactivación la suspensión de microorganismos fue mantenida durante 45 s de contacto. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla fue filtrada al vacío a través de un filtro miliporo de 0,45 μm. Posteriormente, a la disolución filtrada se le inoculó una nueva suspensión de microorganismos hasta lograr una concentración final en el orden de 10⁷ UFC/mL.

Se tomaron muestras a los tiempos 0, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 y 600 s para la posterior siembra a partir de diluciones seriadas en agar para conteo en placas.¹⁸

Peroxidación lipídica

Los niveles de peroxidación lipídica fueron determinados por la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, expresada como cantidad de malonaldehído/UFC, descrita por Conti y col., 1991.¹⁹ Se utilizó un equipo de fluorimetría RF- 5000, (Shimadzu).

Análisis estadístico

Todos los estudios fueron realizados por triplicado y procesados mediante análisis de varianza a través del programa STATGRAPHICS Plus versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo apreciar cómo en los primeros 60 s de contacto con el ozono para ambas cepas bacterianas se alcanza una reducción de un logaritmo y al cabo de los 10 min una disminución de casi cuatro unidades logarítmicas (Tabla 1).

Se observó que la inactivación continuaba aún sin presencia de ozono disuelto en el medio hasta alcanzar una inactivación cercana al 99,99 %.

El ozono por su elevado poder oxidante puede reaccionar con relativa facilidad con los compuestos insaturados presentes en la membrana de los microorganismos y otras moléculas como los grupos SH de las proteínas, afectando así su estructura, limitando su funcionalidad y provocando la muerte del microorganismo.^{20,21} Sin embargo, no existe evidencia de la actividad antimicrobiana que presentan los compuestos que se generan de

la reacción del ozono con estos compuestos de membrana que presentan un menor poder oxidante y pueden reaccionar con aquellas moléculas de los microorganismos que no fueron afectadas directamente por la acción del ozono en los primeros instantes.

Al analizar las cinéticas de inactivación (Fig. 2), a partir de los resultados tabulados (Tabla 1), se pudo observar que bajo las condiciones experimentales evaluadas el comportamiento de la inactivación de ambas cepas bacterianas mostró dos constantes cinéticas de primer orden, una k_1 desde $t = 0$ a 240 s y otra k_2 de $t = 240$ a 600 s que cumplen con la ecuación:

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 - kt \quad (1)$$

donde:

k constante de primer orden (s^{-1}).

N_0 Concentración inicial de microorganismos (UFC/mL).

N Concentración de microorganismos a diferentes tiempos (UFC/mL).

t tiempo en s.

Tabla 1. Variación de las concentraciones de microorganismos y de ozono disuelto en el agua.

Tiempo (s)	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella enterica</i>		
	Log N	Inactivación %	Ozono disuelto (mg/L)	Log N	Inactivación %	Ozono disuelto (mg/L)
0	9,117	0,0	0,24	9,445	0,0	0,24
30	8,643	66,412	0,24	9,068	57,989	0,07
45	8,498	75,954	0,0	8,781	78,330	0,0
60	8,180	88,435	0,0	8,484	89,048	0,0
120	7,391	98,118	0,0	7,740	98,025	0,0
240	6,373	99,819	0,0	6,857	99,741	0,0
360	6,233	99,869	0,0	6,314	99,926	0,0
480	5,841	99,947	0,0	6,041	99,960	0,0
600	5,371	99,982	0,0	5,645	99,984	0,0

N Concentración de microorganismos.

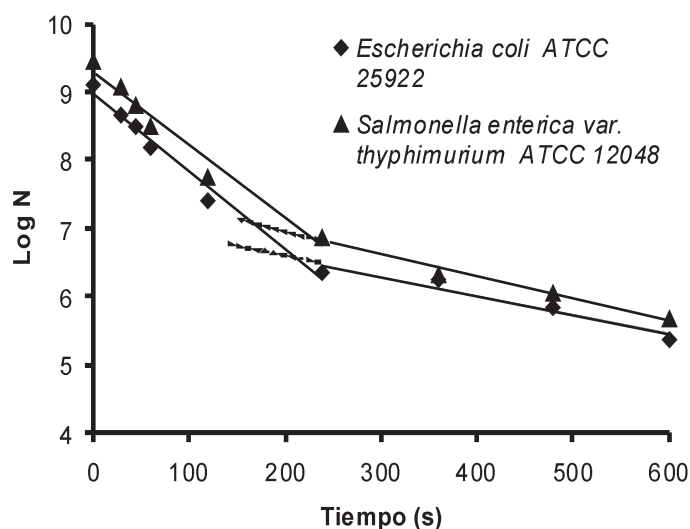


Fig. 2. Cinética de inactivación de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* var. *typhimurium*. Concentración inicial de ozono disuelto en agua de 0,24 mg/L. ($n = 3$).

Para ambos microorganismos las constantes cinéticas k_1 y k_2 presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Tabla 2). Estas diferencias pudieran estar asociadas al agotamiento del ozono en el medio acuoso, al efecto protector que pudieran ejercer los componentes celulares o las propias células muertas sobre aquellas que no fueron afectadas por el ozono o a la formación de compuestos a partir de la descomposición del ozono que presentan un menor poder oxidante o debido.²⁰

Varios autores han reportado las cinéticas de inactivación de una gran variedad de microorganismos bajo diferentes condiciones. Los reportes indican la disminución de la concentración inicial de los microorganismos desde los primeros instantes de la ozonización para microorganismos Gram positivos y negativos, esporas de *Bacillus subtilis* y *Cryptosporidium*.^{7,10,12,14} En estos estudios, se obtuvo una correlación lineal entre el logaritmo de la concentración de microorganismo y el tiempo de contacto con la obtención de una sola constante cinética durante el período de inactivación. La diferencia obtenida en este estudio respecto a lo reportado por esos autores puede estar dada en que ellos mantuvieron una concentración constante de ozono disuelto durante el tiempo de inactivación y superior a la empleada en este trabajo.^{7,14-16} Sin embargo, no tuvieron en cuenta la formación de especies peroxídicas en la reacción del ozono con los microorganismos y los componentes celulares.

Actividad antimicrobiana de los productos de reacción del ozono con los microorganismos

En el estudio de la actividad antimicrobiana, de los subproductos de reacción formados bajo la acción del ozono sobre los microorganismos, se observó un marcado efecto antimicrobiano de estos subproductos sobre ambas cepas microbianas (Fig. 3).

Se apreció que los subproductos de reacción del ozono con los microorganismos presentan actividad antimicrobiana cercana a tres unidades logarítmicas durante los 10 min de reacción en las condiciones experimentales estudiadas.

Teniendo en cuenta el mecanismo de Criegee y la presencia de lípidos con insaturaciones en la membrana de la mayoría de los microorganismos es de esperar que la acción del ozono sobre estos compuestos conduzca a la formación de productos de reacción, tales como peróxidos, hidroperóxidos, aldehídos y otras especies, los cuales pudieran reaccionar con otros compuestos lipídicos presentes en otros microorganismos que no fueron afectados directamente por la acción del ozono y ser la causa de la inactivación observada después de agotado el ozono disuelto en el líquido.

Peroxidación lipídica

Los ácidos grasos poliinsaturados son fundamentales para las células microbianas, ya que forman parte de los fosfolípidos que son constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas y los responsables en buena medida de la fluidez de esta. El método de

determinación de la peroxidación lipídica se basa en la reacción de un agente cromógeno con el malonaldehído, expresado en picomoles de MDA/UFC.¹⁹

El proceso de peroxidación lipídica mostró un aumento en las concentraciones de malonaldehído durante todo el tiempo de contacto de los microorganismos con el ozono (Fig. 4).

Para ambas cepas microbianas la concentración alcanza valores significativos respecto al valor inicial desde el comienzo del proceso de ozonización. En la cepa *E. coli*, se pudo observar que a partir de los 8 min la concentración de malonaldehído no mostró diferencias significativas. En el caso de la cepa de *S. enterica*, se observó que la cuantificación de malonaldehído continúa aumentando aunque la tendencia es a formar una meseta en los últimos minutos de tratamiento.

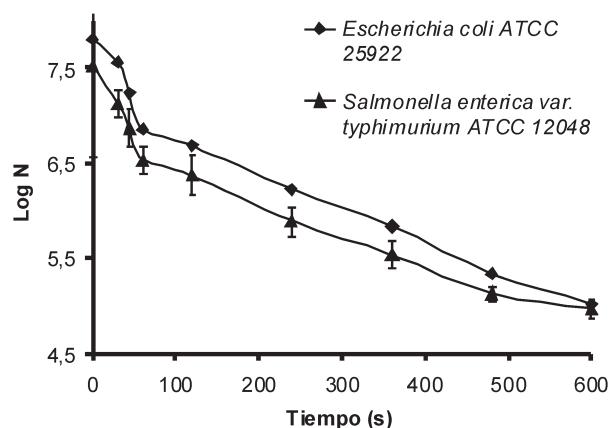


Fig. 3. Inactivación de los microorganismos en presencia de los subproductos generados de la reacción del ozono con los microorganismos ($n = 3$).

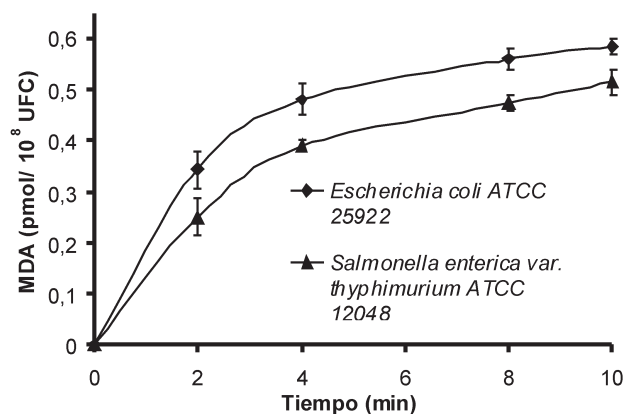


Fig. 4. Formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico a concentración inicial de ozono disuelto de 0, 24 ppm ($n = 3$).

Tabla 2. Constantes cinéticas de inactivación para ambos microorganismos.

Cepa	$K_1 \pm DS$ (s^{-1}) $n = 3$	$K_2 \pm DS$ (s^{-1}) $n = 3$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	- 0,011 4 \pm 0,003	- 0,002 8 \pm 0,001
<i>Salmonella enterica</i> var. typhimurium ATCC 12048	- 0,010 8 \pm 0,002	- 0,003 2 \pm 0,002

Resultados similares fueron obtenidos por Chevrier y col.²² al someter las células de *E. gracilis* a la acción del ozono. Sin embargo, otros autores obtuvieron un aumento de la concentración de malonaldehído durante todo el proceso de ozonización de *E. coli* K-12.²³ Este comportamiento diferente pudiera estar sujeto al efecto de las condiciones de ozonización.

Existen pocas investigaciones que permiten esclarecer aspectos acerca de los mecanismos de acción del ozono sobre los microorganismos,²⁴ hasta el momento no se ha reportado el efecto que presentan los subproductos de reacción del ozono con los microorganismos y su acción oxidante sobre otros microorganismos. Algunos autores han estudiado la reacción del ozono con componentes celulares y de esta manera han establecido un posible vínculo entre estos y los mecanismos que producen la muerte celular.^{16-17,20} Los procesos de peroxidación lipídica ocurren desde los primeros instantes, pues el ozono ataca directamente los dobles enlaces de los lípidos presentes en la membrana y estos a su vez, a otras moléculas, sin embargo, esto es solo la iniciación del proceso de muerte.²⁵ En otros estudios Curtiellas y col., demostraron que la lisis ocurre después de la pérdida de su viabilidad, por lo que la verdadera inactivación está dada por la acción del ozono en moléculas esenciales para la vida del microorganismo, tales como el ADN, lípidos insaturados o enzimas y no por la destrucción de la pared o la membrana celular o ambas.²⁰

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales evaluadas el ozono reacciona con los microorganismos atacando moléculas de la membrana y provocando un aumento de la peroxidación lipídica. Se verificó que los productos de reacción generados, también presentan actividad antimicrobiana debido a su poder oxidante que aunque no son tan elevados como el ozono también afectan la viabilidad de los microorganismos que no fueron inicialmente alcanzados por el ozono.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kim J, Yousef AE and Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods. *Journal Food Protection*. 1999; 62:1071-87.
- Kerwin L. Operating Experience with Drinking Water Ozonation in North America. 19th Ozone World Congress & Exhibition. IOA. August 31–September 3, 2009, Tokyo, Japan.
- Edwards-Brandt J, Shorney-Darby H, Neemann J, Hesby J and Tona C. Use of Ozone for Disinfection and Taste and Odor Control at Proposed Membrane Facility. *Ozone Science and Engineering*. 2007;29(3):281-86.
- Kim J and Yousef AE. Inactivation Kinetics of Foodborne Spoilage and Pathogenic Bacteria by Ozone. *Food Microbiology and Safety*. 2000;65(3):521-27.
- Malley JP. A new paradigm for drinking water disinfection. 17th Ozone World Congress, Strasbourg, August 22-25, 2005. CD-ROM.
- Ried A, Mielcke J, Wieland A. The Potential Use of Ozone in Municipal Waste Water. 19th Ozone World Congress & Exhibition. IOA. August 31–September 3, 2009, Tokyo, Japan.
- Lezcano I, Rey RP, Gutiérrez MS, Baluja C, Sánchez E. Ozone Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella typhimurium* in water. *Ozone Science and Engineering*. 1999;21(3):293-300.
- Lawrence J and Capelli FP. Ozone in drinking water treatment: A review. *The Science of the Total Environment*. 1977:700-99.
- Cho M, Cheng H, and Yoon J. Effect of pH and importance of ozone Initiated radical reactions in inactivating *Bacillus subtilis* spore. *Ozone Science & Engineering*. 2002; 24(2):145-50.
- Lezcano I, Rey RP, Gutiérrez MS, Baluja C, Sánchez E. Ozone Inactivation of microorganisms in Water. Gram positive and yeast. *Ozone Science & Engineering*, 2001; 23(2):183-187.
- Beltrán F. Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems. Spain: Lewis Publishers; 2004.
- Craik S, Smith D, Chandrakanth M, Belosevic M. Efficient Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in a static mixer ozone contactor. *Ozone Science & Engineering*. 2003;25(4):295-306.
- Hoigné J, Bader H. Rate constants of direct reaction with organic and inorganic compounds in water. Dissociating organic compounds. *Water Research*. 1983:184-91.
- Hunt NK, Mariñas BJ. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. *Water Research*. 1997; 31:1335-42.
- Finch G, Smith D and M. Stiles, Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. *Water Research*. 1988; 22(12):1563-70.
- Cabiscol E, Tamarit J, Rose J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiol*. 2000;3(1):3-8.
- Fisher CW, Lee D, Dodge BA, Hamman KM, Robbins JB, Martin SE. Influence of Catalase and Superoxide Dismutase on Ozone Inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(4):1405-09.
- The United States Pharmacopoeia 30 and National Formulary 25 (USP 30- NF 25) Microbial limite test. Plate Methop. The United States Pharmacopeial Convention, Inc USA, 2007.
- Conti M, Morand PC, Levillain P and Lemonnier A. Improved fluorimetric determination of malonaldehyde. *Clin Chim*. 1991;37:1273-75.
- Curtiellas V. Characterization of *E. Coli* Cells Lysis by Ozone. 17th word congress and exhibition. 2005. Strasbourg, France.
- Thanomsub B, Anupunpisit V, Chanphetch S, Watcharachaipong T, Poonkhum R, Srisukonth C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Gen. Appl. Microbiol*. 2002;48(4):193-99.
- Chevrier N, Fathey S and Chung YS. Oxidative damages and repair in *Euglena Gracilis* exposed to ozone. SH groups and lipids. *Plant Cell Physiology*. 1998;29:321.
- Komanapalli IR, Mudd JB and Lau HS. Effect of ozone on metabolic activities of *Escherichia coli* K-12. *Toxicology letters*. 1967;90(1):61-66.
- Naito S. Ozone Inactivation of Food spoilage acid-producing bacteria. 19th Ozone World Congress & Exhibition. IOA. August 31–September 3, 2009, Tokyo, Japan.
- Finch GR, Haas C, Oppenheimer J, Gordon G and Trussell R. Design criteria for inactivation of cryptosporidium by ozone in drinking water. *Ozone Science & Engineering*. 2001;23(4):259-84.