

## **Informe intermedio de resultados del Contrato OTRI 4746: Protocolo de pruebas de eficacia de Purificador de Aire**

### **Informe de progreso y resultados del proyecto**

De acuerdo a la memoria del proyecto de investigación “Contrato OTRI 4746: Protocolo de pruebas de eficacia de purificador de aire” suscrito entre la Universidad de Granada y la empresa Airzone se contempla como objetivo principal la determinación del efecto higienizante de un prototipo de ionizador sobre distintos cultivos bacterianos. En la presente memoria se presentan los resultados obtenidos al respecto.

### **1. Determinación de la viabilidad celular de distintas cepas bacterianas**

#### **Determinación de la viabilidad celular de *Escherichia coli* cepa GY 36**

Los ensayos realizados con cultivos de *Escherichia coli* GY 36 pertenecen a los experimentos con bacterias previstos en la memoria inicial del proyecto, siendo esta bacteria el representante Gram negativo, no formador de esporas incluidos en el proyecto. *E. coli* representa una fracción importante de la microbiota del tracto intestinal, si bien es un microorganismo ubicuo con distintos aislados patógenos que pueden causar infecciones intestinales y fuera del intestino. Además, es un reservorio de genes de resistencia a antibióticos, por lo que su presencia en el medioambiente puede incrementar el número de fracasos terapéuticos tanto en infecciones humanas como veterinarias (Poirel et al., 2018). Por otra parte, la presencia de este microorganismo es frecuente en otros hábitats independientes del tracto intestinal, como son ambientes domésticos (Touchon et al., 2020), actuando estos ecosistemas como reservorios para futuras infecciones.

El efecto de la ionización sobre la viabilidad celular se ha determinado en tiempos de 15, 30, 60 y 120 minutos en la bacteria *E. coli* cepa GY36 registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de referencia CECT106. Además, se han expuesto las bacterias a tiempos prolongados (12 y 24 horas de exposición, respectivamente). Para ello se han realizado tres experimentos independientes empleándose en cada uno de ellos 8 repeticiones. La reducción de la viabilidad se determinó como el número de colonias obtenidas a partir de 50  $\mu$ L de una suspensión bacteriana con una D.O.<sub>600</sub> de 0.005 (8000 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL) en el medio de cultivo Luria-Bertani (medio LB, Bertani, 1950). Estos resultados se muestran en la tabla 1. La figura 1 se presenta un ejemplo de la reducción de la viabilidad observada para las células de *E. coli*.

Tabla. 1. Porcentaje de reducción de cultivos de *Escherichia coli* GY36 sometidas o no a ionización. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8). Se consideran diferencias estadísticas entre grupos si  $p < 0.05$  de acuerdo al test de Mann-Whitney. NA: no aplica

Tratamiento	Tiempo	Reducción viabilidad	Diferencias Control
Control	No exposición	NA	NA
	15 minutos	29%	$p=0.043$
	30 minutos	31%	$p=0.048$
	60 minutos	31%	$p=0.042$
Ionización	120 minutos	34%	$p < 0.001$
	12 horas	41%	$p < 0.001$
	24 horas	46%	$p=0.033$
	6 horas preincubación + 18 horas	58%	$p=0.003$



Figura 1. Ejemplo ilustrativo de la reducción en la viabilidad celular observada en células de *E. coli* no expuestas a ionización y sometidas a 24 horas y 18 horas previa incubación durante 6 horas a 37 °C.

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 1 y figura 2, la ionización durante un rango de tiempo de 15 a 120 minutos produce una reducción estadísticamente significativa del número de células viables independientemente del tiempo de exposición (valor promedio de reducción del número de colonias = 31%). Por tanto, a partir de 15 minutos de exposición a la ionización hay un efecto significativo sobre la capacidad de reducción de la carga bacteriana de este microorganismo, si bien este efecto no es acumulativo para tiempos de exposición a la ionización más prolongados (30, 60 y 120 minutos). Sin embargo, tiempos de exposición muy prolongados (12 horas y 24 horas) aumentan ligeramente el efecto inhibitorio de la ionización sobre el crecimiento de *E. coli* (valor promedio de reducción del número de colonias = 41% y 46% para 12 y 24 horas, respectivamente). Igualmente, se determinó la viabilidad celular de *E. coli* en cultivos previamente incubados a 37 °C durante (6 horas) y, posteriormente, sometidos a 18 horas

de ionización. En estos experimentos la reducción de la viabilidad aumentó de forma considerable, observándose una reducción promedio del número de colonias del 58% respecto al control no sometido a ionización. Este aumento de la reducción de la viabilidad celular sugiere que el efecto inhibitorio de la ionización sobre la viabilidad celular es mayor en células metabólicamente activas, lo que se obtiene mediante la incubación previa a la ionización de las placas inoculadas.

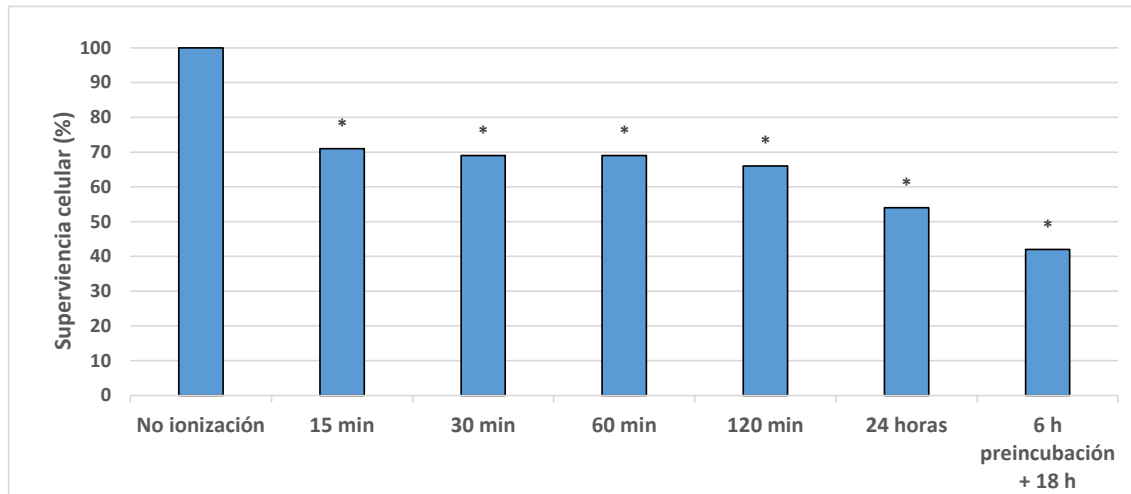


Figura 2. Supervivencia celular de *Escherichia coli* GY36 frente a diferentes tiempos de ionización. Para un tiempo y bacteria dados, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

Por otra parte, se determinó la viabilidad celular de *E. coli* adheridas a una superficie, empleándose para ello filtros de celulosa EZ-Pak (Millipore). Para estos experimentos se filtraron 25 mL de una suspensión celular de  $0.1 \times 10^{-8}$  unidades de D.O.<sub>600</sub> de *E. coli* (5.6 UFC/mL) sometiéndose a los mismos tiempos de ionización que los empleados para el ensayo en placa. La reducción de la viabilidad celular en estos experimentos fue menor que la observada para la técnica de dispersión en placa, los valores promedios se muestran en la tabla 2 y figura 3. En estos ensayos sólo se obtuvo una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad (20%) a partir de 60 minutos de exposición, no observándose un aumento en reducción de la viabilidad en tiempos de exposición superiores. Por otra parte, la incubación previa de las colonias de *E. coli* durante 6 horas y posterior exposición durante 18 horas tampoco resultó en un aumento de la reducción de la viabilidad (23%), contrario a lo observado en los ensayos en placa Petri (tabla 1). Por tanto, el efecto reductor de la viabilidad de la ionización es mayor en las células adheridas al medio de cultivo que en las adheridas a una superficie sólida (filtros EZ-Pak).

Tabla 2. Porcentaje de reducción de cultivos de *Escherichia coli* GY36 adheridos a superficie sometidas o no a ionización. Se muestran los datos de un experimento (N=6).

Tratamiento	Tiempo	Reducción viabilidad	Diferencias Control
Control	No exposición	NA	NA
Ionización	15 minutos	4%	p=0.400
	30 minutos	11%	p=0.086
	60 minutos	20%	p=0.029
	120 minutos	20%	p=0.029
	24 horas	21%	p=0.029
	6 horas preincubación + 18 horas	23%	p=0.029

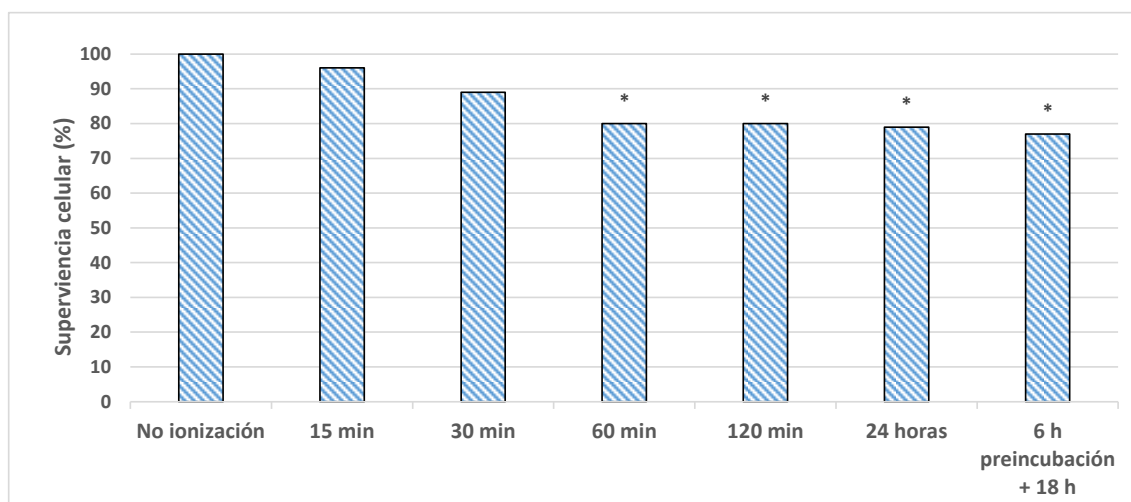


Figura 3. Supervivencia celular de *Escherichia coli* GY36 adheridos a superficie frente a diferentes tiempos de ionización. Para un tiempo y bacteria dados, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

### Determinación de la viabilidad celular de *Bacillus subtilis* cepa ATCC 6051

*Bacillus subtilis* ATCC 6051 es la especie más estudiada dentro del género *Bacillus* (Kovács, 2019) y, además, este microorganismo es frecuentemente usado como modelo para estudiar la división celular mediante esporulación. Las esporas son cuerpos de resistencia muy estables con capacidad de sobrevivir a múltiples condiciones de ambientes extremos, por lo que resisten multitud de estreses medioambientales (Jadhav et al., 2018). Estos factores hacen de las bacterias productoras de esporas de especial interés la capacidad higienizante de diferentes productos o sistemas con capacidad de reducir la viabilidad celular. Es por ello que este microorganismo se ha seleccionado como representante de las bacterias Gram positivas productoras de esporas. Además, indicar la ausencia de patogenicidad de esta especie en los humanos (Kim et al., 2109) aunque sí que la pueda haber en especies del mismo género como es el caso de *Bacillus anthracis*. El efecto de la ionización sobre la viabilidad se ha determinado siguiendo la metodología general previamente establecida para *E. coli* GY 36 en la bacteria *Bacillus*

*subtilis* cepa ATCC 6051 registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de referencia 39<sup>T</sup> empleando una D.O.<sub>600</sub> de  $1 \times 10^{-5}$  (1240 UFC/mL) en el medio de cultivo TSA (triptona caseína de soja agar, Kunkle and Kinyon, 1988).

Los datos relativos al efecto de la ionización sobre *B. subtilis* ATCC 6051 se muestran en la tabla 3 y figura 4. De acuerdo a estos experimentos, la ionización durante un rango de 15 a 30 minutos no produce una reducción estadística significativa del número de células viables independientemente del tiempo de exposición (valor promedio de reducción del número de colonias a los 15 y 30 minutos de exposición: 3 y 7%, respectivamente). Por el contrario, entre 60 y 120 minutos de exposición a la ionización se observa una reducción estadísticamente significativa (intervalo 9-12%, promedio 10%). Indicar que una exposición más prolongada en el tiempo (24 horas) no resultó en una reducción significativa de la inhibición del crecimiento de esta bacteria (reducción promedio de la viabilidad = 9%). Igualmente, una incubación previa a la exposición de la bacteria a 37°C no resultó en un aumento de la inhibición del crecimiento (reducción promedio de la viabilidad = 6%), respecto al control sin exposición a la ionización. Por tanto, la mayor capacidad de resistencia frente al estrés celular dado de este microorganismo esporulador resulta en una mayor resistencia a la ionización emitida por el prototipo empleado, si bien existe una reducción significativa de la viabilidad celular cuando se emplean tiempos superiores a 30 minutos de exposición, aunque no existe un aumento significativo de la reducción de la viabilidad en tiempos más prolongados.

Tabla. 3. Porcentaje de reducción de cultivos de *Bacillus subtilis* ATCC 6051 sometidas o no a ionización. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8). Se consideran diferencias estadísticas entre grupos si  $p < 0.05$  de acuerdo al test de Mann-Whitney. NA: no aplica

Tratamiento	Tiempo	Reducción viabilidad	Diferencias Control
Control	No exposición	NA	NA
	15 minutos	3%	p=0.401
	30 minutos	7%	p=0.203
Ionización	60 minutos	12%	p=0.031
	120 minutos	9%	P=0.044
	24 horas	9%	p=0.035
	6 horas preincubación + 18 horas	6%	p=0.305

### Determinación de la viabilidad celular de *Staphylococcus aureus* NCTC 8532

Los ensayos realizados sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 (registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de referencia 86<sup>T</sup>) pertenece al grupo de bacterias patógenas Gram positivas no productoras de esporas previstos en la memoria del proyecto. Este microorganismo es una de las causas más comunes de infección transmitidas a través de alimentos en todo el mundo (Fetsch and Johler, 2018). La reducción de la viabilidad se ha determinado siguiendo la metodología previamente

establecida para *E. coli* GY 36 empleándose una D.O.<sub>600</sub> de  $1 \times 10^{-6}$  (1000 UFC/mL) en el medio de cultivo agar nutritivo (Blakely and Steward, 1964).

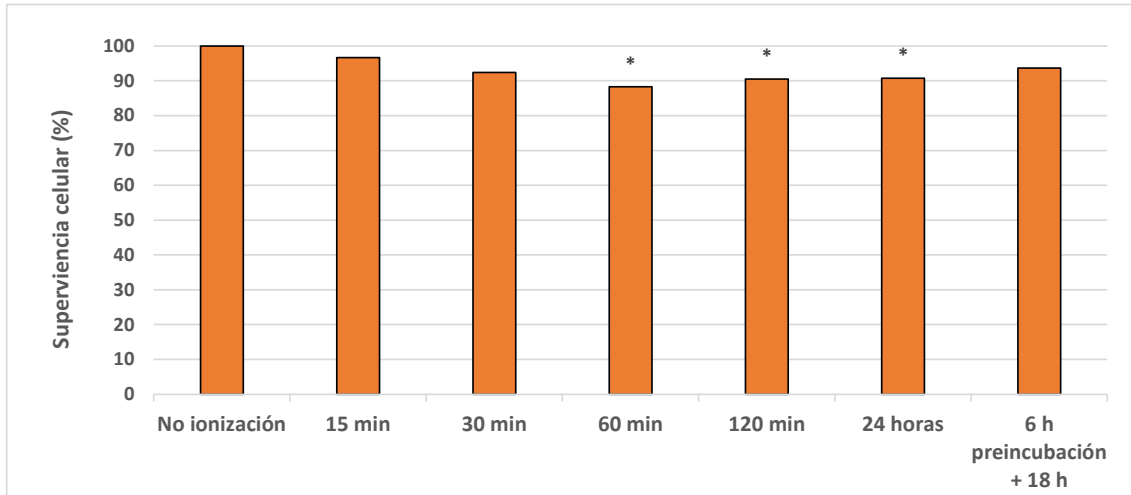


Figura 4. Supervivencia celular de *Bacillus subtilis* ATCC 6051 frente a diferentes tiempos de ionización. Para un tiempo y bacteria dados, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

Los datos relativos al efecto de la ionización sobre *S. aureus* NCTC 8532 se muestran en la tabla 4 y figura 5. Estos experimentos indican que la ionización durante un rango de 15 a 30 minutos no produce una reducción estadística significativa del número de células viables (valor promedio de reducción del número de colonias a los 15 y 30 minutos de exposición: 9 y 10%, respectivamente), al igual que se observó para el caso de *B. subtilis* ATCC 6051. Si bien, exposiciones más prolongadas a la ionización resultan en una reducción estadísticamente significativa, llegando a reducirse hasta un máximo del 25% de la población viable. Por otra parte, la exposición durante 24 horas produce una importante reducción de la viabilidad celular (reducción promedio de la viabilidad = 38%), e igualmente la exposición sobre células bacterianas pre-incubadas (T6E+18H) disminuye el número de colonias en un 16%. Por tanto, la sensibilidad de este patógeno a la ionización es mayor que la observada para microorganismos esporuladores (*B. subtilis* ATCC 6051), aumentándose casi 4 veces la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano. Además, se alcanzaron valores máximos de la reducción a la viabilidad celular cercanos a los obtenidos para el microorganismo Gram negativo ensayado con tiempos de exposición de 24 horas (38% para *S. aureus* NCTC 8532 frente a 46% *E. coli* GY 36).

Tabla 4 Porcentaje de reducción de cultivos de *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 sometidas o no a ionización. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8). Se consideran diferencias estadísticas entre grupos si  $p < 0.05$  de acuerdo al test de Mann-Whitney. NA: no aplica

Tratamiento	Tiempo	Reducción viabilidad	Diferencias Control
Control	No exposición	NA	NA
Ionización	15 minutos	9%	$p=0.337$
	30 minutos	10%	$p=0.218$
	60 minutos	20%	$p=0.013$
	120 minutos	25%	$p=0.006$
	24 horas	38%	$p < 0.001$
	6 horas preincubación + 18 horas	16%	$p=0.038$

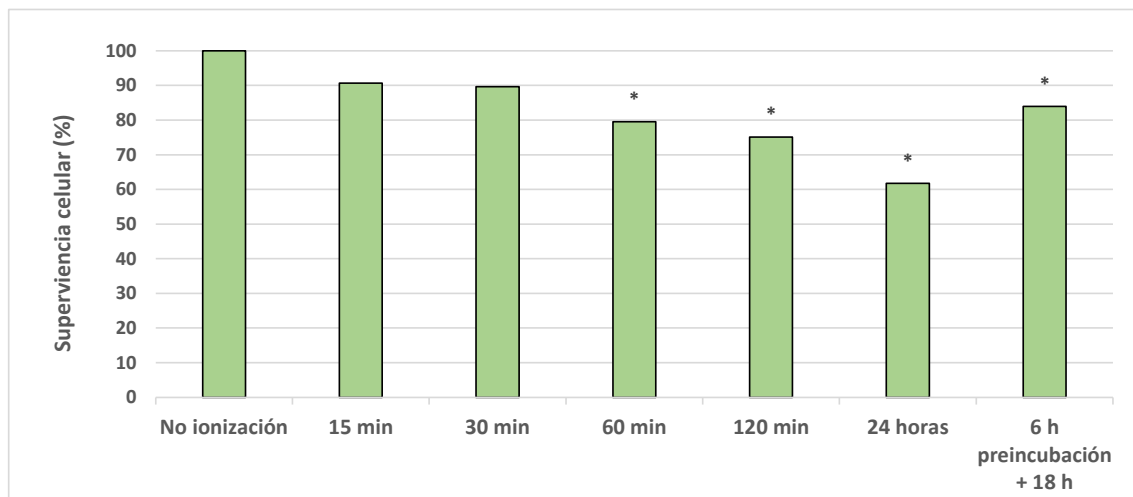


Figura 5. Supervivencia celular de *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 frente a diferentes tiempos de ionización. Para un tiempo y bacteria dados, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

### Determinación de la viabilidad celular de *Listeria innocua* CCUG 15531

*Listeria monocytogenes* es un patógeno transmitido por los alimentos responsable de la enfermedad conocida como listeriosis, que es potencialmente letal en individuos inmunodeprimidos. Por otra parte, *Listeria innocua* comparte grandes similitudes genómicas y fisiológicas con *L. monocytogenes*, además de la cohabitación ecológica de las dos especies (Milillo et al., 2012), lo que permite predecir el comportamiento de *L. monocytogenes* frente a diferentes aspectos empleando el representante subrogado no patógeno (*L. innocua*) (Sinclair et al., 2012). Por tanto, *L. innocua* junto a *S. aureus* pertenecen al grupo de bacterias patógenas Gram positivas no productoras de esporas previstos en la memoria inicial del proyecto. La determinación de la viabilidad de la bacteria *Listeria innocua* CCUG 15531 (registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de referencia 910<sup>T</sup>) se determinó siguiendo el protocolo general

establecido empleándose una D.O.<sub>600</sub> de  $1 \times 10^{-5}$  (2230 UFC/mL) empleando el medio de cultivo infusión cerebro-corazón agar (medio BHI de sus siglas en inglés brain-heart infussion, Fernandez-Garayzabal et al., 1992)

De acuerdo a los resultados experimentales presentados en la tabla 5 y figura 6, a partir de 30 minutos de exposición a la ionización existe una reducción significativa de la viabilidad celular de esta bacteria hasta alcanzar una reducción del número de células viables del 25% para exposiciones no prolongadas. Destacar, que tras 24 horas de exposición a la ionización se reduce a la mitad la población bacteriana respecto al control no ionizado (56% para este microorganismo frente al 46%, 36% y 9% obtenidos para *E. coli* GY 36, *S. aureus* NCTC 8532 y *B. subtilis* ATCC 6051, respectivamente). Por tanto, la reducción del 56% obtenida para *L. innocua* es la reducción máxima obtenida independientemente del microorganismo a las 24 horas de exposición. Por último, la incubación previa a la exposición prolongada (T6+18H) no aumenta la reducción (11%) contrario a lo observado con *E. coli* y similar a lo descrito para el resto de Gram positivas analizadas. De estos resultados podemos concluir que la cepa de *Listeria* empleada es altamente sensible a la ionización especialmente a tiempos de exposición prolongados, lo que indica que la ionización emitida por el prototipo empleado en estos experimentos tiene una amplia capacidad higienizante sobre *L. monocytogenes*.

Tabla 5. Porcentaje de reducción de cultivos de *Listeria innocua* CCUG 15531 sometidas o no a ionización. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8). Se consideran diferencias estadísticas entre grupos si  $p < 0.05$  de acuerdo al test de Mann-Whitney. NA: no aplica

Tratamiento	Tiempo	Reducción viabilidad	Diferencias Control
Control	No exposición	NA	NA
	15 minutos	7%	p=0.073
Ionización	30 minutos	12%	p=0.004
	60 minutos	17%	p<0.001
	120 minutos	26%	p<0.001
	24 horas	56%	p<0.001
	6 horas preincubación + 18 horas	11%	p=0.002



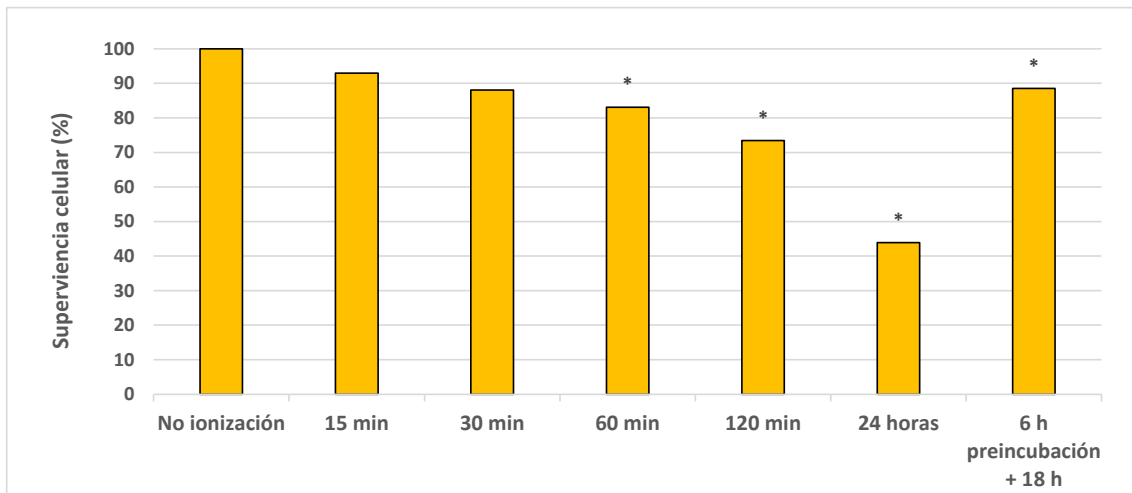


Figura 5. Supervivencia celular de *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 frente a diferentes tiempos de ionización. Para un tiempo y bacteria dados, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

A modo de estudio comparativo se presenta la figura 7 donde se observa la supervivencia celular para cada una de las cepas y los distintos tiempos de exposición a la ionización empleados.

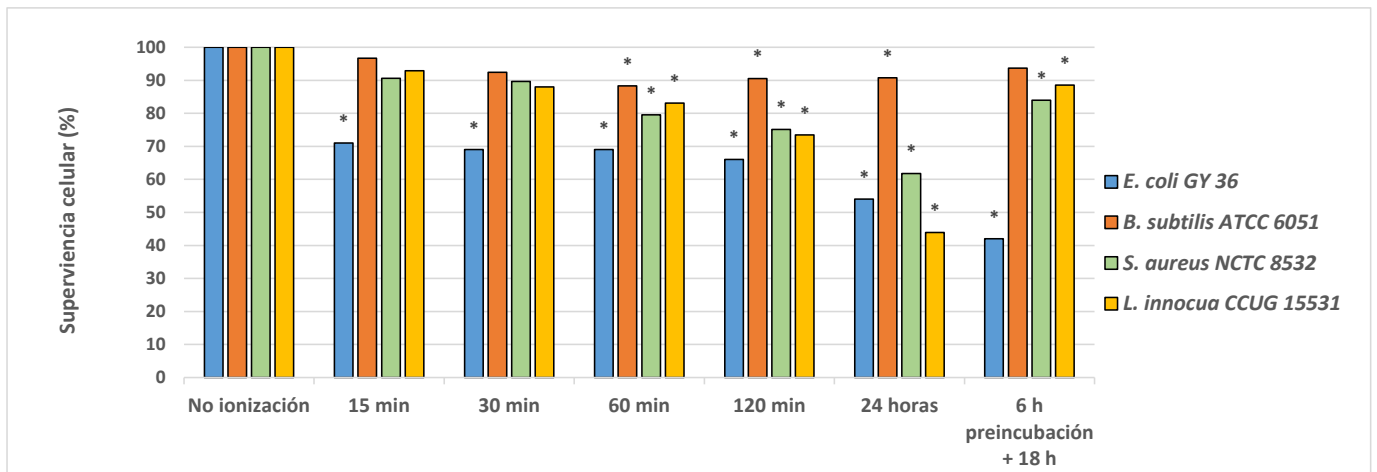


Figura 7. Supervivencia celular frente a diferentes tiempos de ionización en distintos tipos de cultivos bacterianos. *E. coli* GY36; *B. subtilis* ATCC 6051; *S. aureus* NCTC 8532; *L. innocua* CCUG 15531. Para un tiempo y bacteria dados, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

## 2. Determinación de la viabilidad celular de las bacterias modelos sometidas a ionización combinada con ventilación mecánica

Adicionalmente se determinó el efecto combinado de la ionización con una ventilación mecánica potente del dispositivo ionizante sobre las bacterias anteriormente ensayadas. La figura 8 presenta la disposición del prototipo ionizante unido a un ventilador productor de una potente corriente de aire. La metodología seguida es la descrita para la correspondiente bacteria de acuerdo al experimento sin ventilación. Los resultados se muestran en la tabla 6 y la figura 9.



Figura 8. Colocación del dispositivo ionizante combinado con ventilación mecánica en el sistema de urna cerrada.

Tabla 6. Porcentaje de reducción de cultivos de *Escherichia coli* GY36, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 y *Listeria innocua* CCUG 15531 sometidas a ionización combinada con ventilación mecánica y sin ventilación. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8). Se consideran diferencias estadísticas entre grupos si  $p < 0.05$  de acuerdo al test de Mann-Whitney. NA: no aplica

		No ventilación		Ventilación	
		Reducción viabilidad	Diferencias Control	Reducción viabilidad	Diferencias Control
<i>Escherichia coli</i> GY36	15 minutos ionización	29%	p=0.043	30%	p=0.003
	30 minutos ionización	31%	p=0.048	30%	p=0.005
	60 minutos ionización	31%	p=0.042	33%	p=0.004
	120 minutos ionización	34%	p<0.001	42%	p<0.001
	24 horas ionización	46%	p=0.033	51%	p<0.001
	6 horas preincubación + 18 horas ionización	58%	p=0.003	60%	p<0.001
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	15 minutos ionización	3%	p=0.401	6%	p=0.587
	30 minutos ionización	7%	p=0.203	10%	p=0.406
	60 minutos ionización	12%	p=0.031	50%	p<0.001
	120 minutos ionización	9%	P=0.044	65%	p<0.001
	24 horas ionización	9%	p=0.035	86%	p<0.001
	6 horas preincubación + 18 horas ionización	6%	p=0.305	20%	p=0.003
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8532	15 minutos ionización	9%	p=0.337	20%	p=0.133
	30 minutos ionización	10%	p=0.218	30%	p=0.001
	60 minutos ionización	20%	p=0.013	43%	p<0.001
	120 minutos ionización	25%	p=0.006	61%	p<0.001
	24 horas ionización	38%	p<0.001	97%	p<0.001
	6 horas preincubación + 18 horas ionización	16%	p=0.038	36%	p<0.001
<i>Listeria innocua</i> CCUG 15531	15 minutos ionización	7%	p=0.073	7%	p=0.161
	30 minutos ionización	12%	p=0.004	14%	p=0.026
	60 minutos ionización	17%	p<0.001	54%	p<0.001
	120 minutos ionización	26%	p<0.001	75%	p<0.001
	24 horas ionización	56%	p<0.001	75%	p<0.001
	6 horas preincubación + 18 horas ionización	11%	p=0.002	16%	p=0.003

De acuerdo con estos resultados mostrados en la tabla 6, la ionización sometida a corriente de aire no reduce significativamente la viabilidad celular de *E. coli* GY36 en ninguna de las condiciones de tiempo ensayadas (reducción promedio de la viabilidad = 41%) respecto al efecto higienizante observado para esta bacteria cuando la ionización no está sujeta a ventilación (reducción promedio de la viabilidad = 38%). Sin embargo, para el resto de bacterias modelo ensayadas la ionización unida a la ventilación reduce drásticamente la viabilidad celular. De este modo a partir de 60 minutos de ionización se observa una reducción de la viabilidad celular del 50%, 43% y 54% para *B. subtilis* ATCC 6051, *S. aureus* NCTC 8532 y *L. innocua* CCUG 15531 frente a una reducción del 12%, 20% y 17% para este tiempo de exposición pero sin ventilación para estas mismas cepas, respectivamente. Igualmente, hay que mencionar que tras 120 minutos de ionización con ventilación el efecto higienizante fue superior al 60% para estas tres cepas bacterianas. Además, cabe destacar el fuerte impacto de la ionización cuando se someta a ventilación en largos periodos de tiempo, ya que tras 24 horas prácticamente no hay crecimiento celular de *B. subtilis* (reducción promedio de la viabilidad = 86%) y *S. aureus* (reducción promedio de la viabilidad = 97%). Igualmente, *L. innocua* se reduce en un 75% en estas condiciones.

Por otra parte, el hecho de que no se observen diferencias significativas sobre *E. coli* para los dos tipos de tratamientos, nos permite descartar que el efecto añadido de la ventilación se deba a efectos colaterales como podría ser una deshidratación provocada por el movimiento del aire resultando en una menor viabilidad de las células bacterianas.

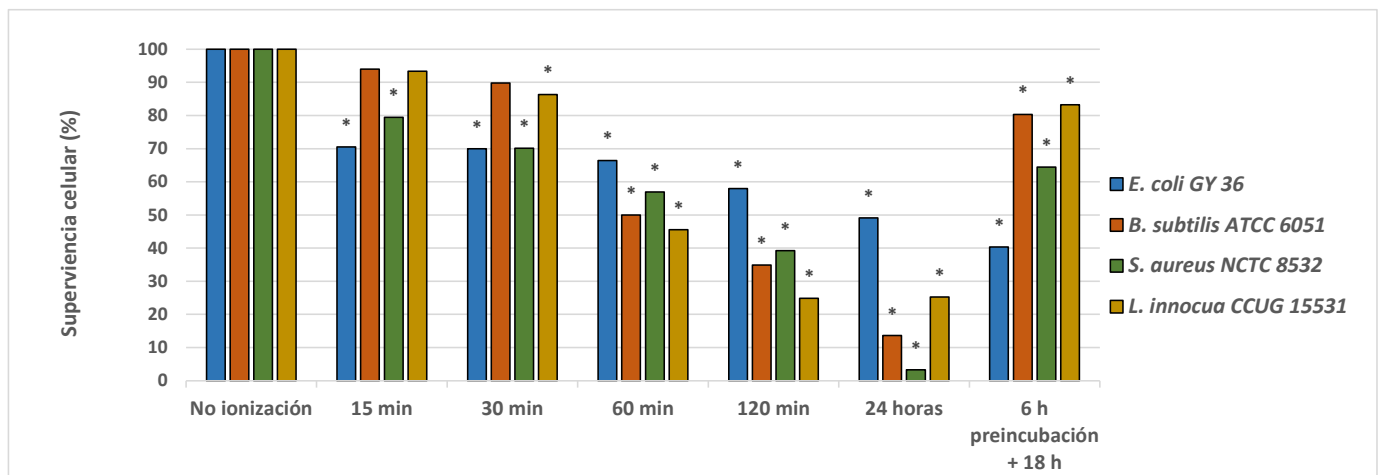


Figura 9. Supervivencia celular frente a diferentes tiempos de ionización en distintos tipos de cultivos bacterianos mediante ionización sometida a ventilación mecánica. *Escherichia coli* GY36, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 y *Listeria innocua* CCUG 15531. Para un tiempo y bacteria dados, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (T0) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

Por tanto, la aplicación de la ionización junto a una corriente de aire aumenta exponencialmente la capacidad higienizante del prototipo para las bacterias Gram positivas (*B. subtilis*, *S. aureus* y *L. innocua*) ensayadas, manteniéndose la capacidad ionizante observada en el representante de Gram negativas (*E. coli*) respecto a los

resultados obtenidos cuando la ionización no se somete a una corriente de aire. Estos resultados comparativos se presentan en la figura 10. Esta mayor capacidad de inhibición del crecimiento cuando la ionización se combina con la ventilación puede ser debida que la corriente de aire produce una mayor difusión de la ionización dentro de la cámara lo que aumenta significativamente su capacidad higienizante sobre células bacterianas, siendo esta efectividad más detectable sobre las bacterias con pared celular Gram positivo. Por tanto, se puede concluir que este prototipo permite un control efectivo de las distintas poblaciones ensayadas a pesar de las diferencias observadas entre los distintos microorganismos cuando se aplica mediante una fuerte ventilación, lo que sugiere una importante capacidad de controlar las poblaciones bacterianas sobre los microorganismos modelos empleados en este experimento.

Por otra parte, hay que indicar que al ser la acción higienizante del sistema más eficiente en los cultivos de *E. coli* sin ventilación, en relación a otros microorganismos ensayados, la introducción de la aireación no determina mejoras evidentes en esta cepa mientras que en las otras si resulta en un margen de mejora destacable. Lo que puede ser debido a que de por sí este microorganismo es altamente sensible a la ionización, alcanzándose los máximos niveles de inhibición del crecimiento celular para este microorganismo en condiciones de ionización sin ventilación no pudiéndose aumentar la acción inhibitoria sobre este microorganismo cuando se somete la ionización unida a la ventilación, esto se hace especialmente visible a cortos periodos de exposición. Por tanto, en términos generales la acción conjunta de la actividad de la ionización y la ventilación determinan efectos higienizantes más eficaces respecto a la ionización (reducción promedio de la viabilidad = 42%) que la obtenida cuando la exposición a la ionización se realiza sin corriente de aire (reducción promedio de la viabilidad = 22%).

### **3. Capacidad higienizante del prototipo ionización empleado sobre cultivos bacterianos**

De acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, la exposición a la ionización resulta en una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular en las distintas cepas bacterianas empleadas (*E. coli* GY 36, *B. subtilis* ATCC 605, *S. aureus* NCTC 8532 y *L. innocua* CCUG 15531) tanto cuando la ionización se somete a ventilación mecánica como cuando la ionización no está sujeta a una fuerte corriente de aire. Por tanto, el dispositivo ionizante tiene una amplia capacidad higienizante sobre distintas poblaciones bacterianas. Si bien, el grado de sensibilidad a la ionización es diferente para las distintas bacterias analizadas y el tipo de ventilación. Por una parte, cuando la ionización no se somete a ventilación el efecto higienizante es superior para *E. coli* (bacilo Gram negativas no formadoras de esporas) y *L. innocua* (bacilo Gram positivo no esporulado), intermedio para *S. aureus* (coco Gram positivo no esporulado), e inferior para *B. subtilis* (bacilo Gram positiva formador de esporas). Sin embargo, cuando la ionización está unida a una corriente de aire la capacidad ionizante fue mayor para *S. aureus* NCTC 8532, seguida de *B. subtilis* ATCC 605 y *L. innocua* CCUG 15531 y por último *E. coli* GY 36.

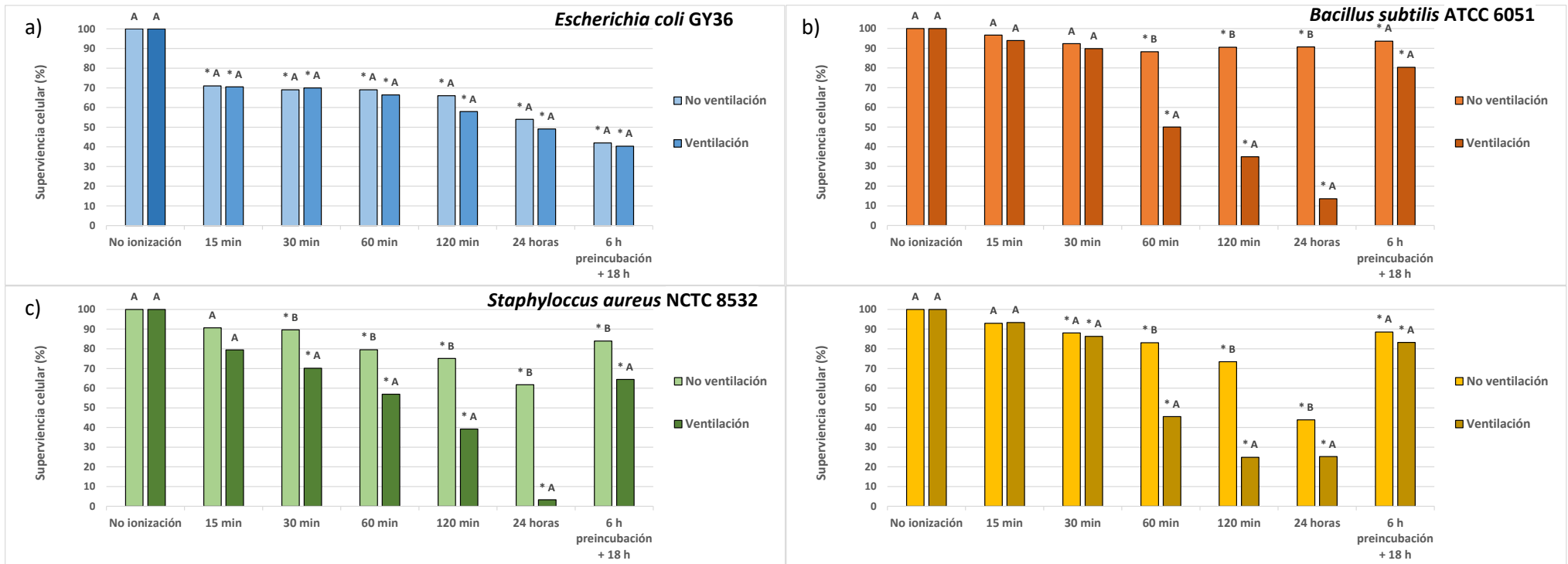


Figura 10. Supervivencia celular de *Escherichia coli* GY36 (a), *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (b), *Staphylococcus aureus* NCTC 8532 (c) y *Listeria innocua* CCUG (d) frente a diferentes tiempos de ionización con ventilación y sin ventilación. De acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ), un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (no ionización) para un tiempo y bacteria dados y distintas letras indican diferencias estadísticas entre la ionización sometida a ventilación o no. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

Finalmente, el análisis de escalamiento no-métrico (NMS) del efecto de la ionización sobre la viabilidad celular sobre las distintas cepas ensayadas en función del tiempo de exposición y de la ventilación (figura 11) permite confirmar que mayores tiempos de exposición resultan en un aumento de la reducción de la viabilidad. Además, la presencia de ventilación resulta en una sinergia del efecto inhibitorio, alcanzándose valores de inhibición promedios sensiblemente mayores cuando se combinan ambos factores independientemente de la cepa empleada (valor promedio de inhibición del crecimiento para todos las condiciones y cepas ensayadas cuando la ionización se une con ventilación 42% frente al 22% para la obtenido cuando no se emplea una potente corriente de aire). De este modo, a partir de 60 minutos de exposición a la ionización aplicados en corriente de aire resulta en una inhibición promedia superior (reducción promedio de la viabilidad = 45%) a la obtenida cuando se someten los cultivos bacterianos a 24 horas de exposición a la ionización en ausencia de ventilación mecánica (reducción promedio de la viabilidad = 37%).

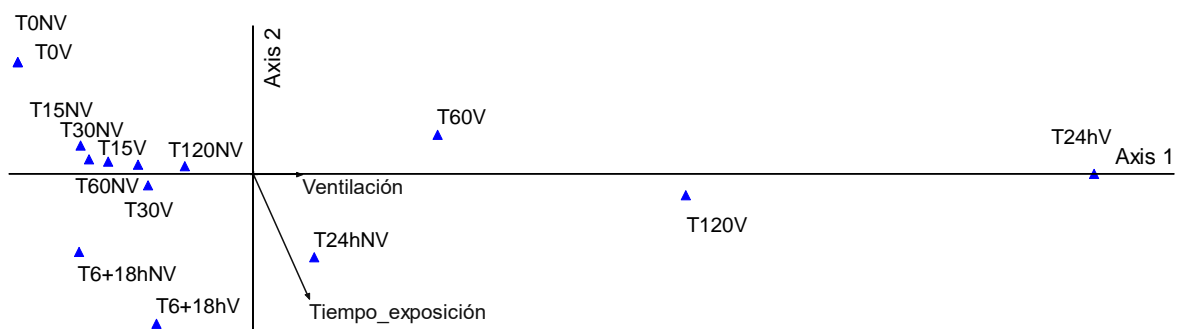


Figura. 11. Análisis de escalamiento no-métrico (NMS) del efecto de la ionización sobre la viabilidad celular en función del tiempo de exposición y de la ventilación. T0, T15, T30, T60, T120, T24 y T6+18H tiempos de exposición de 0, 15, 30, 60, 120 minutos y 24 horas y 6 horas de incubación más 18 horas de exposición, respectivamente. NV: no ventilación, V: ventilación.

Además, hay que mencionar la distinta capacidad de resistencia de las bacterias frente a la ionización. Es posible que las diferencias en la presencia de mecanismos de resistencia y la capacidad de formación de esporas sean responsables del diferente grado de sensibilidad entre estas bacterias. Además, el tipo de pared celular se presenta como un elemento importante frente a la ionización, variando la capacidad higienizante en función de la velocidad de arrastre de la ionización. En general, la pared celular de las bacterias Gram positivas representa la primera y principal línea de defensa contra diferentes amenazas ambientales, es por ello que es esperable que la actividad bactericida de la ionización sea menor en estas bacterias respecto a las Gram negativas (Wolf et al., 2012). Los distintos microorganismos Gram positivos estudiados presentan distintos grados de sensibilidad a la ionización emitida por el prototipo ensayado y depende a su vez de las condiciones de ventilación, lo que sugiere que las distintas características fisiológicas y genéticas de cada tipo de bacteria puede determinar su sensibilidad al estrés aplicado (Johnson and Hug, 2019).

De forma específica, *B. subtilis* se caracteriza por la presencia de diferentes elementos genéticos que lo protegen frente a diferentes estreses celulares debido a una imbricada red de respuesta al estrés de la envoltura celular (CESR) que incluye diferentes factores  $\sigma$  alternativos y multitud de sistemas de dos componentes (Radeck et al., 2017), lo que concuerda con la escasa reducción de la viabilidad celular obtenida para este microorganismo cuando se somete a la ionización sin ventilación. De forma similar, *S. aureus* es capaz de desarrollar distintos mecanismos de resistencia frente a diferentes estreses abióticos, lo que resultaría en una mayor resistencia al estrés respecto a lo esperado (Cebrián et al., 2010), tal como indican los resultados obtenidos en este estudio en condiciones de no arrastre de aire. De especial relevancia en la respuesta al estrés en *S. aureus* es la inducción de múltiples proteínas (respuesta SOS) que permiten reparar el ADN dañado ante condiciones de estrés, generando una mayor resistencia a distintos estrés o con mejor adaptación a un medioambiente hostil en esta población (Ma et al., 2019). Por otra parte, el aumento de la expresión de la proteína Usp (Universal Stress Protein) se ha visto como uno de los principales mecanismos de repuesta al estrés de *L. innocua* frente a diferentes estreses medioambientales (Tremonte et al., 2016) junto a otros mecanismos de defensa específicos tales como la inducción de la expresión de las proteínas del complejo F1F0-ATPasa, la arginina desaminasa (ADI) y de las vías de la glutamato descarboxilasa (GAD) que esta bacteria puede emplear para mitigar los daños celulares producidos cuando experimenta un determinado estrés fisiológico (Karatzas et al., 2012; Ryan et al., 2009). Si bien, la drástica reducción de la viabilidad de este microorganismo cuando se somete a la acción higienizante del prototipo independientemente de la ventilación sugiere que tales mecanismos de defensa no son lo suficientemente útiles para proteger a la célula del daño causado por la ionización. Por último, hay que tener en cuenta que la inactivación observada para *E. coli* respecto a los Gram positivos es especialmente relevante en tiempos de exposición cortos tanto en condiciones de ventilación como de no ventilación, lo que concuerda con el elevado grado de sensibilidad de *E. coli* frente a diferentes estreses osmóticos debido a su pared celular más delgada respecto a bacterias Gram positivas (Van Grieken et al., 2010; Mai-Prochnow et al., 2016).

Como ya se indicó anteriormente, *B. subtilis* es un microorganismo esporulado, en el que la formación de esporas se asocia frecuentemente a la presencia de agentes hostiles en el medioambiente (Petruk et al., 2018), produciéndose las formas de resistencia con capacidad para resistir una amplia gama de estreses, tales como altas temperaturas, deshidratación, ausencia de nutrientes y presencia de sustancias químicas tóxicas (Khanna et al., 2019). De este modo, una vez cesa el estrés, las esporas germinan produciendo nuevas células vegetativas tras la exposición a la condición adversa, por lo que la eficiencia de la ionización sería menor en estas bacterias con capacidad para producir esporas respecto a las no esporuladas. Hay que indicar que la ausencia de ventilación la capacidad higienizante del dispositivo ionizante es limitada (máxima reducción de la viabilidad celular del 10%). Es por ello que el efecto higienizante sería limitado sobre las formas de resistencia en condiciones de no ventilación y podría ser más potente sobre bacterias esporuladas cuando se emplean ciclos ionización que permitan la germinación de la spora, dando lugar a nuevas formas vegetativas que se someten a un



nuevo ciclo de ionización. Sin embargo, hay que indicar que a pesar de la capacidad de *B. subtilis* de producir esporas, la ionización aplicada en corriente de aire reduce considerablemente la capacidad de sobrevivir de esta bacteria ya que no se recupera la población bacteriana tras la incubación de las placas ionizadas cuando además se someten a una corriente de aire. Esto sugiere que tanto la capacidad de producir esporas como su germinación se inhiben fuertemente tras la exposición a la ionización con ventilación.

Por otra parte, *S. aureus* es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, destacando que es el agente etiológico bacteriano causante de infecciones bacterianas transmitidas por alimentos más común (Ding et al., 2016). Este patógeno humano puede causar diversos grados de enfermedad, desde casos leves hasta potencialmente mortales y su resistencia a los distintos antibióticos es particularmente preocupante en el ámbito sanitario, destacando las cepas resistentes a la penicilina y las resistentes a meticilina (Lee et al., 2018). De manera similar, *L. monocytogenes* es también un patógeno transmitido por los alimentos, que causa enfermedades graves en personas inmunodeprimidas. De hecho, aunque la prevalencia de la infección es reducida, (la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria describió menos de 2500 casos de listeriosis en el año 2016 en Europa), las enfermedades resultan en una elevada mortalidad (superior al 10% de las infecciones) (EFSA, 2017). Por tanto, las listeriosis causadas por alimentos contaminados son un grave problema de salud pública debido a la alta mortalidad asociada a esta bacteria (da Silva et al., 2019). Además, la infección por *L. monocytogenes* puede ocurrir por el consumo de alimentos contaminados con un número bajo de células (Buchanan et al., 2107).

Además, destacar que si bien *E. coli* es una bacteria común de la microbiota comensal, existen distintas cepas con alta capacidad patogénica como es el caso de la cepa *E. coli* O157:H7 que es ampliamente transmitida a través de alimentos contaminados (Stratakos et al., 2018). Estas cepas patógenas debido a su amplia difusión, tolerancia a algunos tratamientos físicos y químicos higienizantes y la gravedad de la enfermedad y a que a dosis bajas del microorganismo pueden causar infección hacen que la bacteria *E. coli* pueda ser un importante patógeno medioambiental (Beneduce et al., 2003). Por tanto, el efecto inhibitorio en la capacidad de crecimiento de estas bacterias producida por la ionización con el prototipo ensayado tanto en condiciones de ventilación como en ausencia de la misma resulta en una herramienta potencialmente útil para prevenir infecciones por estos importantes patógenos humanos.

Finalmente hay que indicar que frecuentemente la capacidad bactericida de diferentes productos higienizantes se ve comprometida cuando las bacterias se encuentran adheridas a la superficie (Banach et al., 2015). Es por ello, que a pesar de que la capacidad de reducción de la viabilidad celular en la bacteria empleada (*E. coli* GY36) es menor en células adheridas a membranas que en las crecidas directamente en un medio de cultivo, la capacidad estadísticamente significativa de reducir las poblaciones microbianas de *E. coli* adheridas a superficies sólidas respecto al control no ionizado convierte al prototipo empleado en un sistema eficaz para reducir la presencia de células adheridas a superficies sólidas.

Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, la acción higienizante es estadísticamente superior cuando la ionización se somete a una potente ventilación mecánica, por lo que la combinación de la ionización y la ventilación mecánica se perfila como una herramienta útil en el control de estas bacterias. De este modo se alcanzan valores de inhibición del crecimiento celular promedios cercanos a una reducción del 50% de la población (valor promedio de la reducción del número de bacterias = 45%) a partir de 60 minutos de exposición a la ionización y en presencia de aireación, efecto higienizante superior a lo obtenido tras 24 horas de exposición en ausencia de ventilación (valor promedio reducción del número de bacterias = 37%).

#### **4. Determinación de la viabilidad de virus bacterianos sometidos a ionización combinada con ventilación mecánica**

Los virus bacterianos también denominados como bacteriófagos tienen la capacidad de infectar de manera específica bacterias y, posteriormente, lisar las células hospedadoras lo que resulta en la aparición de halos traslúcidos en la superficie de los cultivos en contacto con la partícula viral. La presencia de bacteriófagos se asocia ampliamente con la aparición y diseminación de resistencias a antibióticos (Colomer-Lluch et al., 2011). Por tanto, es necesario un control efectivo de estos virus para mitigar el fenómeno de la resistencia a antibióticos, el cual es cada vez más acuciante a nivel global al limitar la utilidad terapéutica de estas sustancias. Por otra parte, el uso de bacteriófagos como indicadores de la calidad virológica del agua está recomendado por la OMS (WHO, 2017). De manera específica, los bacteriófagos de enterobacterias se correlacionan ampliamente con la presencia de contaminantes en aguas fecales, por lo que un elevado número de estos virus es sinónimo de una elevada contaminación microbiológica de las mismas (Vargas, 1996). Es por ello necesario, junto a la capacidad de reducir la viabilidad de enterobacterias, disminuir la presencia de estos indicadores de contaminación fecal a la hora de evaluar la capacidad higienizante de un determinado sistema higienizante.

Para la determinación del efecto de la ionización sobre virus bacterianos descritos en la memoria inicial del proyecto, se empleó el fago P22 como agente infectivo y la bacteria *Salmonella* LT22 como sujeto huésped. El *Salmonella* virus P22 es un bacteriófago perteneciente a la familia *Podoviridae* que infecta principalmente a diferentes bacterias del género *Salmonella* spp. Su genoma está compuesto por ADN de doble hebra, presentando una cola corta no contráctil a la que se asocian 6 espículas (McNulty et al., 2018). El bacteriófago P22 emplea el LPS de *Salmonella* como receptores y se adsorbe de forma irreversible al antígeno O, tras diferentes procesos bioquímicos se produce la salida del ADN viral al citoplasma bacteriano y finalmente dar paso a la expulsión de la cápside del virus, concluyéndose de esta forma el ciclo de infección (López et al., 2021). Finalmente, el bacteriófago puede multiplicarse vía el ciclo lítico o entrar en un estado quiescente en la célula en el que la mayoría de los genes virales no se transcriben, lo que se denomina estado atemperado.

De este modo, el efecto de la ionización sobre la viabilidad del bacteriófago P22 se ha determinado tras 120 minutos de exposición al prototipo ionizante previa a su incubación

con *Salmonella* LT2. El método utilizado para la determinación de la actividad higienizante sobre los virus se determinó mediante la técnica de recuento en placa de los halos translúcidos aparecidos, siendo este método el más ampliamente utilizado para determinar la sensibilidad de los fagos a distintos tratamientos higienizantes (US-EPA, 2018). Para ello, se obtuvieron las partículas virales de un cultivo de *Salmonella* LT2 (D.O.<sub>600</sub> de 0.5) previamente infectado con el bacteriófago atemperado mediante su lisis con cloroformo. Posteriormente, 20 mL de distintas diluciones de partículas virales (diluciones  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  del cultivo del profago) se sometieron a la ionización. Seguidamente, se tomaron 100  $\mu$ L de la solución viral para su posterior infección de un cultivo de *Salmonella* LT2 sensible a lisis por el bacteriófago (100  $\mu$ L, D.O.<sub>600</sub> de 0.5) en un volumen final 5 mL de medio de cultivo Luria-Bertani semisólido (7.5 g/L agar-agar/L medio) en placas de Petri que contenían previamente 25 mL de medio sólido. Finalmente, se determinó el número de placas líticas (halos translúcidos) aparecidas tras 24 horas de incubación. De este modo se realizaron tres experimentos independientes empleándose en cada uno de ellos 8 repeticiones, tanto de la solución viral ionizada como en la solución viral control (no ionizada).

Los resultados se muestran en la figura 12, de acuerdo a los mismos se observaron un promedio de 95 placas líticas frente a 67 observadas en cada una de las placas de Petri ensayadas. Por tanto, estos experimentos indican que la ionización durante 120 minutos produce una reducción estadística significativa del número de placas líticas (valor promedio de reducción del número de placas líticas: 30%).

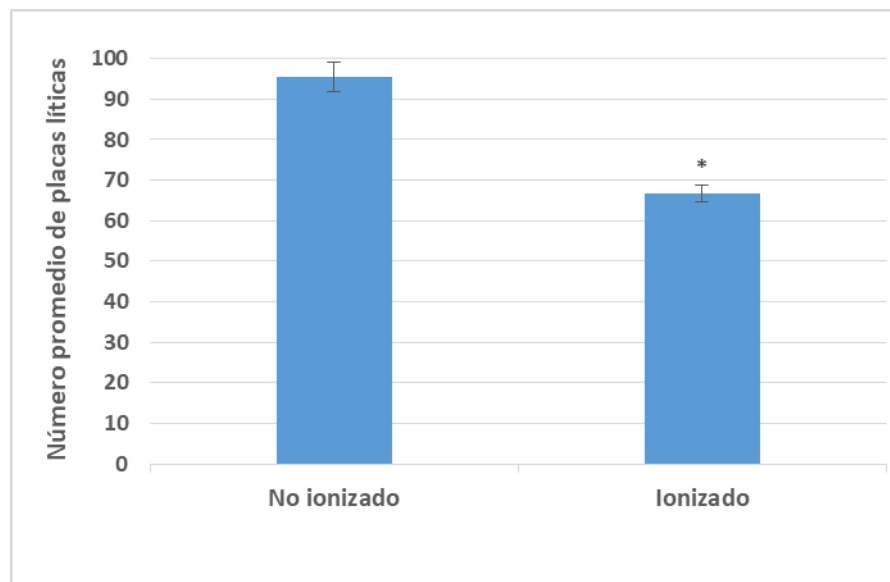


Figura 12. Número de halos translúcidos por placa Petri producidos por el bacteriófago P22 ionizado (120 minutos de exposición) y no ionizado en cultivos de *Salmonella* LT2. Un asterisco indica una reducción significativa del número de placas líticas observadas respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

## 5. Determinación de la viabilidad celular de cultivos fúngicos sometidos a ionización combinada con ventilación mecánica

Los ensayos realizados con cultivos de *Aspergillus niger* pertenecen a los experimentos con hongos filamentosos previstos en la memoria inicial del proyecto. La mayoría de los mohos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies, constituyendo sobre las mismas biopelículas (Villena y Gutiérrez-Correa, 2003). Los hongos pueden crecer en una gran variedad de sustratos y en un amplio rango de pH, actividad del agua y temperatura. Debido a esta gran capacidad de adaptación, junto a su capacidad de penetración en tejidos vivos, estos microorganismos son los principales causantes del deterioro microbiano de frutas y sus productos derivados (Sautour et al., 2002). Además, alrededor de 300 hongos son agentes etiológicos de diferentes enfermedades en humanos (Person et al., 2010), de hecho la incidencia de infecciones fúngicas aumenta cada año a nivel mundial, observándose un mayor número de infecciones entre pacientes pertenecientes a grupos de alto riesgo (personas infectadas por el VIH, pacientes inmunodeprimidos o con trastornos hematológicos y pacientes con enfermedades crónicas). De manera específica, las infecciones debidas a diferentes especies de *Aspergillus* causan una morbilidad y mortalidad significativas, siendo principalmente debidas a *Aspergillus fumigatus*, seguido de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus terreus*. Además, *A. niger* puede producir la enfermedad respiratoria denominada aspergilosis, principalmente cuando se presenta en altas concentraciones en el aire (Person et al., 2010). Esta enfermedad se cree que afecta a más de 11 millones de personas en su formas alérgicas a nivel mundial, mientras que 3 millones de personas sufren su forma crónica y existen más de 300 000 casos de aspergilosis invasiva al año (Van Rhijn y Bromley, 2021). Por lo tanto, la presencia de estos mohos en determinados ambientes puede ser no deseable en multitud de ambientes tanto industriales y sanitarios como domésticos.

El efecto de la ionización sobre la viabilidad celular de *A. niger* se determinó en tiempos de 15, 30, 60, 120 minutos y 24 horas. Para ello, se tomaron fragmentos del micelio del hongo y se traspasaron a placas de Petri que contenían medio de cultivo Agar-Glucosa-Sabouraud (Sabouraud, 1896) en tres experimentos independientes empleándose en cada uno de ellos 8 repeticiones. La capacidad de crecimiento del hongo se determinó como el diámetro del micelio tras 24 horas de incubación a 30 °C.

De acuerdo a los resultados experimentales presentados en la figura 13, no existe una reducción significativa del crecimiento fúngico para ninguna de las condiciones de ionización ensayadas. De estos resultados podemos concluir que el moho *A. niger* es resistente a la ionización producida mediante el prototipo Airzone, lo que indica que la ionización emitida no tiene una amplia capacidad higienizante sobre el hongo modelo empleado. Por otra parte, el elevado grado de características comunes entre hongos y animales, principalmente el amplio número de genes con secuencias homólogas entre hongos y células humanas (Zeng et al., 2001), sugiere la ausencia de efectos nocivos de la ionización sobre células humanas y, por tanto, la carencia de efectos perjudiciales sobre la salud de los humanos.

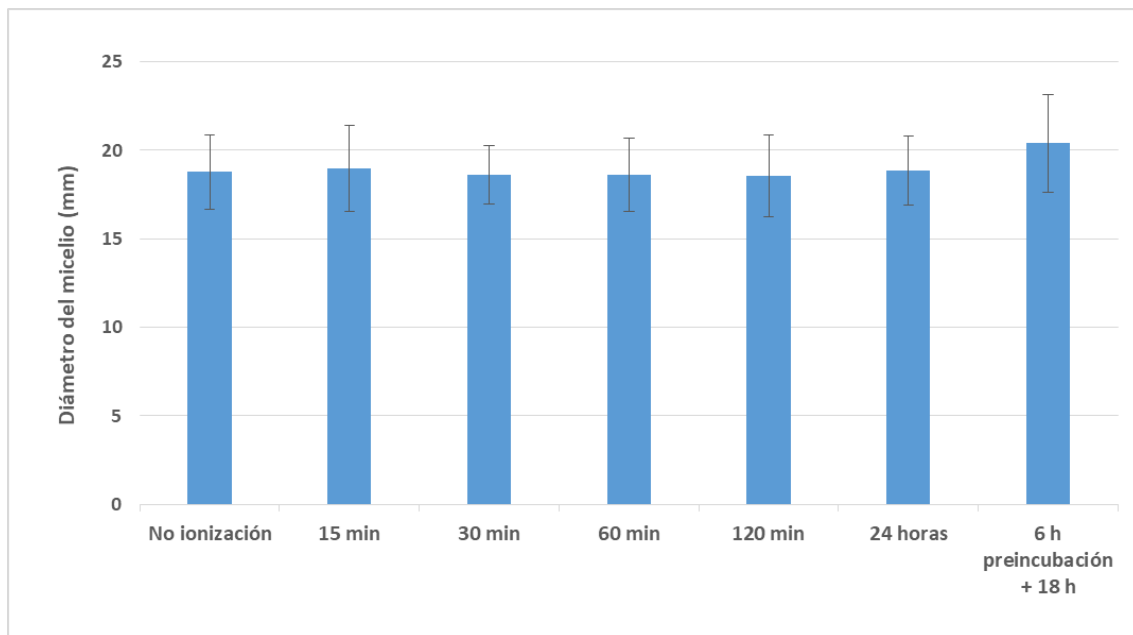


Figura 13. Diámetro del micelio en cultivos de *A. niger* sometidos a diferentes tiempos de ionización. Para un tiempo dado, un asterisco indica una reducción significativa de la supervivencia respecto al control (No ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes ( $N=8$ ).

## 6. Análisis de supervivencia, reproducción, fertilidad y crecimiento en el nematodo *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* es un nematodo no patógeno de vida libre, bacteriófago y sensible a los agentes tóxicos, patógenos y físicos en su entorno natural. Es un organismo hermafrodita que sólo muestra reproducción sexual en condiciones ambientales favorables, por encima de los 22-23 °C (cuando el 5% de la población nace macho). Por estas razones, en estos estudios podemos obtener resultados con una alta homogeneidad. Además, *C. elegans* se ha convertido en un organismo tipo para estudios genéticos (su secuencia genómica está completa), ecología, enfermedades, patogenicidad, etc. durante los últimos 50 años (Brenner, 1974; Wood, 1988; Köthe et al., 2003).

*C. elegans* se ha utilizado como organismo modelo para estudiar estreses bióticos y abióticos (especialmente organismos bacterianos), en lugar de organismos superiores como ratas de laboratorio inmunodeficientes. Este modelo ofrece muchas ventajas como obtener resultados rápidos (su ciclo completo de desarrollo toma de 7 a 10 días, ya que no sobrevive más de 2-3 semanas), fácil mantenimiento del cultivo (con un menor requerimiento espacial), se puede evaluar en diferentes estados (huevo para incubar, malformación, número de juveniles y adultos, mortalidad, etc.), etc. Además, estas pruebas generan resultados fiables y fácilmente reproducibles, con un valor estadístico superior (los ensayos se pueden realizar con un número elevado de individuos a la vez) (Brenner, 1974). Es importante evaluar más de una etapa, ya que a veces los resultados de una sola etapa pueden conducir a conclusiones erróneas, es por ello que se realizaron tres experimentos independientes.

Siguiendo los protocolos estandarizados en nuestro laboratorio, en esta investigación evaluamos la bioseguridad de las partículas ionizantes generadas por el dispositivo ionizante desarrollado por Airzone. Esta evaluación se basa en la evolución demográfica de los nematodos en cada condición, la comparación con los controles, así como el número final de individuos vivos (individuos jóvenes/preadultos y adultos) durante 7 días (inicio de la fase estacionaria para *C. elegans*). Del mismo modo, los valores al final del experimento nos permitirán evaluar la bioseguridad del dispositivo ensayado.

Ensayos previos realizados por Prasanth et al. (2016), demostraron que la exposición a agentes físicos, como las radiaciones UV-A reducen la viabilidad de *C. elegans* N2, siendo esta reducción proporcional al tiempo de exposición del nematodo a la radiación. En este estudio se demuestra que una exposición de 6 horas a radiación UV-A supuso una reducción significativa de la supervivencia tras una semana de seguimiento de la colonia (Prasanth et al., 2016).

Por tanto, el objetivo principal fue determinar si la exposición de partículas ionizantes que afectan al crecimiento bacteriano, tiene efecto sobre *C. elegans* N2, como modelo animal. Para alcanzar este objetivo se planteó analizar el número de adultos, de juveniles, de huevos, y de cadáveres de colonias del nematodo *C. elegans* N2.

El ensayo de bioseguridad se realizó de acuerdo con la recomendación de Vílchez et al. (2016), para ello se utilizó un cultivo de *C. elegans* con menos de una semana de edad (wild type N2-MNCN, CSIC, laboratorio nacional español de referencia en nematodos) en placas PDA (Potato Dextrose Agar, BD Difco, Catalog #213300) con *Escherichia coli* OP50 como alimento.

Las condiciones de cultivo fueron de 21°C excepto durante el periodo de exposición a partículas ionizantes, cuando 10 placas de cultivo permanecieron a temperatura ambiente controlada a 18°C±5°C, permaneciendo las placas destapadas en una cámara de bioseguridad durante el tiempo de exposición a las partículas ionizantes (24 horas). Como control se emplearon otras 10 placas incubadas en otra cámara de bioseguridad sin exposición al dispositivo. Tras el periodo de exposición, las placas se sellaron y se incubaron en una cámara criofrigostática (Medilow, Selecta) a 21 °C hasta el final del ensayo (7 días, 168 horas). Para estos ensayos, se añadieron a cada placa de PDA 100 µL de una suspensión bacteriana de *E. coli* OP50 que contenía 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU/ml.

Se determinó el número de huevos, juveniles/preadultos, adultos y muertos en cada una de las 10 placas cada 24 horas durante 3 experimentos consecutivos diferentes en ambas condiciones durante 96 horas. Con estos valores se analizó la evolución demográfica de la población incubada en cada condición. Después de siete días de ensayo (168 horas), se recolectaron nematodos de todas las placas de cada cepa y se determinó el número de individuos jóvenes/preadultos y adultos conjuntamente. Estos valores proporcionaron un número final de individuos útiles en cada población expuesta a cada condición.

### Efecto de la ionización sobre la ovoposición

Como era de esperar, *C. elegans* depositó una gran cantidad de huevos (21 huevos/placa) a las 72 h cuando se alimentó con *E. coli* OP50 en ausencia de dispositivo. Mientras que el número de huevos depositados por *C. elegans* en presencia del dispositivo Airzone resultó en un aumento estadísticamente no significativo (32 huevos/placa). Este valor nos indica que no existe un efecto sobre la fertilidad de los nematodos por la exposición al dispositivo, aunque parece generar cierto efecto que puede venir provocado por un mayor estrés que conduzca a una ovoposición temprana por parte de *C. elegans* en respuesta a la ionización provocada por el dispositivo Airzone (Figura 14, Tabla 7).

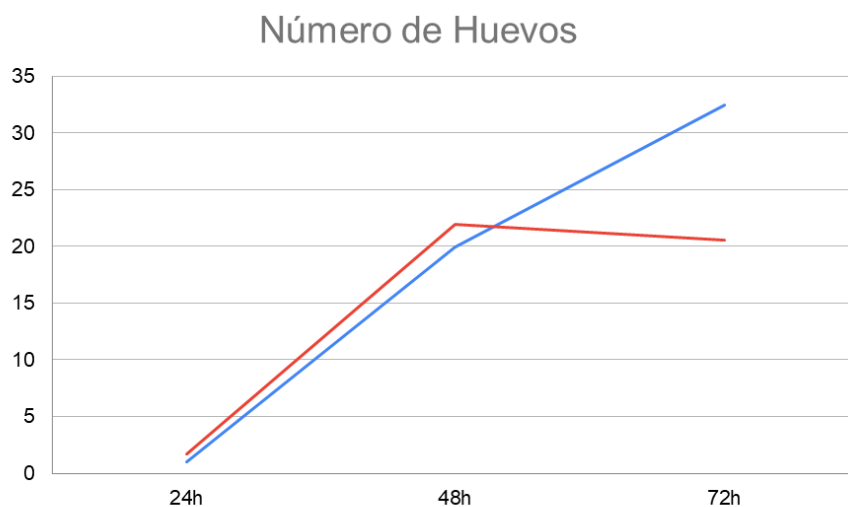


Figura 14. Número de huevos observados en ausencia de tratamiento con dispositivo Airzone (en rojo) y en presencia del mismo dispositivo (azul) a lo largo de 72 h de experimento. No se representan los datos correspondientes a 96 horas dado que el alto número de huevos los hacía incontables.

### Efecto de la ionización sobre formas juveniles y preadultas

En el caso de las formas juveniles y preadultos (Figura 15, Tabla 7), el número de individuos fue similar a lo largo de todo el experimento, independientemente de la presencia de dispositivo ionizador, con un número de alrededor de 8 juveniles por placa a las 48 horas. Sin embargo, a partir de las 72 horas el número de individuos jóvenes/preadultos fue de 33 por placa en el caso de placas no expuestas a ionización, mientras que este número fue ligeramente superior (43 nematodos juveniles/placa) en el caso de nematodos expuestos a la ionización. Este hecho concuerda con la mayor ovoposición a las 72 h observada en las colonias de nematodos incubadas en presencia del dispositivo Airzone.

Estos valores sugieren que no existe un efecto perjudicial en la viabilidad de los huevos depositados por los nematodos por el hecho de haber sido expuestos al ionizador.

Tabla 7. Número de huevos, formas juveniles, adultos y cadáveres observados en ausencia de tratamiento con dispositivo Airzone y en presencia del mismo dispositivo a lo largo de 168 h de experimento. Para un tiempo y forma dados, distintas letras indican una supervivencia estadísticamente diferente respecto al control (no ionización) de acuerdo test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Se muestran los datos de tres experimentos independientes (N=8).

		Huevos	Juveniles	Adultos	Cadáveres
24h	No Ionizado	2 a	3 a	3 a	0 a
	Ionizado	1 a	4 a	3 a	0 a
48h	No Ionizado	22 a	12 a	6 a	1 a
	Ionizado	20 a	11 a	5 a	0 a
72h	No Ionizado	21 a	46 a	16 a	1 a
	Ionizado	32 a	46 a	14 a	1 a
96h	No Ionizado	2 a	33 a	57 b	2 a
	Ionizado	5 a	43 a	117 a	2 a
168h	No Ionizado	No determinado	No determinado	923 b	No determinado
	Ionizado	No determinado	No determinado	1478 a	No determinado

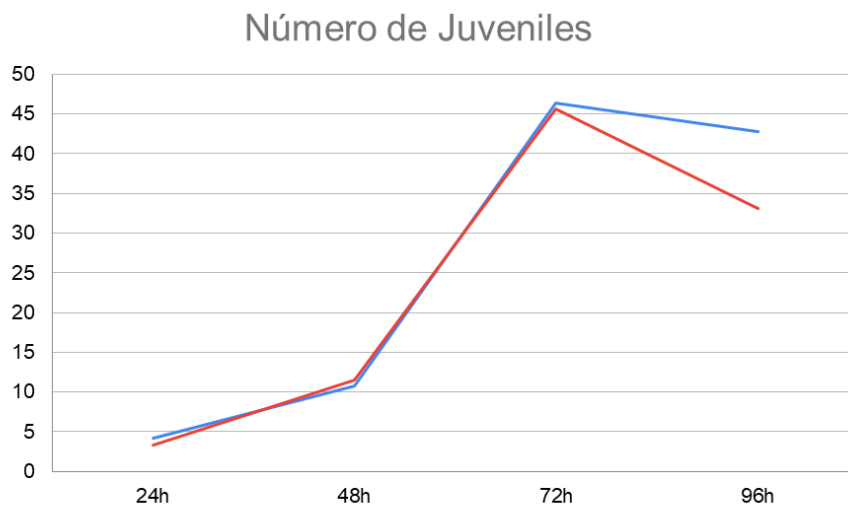


Figura 15. Número de formas juveniles observadas en ausencia de tratamiento con dispositivo Airzone (en rojo) y en presencia del mismo dispositivo (azul) a lo largo de 96 h de experimento.

### Efecto de la ionización sobre formas adultas

El número de individuos adultos fue similar en ambas condiciones de experimento hasta las primeras 72 horas (Figura 16, Tabla 7). Sin embargo, a las 96 horas, se observó un



aumento significativo en el número de individuos cuando los nematodos habían sido expuestos durante 24 h al ionizador (117 adultos/placa), frente a lo determinado en ausencia de ionización (57 adultos/placa). Esto podría ser debido al aumento en el número de huevos y formas juveniles ya descrito para estas placas.

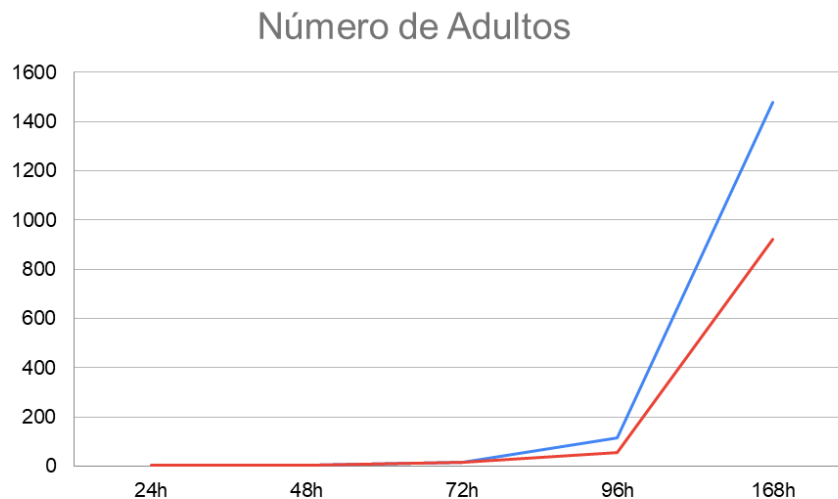


Figura 16. Número de Adultos observados en ausencia de tratamiento con dispositivo Airzone (en rojo) y en presencia del mismo dispositivo (azul) a lo largo de 168 h de experimento.

Por otra parte, el número de ejemplares adultos por placa a punto final (7 días, 168 horas) fue superior a 900 en ambas condiciones ensayadas (Figura 16, Tabla 7), lo que se considera como una población normal para el último punto de muestreo. En el caso de las muestras incubadas en presencia del dispositivo Airzone observamos un número significativamente superior (1.478 adultos/placa) que el determinado en las muestras no incubadas con dispositivo, en las que el número de adultos por placa fue de 923 adultos/placa. Nuevamente, las diferencias en el número de adultos observados vendrían dadas por la mayor puesta de huevos y que por lo tanto ni las formas juveniles, ni los adultos se han visto afectados en su capacidad de desarrollo por parte de estos tratamientos.

### Determinación del número de cadáveres

El número de cadáveres es indicativo del potencial efecto pernicioso que pueda tener un tratamiento particular a corto plazo. En los ensayos realizados, los nematodos muertos observados a lo largo de las curvas de los tres experimentos con y sin exposición al dispositivo Airzone, fueron similares (Figura 17, Tabla 7). Si bien, este número fue ligeramente inferior en el caso de los nematodos expuestos al tratamiento con el dispositivo Airzone, lo que viene probablemente dado, por el mayor número de individuos que se observan a estos tiempos, propio del crecimiento poblacional.

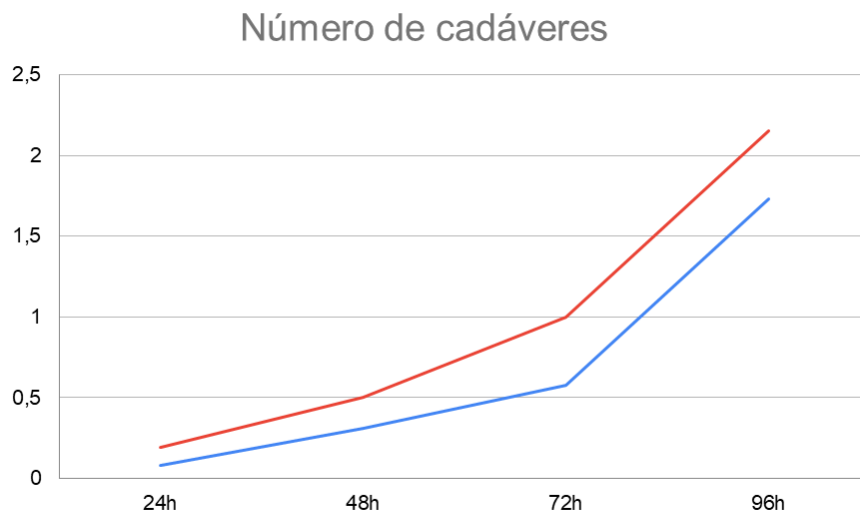


Figura 17. Número de cadáveres observados en ausencia de tratamiento con dispositivo Airzone (en rojo) y en presencia del mismo dispositivo (azul) a lo largo de 96 h de experimento

### **Determinación del papel potencialmente perjudicial para la salud de los humanos de la ionización**

Para deducir si determinados tratamientos son potencialmente perjudiciales para la salud de los humanos, se puede recurrir a modelos animales sencillos como son los basados en *C. elegans*. Anteriormente se ha utilizado este modelo para establecer el daño provocado por la radiación UV-A (Prasanth, et al., 2017). En el caso de que el tratamiento presente un potencial efecto perjudicial para la salud de los nematodos, se observaría un efecto sobre el número de huevos, el número de juveniles y preadultos, en el de adultos, así como un aumento en el número de cadáveres. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos indicar que los valores observados en todos estos parámetros han sido semejantes en los tres ensayos realizados y que coinciden con los que se observan en este tipo de ensayos, lo que nos indica que el método empleado es válido y que podemos confiar en los resultados obtenidos.

Por otra parte, tras analizar el número total de ejemplares recuperados a la semana de ensayo, concluimos que los valores obtenidos indican que existió un número de individuos superior cuando los nematodos han sido expuestos al tratamiento con el dispositivo Airzone. En contrapartida, el número de cadáveres es menor cuando los nematodos se han sometido a tratamiento con el dispositivo Airzone. Estos resultados obtenidos apoyan que la evolución demográfica se corresponde con claridad con un patrón en el que el efecto del dispositivo Airzone no es perjudicial en las condiciones ensayadas, el cual ha demostrado tener una capacidad higienizante para distintos cultivos microbianos. Podría ser conveniente analizar el efecto del tratamiento sobre la colonia en periodos de tiempo superiores, como puedan ser de una semana, para descartar también un potencial efecto a largo plazo sobre este tipo de organismos. Análogamente, este tipo de ensayos pueden complementarse con estudios sobre otros organismos modelo, como pueda ser el efecto sobre insectos beneficiosos como *Adalia bipunctata* (mariquita de dos

puntos) o *Chrisoperla carnae* (Crisopa) (Ruiz-Díez et al., 2003; Navas et al., 2007; Vilchez et al., 2016).

## Conclusiones

De acuerdo a los resultados de los ensayos realizados y tras el procesamiento, interpretación y análisis de los mismos, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.- La ionización mediante el prototipo Airzone empleado es una herramienta útil para reducir la carga bacteriana del ambiente tanto en células dispersas en aerosoles como en las adheridas a superficies
- 2.- Este sistema puede ser empleado como un método higienizante alternativo a otros métodos desinfectantes en diferentes espacios, actuando tanto sobre bacterias comensales como en importantes patógenos humanos.
- 3.- La ionización junto a una fuerte corriente de aire resulta en un aumento considerable de la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas.
- 4.- La exposición a la ionización a partir de 60 minutos en presencia de corriente de aire permite alcanzar una capacidad higienizante promedia superior a la obtenida cuando se aplica durante 24 horas sin ventilación mecánica en diversos cultivos bacterianos.
- 5.- La ionización durante 120 minutos junto a una fuerte corriente de aire resulta en una considerable capacidad para inhibir la viabilidad y el desarrollo del ciclo lítico de bacteriófagos de enterobacterias.
- 6.- No existe un efecto sobre la capacidad de crecimiento de hongos tipo moho frente a ninguno de los tiempos de ionización ensayados con el prototipo.
- 4.- El tratamiento con el dispositivo Airzone genera un ligero aumento en el número de huevos depositados por una colonia de *C. elegans* N2.
- 5.- El aumento en el número de huevos depositados por *C. elegans* cuando la colonia se ha incubado en presencia del dispositivo, se traduce en un mayor número de juveniles y de adultos.
- 6.- La incubación de nematodos en presencia del dispositivo *C. elegans* reduce la mortalidad de los mismos.



Firmado:

Jesús González López

Catedrático de Universidad

## Referencias:

- Banach, J.L., Sampers, I., Van Haute, S., der Fels-Klerx, V. (2015). Effect of disinfectants on preventing the cross-contamination of pathogens in fresh produce washing water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 8658-8677.
- Beneduce, L., Spano, G., Massa, S. (2003). *Escherichia coli* 0157: H7 general characteristics, isolation and identification techniques. *Annals of Microbiology*, 53, 511-528.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62, 293-300.
- Blakely, L.M., Steward, F.C. (1964). Growth and organized development of cultured cells. V. The growth of colonies from free cells on nutrient agar. *American Journal of Botany*, 51, 780-791.
- Brenner, S. (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, 71-94.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1-13.
- Cardona, S.T., Wopperer, J., Eberl, L., Valvano, M.A. (2005). Diverse pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex strains in the *Caenorhabditis elegans* host model. *FEMS Microbiology Letters*, 250, 97-104.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., Mañas, P. (2010). Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 26-33.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS one*, 6, e17549.
- da Silva, A.C.M., de Oliveira Pena, P., Júnior, S.B.P., do Nascimento, M.D.S. (2019). Effect of different dry aging temperatures on *Listeria innocua* as surrogate for *Listeria monocytogenes*. *Meat Science*, 157, 107884.
- Ding, T., Yu, Y.Y., Schaffner, D.W., Chen, S.G., Ye, X. Q., Liu, D.H. (2016). Farm to consumption risk assessment for *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in fluid milk in China. *Food Control*, 59, 636-643.
- EFSA (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15.
- Fernandez-Garayzabal, J.F., Delgado, C., Blanco, M., Vazquez-Boland, J.A., Briones, V., Suárez, G., Dominguez, L. (1992). Role of potassium tellurite and brain heart infusion in expression of the hemolytic phenotype of *Listeria* spp. on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 434-438.

Fetsch, A., Johler, S. (2018). *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 88-96.

Jadhav, U.U., Lahoti, M., Chen, Z., Qiu, J., Cao, B., Yang, E.H. (2018). Viability of bacterial spores and crack healing in bacteria-containing geopolymer. *Construction and Building Materials*, 169, 716-723.

Johnson, L.A., Hug, L.. (2019). Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 93-102.

Karatzas, K.A.G., Suur, L., O'Byrne, C.P. (2012). Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3571-3579.

Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Pogliano, K. (2020). Shaping an endospore: architectural transformations during *Bacillus subtilis* sporulation. *Annual Review of Microbiology*, 74, 361-386.

Kim, K., He, Y., Xiong, X., Ehrlich, A., Li, X., Raybould, H., et al. (2019). Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* influenced intestinal health of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *E. coli*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, 1-12.

Köthe, M., Antl, M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., Steinmetz, I., Eberl, L. (2003). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. *Cellular Microbiology*, 5, 343-351.

Kovács, Á.T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27, 724-725.

Kunkle, R.A., Kinyon, J. (1988). Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2357-2360.

Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 1-23.

López, N. R., Zúñiga, A.P.A., Panduro, M.H.R. (2021). Uso del fago P22 como alternativa terapèutica en veterinaria para *Salmonella* spp en Colombia. *Biociencias*, 5, 27-49.

Ma, Y., Lan, G., Li, C., Cambaza, E.M., Liu, D., Ye, X., et al. (2019). Stress tolerance of *Staphylococcus aureus* with different antibiotic resistance profiles. *Microbial Pathogenesis*, 133, 103549.

McNulty, R., Cardone, G., Gilcrease, E.B., Baker, T.S., Casjens, S.R., Johnson, J.E. (2018). Cryo-EM elucidation of the structure of bacteriophage P22 virions after genome release. *Biophysical journal*, 114, 1295-1301.

Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., Murphy, A.B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6, 1-11.

Milillo, S.R., Friedly, E.C., Saldivar, J.C., Muthaiyan, A., O'bryan, C., Crandall, P.G., et al. (2012). A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 712-725.

Navas, A., Cobas, G., Talavera, M., Ayala, J.A., López, J.A., Martínez, J.L. (2007). Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 13728-13731.

Person, A. K., Chudgar, S. M., Norton, B. L., Tong, B. C., Stout, J. E. (2010). *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 834.

Petruk, G., Donadio, G., Lanzilli, M., Istatico, R., Monti, D.M. (2018). Alternative use of *Bacillus subtilis* spores: protection against environmental oxidative stress in human normal keratinocytes. *Scientific Reports*, 8, 1-11.

Poirel, L., Madec, J.Y., Lupo, A., Schink, A.K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6, 6-4.

Stewart, G.C. (2005). *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*, 273-284.

Prasanth, M.I., Santoshram, G.S., Bhaskar, J.P., Balamurugan K. (2016). Ultraviolet-A triggers photoaging in model nematode *Caenorhabditis elegans* in a DAF-16 dependent pathway. *Age*, 38, 1-13.

Radeck, J., Fritz, G., Mascher, T. (2017). The cell envelope stress response of *Bacillus subtilis*: from static signaling devices to dynamic regulatory network. *Current Genetics*, 63, 79-90.

Ruiz-Díez, B., Sánchez, P., Baquero, F., Martínez, J.L., Navas, A. (2003). Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans-Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. *Journal of Theoretical Biology*, 225, 469-476.

Ryan, S., Begley, M., Gahan, C.G., Hill, C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environmental Microbiology*, 11, 432-445.

Sabouraud R (1896) La question des teignes. *Ann Dermatol Venereol (series 3)* ,:87–135

Sautour, M., Soares Mansur, C., Divies, C., Bensoussan, M., Dantigny, P. (2002). Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 311-315.

- Sinclair, R.G., Rose, J.B., Hashsham, S.A., Gerba, C.P., Haas, C.N. (2012). Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1969-1977.
- Stratakos, A.C., Sima, F., Ward, P., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L., et al. (2018). The in vitro effect of carvacrol, a food additive, on the pathogenicity of O157 and non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Food Control*, 84, 290-296.
- Tremonte, P., Succi, M., Coppola, R., Sorrentino, E., Tipaldi, L., Picariello, G., et al. (2016). Homology-based modeling of universal stress protein from *Listeria innocua* up-regulated under acid stress conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1998.
- Touchon, M., Perrin, A., De Sousa, J.A.M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C.L., et al. (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 16, e1008866.
- US-EPA Office of Water (2018). Method 1642: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Recreational Waters and Wastewater by Ultrafiltration (UF) and Single Agar Layer (SAL) Procedure; EPA 820-R-18-001; US-EPA Office of Water: Washington, DC, USA.
- Van Grieken, R., Marugán, J., Pablos, C., Furones, L., López, A. (2010). Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive *E. faecalis* and Gram-negative *E. coli* faecal contamination indicator microorganisms. *Applied Catalysis B: Environmental*, 100, 212-220.
- Van Rhijn, N., Bromley, M. (2021). The consequences of our changing environment on life threatening and debilitating fungal diseases in humans. *Journal of Fungi*, 7, 367.
- Vargas, C. (1996). Reunión regional sobre calidad del agua potable. Guías de la OMS para la calidad de agua de bebida. Aspectos microbiológicos.
- Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista peruana de Biología*, 10, 78-87.
- World Health Organization (2017). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first. Ginebra, Suiza, 631.
- Wolf, D., Domínguez-Cuevas, P., Daniel, R.A., Mascher, T. (2012). Cell envelope stress response in cell wall-deficient L-forms of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 5907-5915.
- Wood, W.B. (1988). Chapter 1: Introduction to *C. elegans* biology. *The Nematode Caenorhabditis elegans*, 1-16.
- Zeng, Q., Morales, A. J., Cottarel, G. (2001). Fungi and humans: closer than you think. *TRENDS in Genetics*, 17, 682-684.