

# ESTUDIO PARA COMPROBAR LA EFICACIA DEL PODER BACTERICIDA Y VIRICIDA DEL AGUA OZONIZADA

Solicitado por: **ECOASTUR**

José María Portero Coto

C/ Doctor Fleming, 11 – 3ºA

33930 – La Felguera – Langreo (Asturias)

**Equipo de Ozono: ECO OZONO WATER INDUSTRIAL - ECOASTUR**

Modelos: P01 y 02



**Fundamentación, interpretación de resultados y recomendaciones:**

**Sara Aguirre Bastarrica**

Licenciada en medicina Veterinaria – Especialista en Seguridad Alimentaria

(Nº Colegiada 33/1616)

**inoQ<sup>ua</sup> Instituto de Salud Alimentaria** - Oviedo - Asturias

Realización del Estudio: **11/05/2020 a 26/05/2020**

# ÍNDICE

## ESTUDIO PARA COMPROBAR LA EFICACIA DEL PODER BACTERICIDA Y VIRICIDA DEL AGUA OZONIZADA

<b>1. Fundamentación y antecedentes .....</b>	<b>3</b>
¿Qué es el ozono? .....	3
Aplicaciones del ozono .....	3
Propiedades del agua ozonizada .....	4
Efectividad del agua ozonizada como limpiador, desodorizante y desinfectante.....	5
Uso del agua ozonizada como desinfectante y factores a tener en cuenta.....	7
Propiedades del agua ozonizada .....	8
<b>2. Objetivo .....</b>	<b>9</b>
<b>A. ENSAYO PODER BACTERICIDA .....</b>	<b>9</b>
<b>3. Método.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Procedimiento de ensayo.....</b>	<b>10</b>
Preparación de las muestras y tratamiento: .....	10
Preparación del inóculo e inoculación de las muestras: .....	10
Determinación de la concentración de ozono en el agua tratada .....	11
<b>5. Resultados.....</b>	<b>11</b>
<b>6. Interpretación .....</b>	<b>20</b>
<b>B. ENSAYO PODER VIRICIDA .....</b>	<b>20</b>
<b>7. Método.....</b>	<b>20</b>
<b>8. Resultados.....</b>	<b>20</b>
<b>9. Interpretación .....</b>	<b>20</b>
<b>RECOMENDACIONES GENERALES DE USO .....</b>	<b>21</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>22</b>
<b>Notas: .....</b>	<b>23</b>

## 1. Fundamentación y antecedentes

### ¿Qué es el ozono?

Desde el punto de vista químico, el ozono es una sustancia cuya molécula está compuesta por tres átomos de oxígeno ( $O_3$ ).

El ozono se produce cuando las moléculas de oxígeno ( $O_2$ ) son disociadas por medio de una fuente de energía produciendo átomos de oxígeno (O) que posteriormente chocan con una molécula de oxígeno ( $O_2$ ) para formar la molécula de ozono ( $O_3$ ) (Environmental Protection Agency [EPA], 1999).

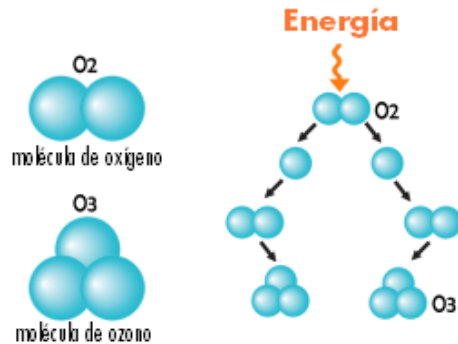


Figura 1: Formación de la molécula de ozono

### Aplicaciones del ozono

El ozono se viene utilizando desde hace muchos años en el **tratamiento de aguas como desinfectante primario**, tanto en aguas potables como residuales, permitiendo la eliminación de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos de las mismas. (OMS, 2008).

En la **Unión Europea** se regulan las condiciones de utilización del aire enriquecido con ozono para el **tratamiento de las aguas minerales naturales y de las aguas de manantial** a través de la Directiva 2003/40/CE de la Comisión, con el fin de separar elementos inestables como el hierro, el manganeso y el arsénico en las mismas.

**A nivel nacional**, el ozono se encuentra autorizado como coadyuvante en el **tratamiento de aguas potables** desde 1984 (Resolución de 23 de Abril de 1984 del Ministerio de Sanidad y Consumo) y reconocido como desinfectante en la potabilización de aguas tanto por el Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, como por la norma española UNE-EN 1278:2010 en vigor.

Asimismo, en la **industria alimentaria** se emplea en numerosos procesos tanto en fase gaseosa como en agua. Por ejemplo, como **desinfectante de superficies y utillaje** en muchos sectores (industria cárnica y láctea, sector pesquero, vinícola,...), para la **higienización del aire** con un efecto **desodorizante** adicional, para favorecer la **conservación de alimentos** durante su almacenamiento o para el tratamiento post-cosecha de frutas y verduras y un largo etcétera (Seminario, Acuña y Williams, 2010).

En el **Codex Alimentarius**, el ozono viene definido por tener un uso funcional en alimentos como **agente antimicrobiano y desinfectante**, tanto del agua destinada a consumo directo o del hielo como cuando se utiliza en el tratamiento o presentación del pescado, productos agrícolas y otros alimentos perecederos.

Desde 1982, la **FDA de los Estados Unidos** (Administración de Alimentos y Medicamentos) reconoció al ozono como Sustancia Reconocida Generalmente como Segura [Generally Recognized as Safe, (GRAS)] en la industria del agua embotellada. En 2001, esta misma organización aprobó al ozono como sustancia GRAS para el contacto directo con alimentos, lo que junto a otros factores de carácter técnico, económico y social ha permitido un incremento acelerado de la introducción del ozono en la industria alimentaria (Bataller, Santa Cruz y García, 2010).

El ozono suele reducir notablemente la flora microbiana en la superficie de los alimentos ya que su descomposición en la fase acuosa del alimento es rápida, por lo que su acción microbicida tendrá lugar principalmente en la superficie. (Aguayo, Gómez, Artés-Hernández, Artés, 2017).

En la **Unión Europea**, con la entrada en vigor del Reglamento (UE) n° 528/2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas, se está evaluando el ozono generado a partir de oxígeno como biocida para distintos usos, entre otros para la desinfección de superficies en contacto con productos alimenticios (<https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/biocidal-active-substances/-/disas/factsheet/1783/PT04>).

En **medicina** se utiliza para **desinfectar quirófanos y otras salas** (Parzanese, M, 2012) estando regulado su uso en España por la “Norma española UNE 400-201-94: Generadores de ozono. Tratamiento de aire. Seguridad química”, basada en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud.

También se utiliza para el tratamiento de distintas patologías. En **odontología** se ha observado la efectividad de la aplicación de ozono gaseoso en implantes, debido a que reducen las bacterias presentes sobre el titanio y la zirconia o en el tratamiento de caries, prostodoncia y periodontitis, por su **acción antimicrobiana y antifúngica** (Malik et al. 2018 citado en García – Chamizo et al., 2020).

### Propiedades del agua ozonizada

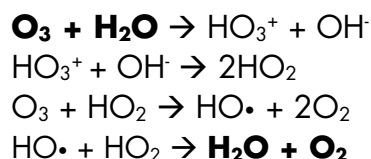
Las propiedades del agua ozonizada se deben tanto a la acción de la molécula de ozono como a la de los radicales que se forman por su descomposición en el agua (perhidróxilo (HO<sub>2</sub>) y del hidróxido (OH)), los cuales presentan una gran capacidad de oxidación desempeñando un papel muy activo en el proceso de desinfección (EPA, 1999).

El potencial redox del ozono es -2,07 voltios, mientras que el del cloro es -1,36 voltios, lo que le hace más eficaz que éste en la eliminación del olor, sabor y color del agua, así como en la eliminación de bacterias, virus y otros microorganismos (Gordillo, 2013).

Especie	OH <sup>•</sup>	Ozono (O <sub>3</sub> )	HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Dióxido de cloro	Ácido hipocloroso	Cloro
<b>E° (V, 25°C)</b>	-2.80	-2.07	-1.70	-1.57	-1.49	-1.36

Tabla 1: Potenciales redox de algunos agentes oxidantes (Merck Index, 1989)

La formación de radicales libres tiene lugar de acuerdo con las siguientes reacciones (Del Barrio, 2015):



Como se puede observar, los últimos productos resultantes de esta cadena de reacciones químicas son agua y oxígeno, por lo que el uso del agua ozonizada no deja ningún tipo de residuo en el agua o en las superficies limpiadas y desinfectadas con el mismo.

### Efectividad del agua ozonizada como limpiador, desodorizante y desinfectante

El **poder limpiador** del agua ozonizada se debe a la capacidad que tiene de oxidar la materia orgánica e inorgánica y romper los dobles enlaces de las moléculas, lo que también juega un papel importante en la degradación de los colores procedentes de la materia orgánica (Tiwari et al., 2009 citado en Marín, 2016) como **blanqueante**.

Además, reacciona con los grupos  $\text{OH}^-$  de los anillos aromáticos y acelera el proceso de oxidación natural de los compuestos volátiles de la materia orgánica, de ahí su poder **desodorizante** (Gordillo, 2013).

El ozono actúa como **desinfectante** de amplio espectro siendo activo contra bacterias, hongos, virus, protozoos y esporas bacterianas y fúngicas. Este poder de inactivación es un proceso complejo que ataca a diversos constituyentes de la membrana, la pared y el contenido celular (por ejemplo, grasas insaturadas, enzimas y ácidos nucleicos) (Marín, 2016).

Clasificándose dentro de los agentes desinfectantes oxidantes, la capacidad germicida del ozono es veinte veces superior a la del ácido hipocloroso y el tiempo de contacto necesario para ejercer su acción es de minutos, aunque depende de la dosis aplicada (Domenech, 2004).

El ozono reacciona muy rápidamente frente a los patógenos ya que es tóxico para los mismos "per se", no como el cloro que necesita su disociación antes de que adquiera poder desinfectante. Así mismo, su dependencia a las condiciones medioambientales son menores que las de otros desinfectantes (Gordillo, 2013).

En el caso de los virus, los inactiva atacando a la proteína de la cápsida (en los bacteriofagos) para liberarla, actuando después sobre los ácidos nucleicos (Rodríguez, 2008).

Del mismo modo, se ha demostrado que tiene efectividad frente a los oocistos/ooquistes de algunos protozoos como *Cryptosporium parvum* o *Giardia* (Peeters et al., 1989 citado en Cepeda et al., 2012). Por este motivo, algunos autores han propuesto el uso de agua ozonizada a concentraciones de 2-3 ppm para la desinfección de fresas y frambuesas (Beuchat, 1998, citado en Cepeda et al., 2012).

En la siguiente tabla se muestran algunos de los microorganismos frente a los que se ha comprobado que el ozono es efectivo para su eliminación (Pérez, 2008):

Bacterias		Hongos	Virus
<i>Achromobacter</i>	<i>Nocardia corallina</i>	<i>Microsporon audoaini</i>	<i>Adenovirus</i>
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	<i>Phytomonas tumefaciens</i>	<i>Microsporon lenosum</i>	Bacteriophage
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Monilia albicans</i>	Coliphage
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Trichophyton</i>	Corona
<i>Bacillus megaterium</i> (esporas y vegetativa)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Mentagrophytes</i>	Coxsackie
<i>Bacillus mecentericus</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>Trichophyton purpureum</i>	Cytomegalovirus
<i>Bacillus paratyphosus</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<b>Esporas</b>	Echovirus
<i>Bacillus spores</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Epstein Barr
<i>Bacillus subtilis</i> (esporas y vegetativa)	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>	Flavivirus
<i>Clostridium tetani</i>	<i>Salmonella typhosa</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Toga
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Mucor racemosus A</i>	Hepatitis
<i>Eberthella typhosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Mucor racemosus B</i>	Influenza
<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Oospora lactis</i>	Orthomyxoviridae
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Paramyxoviridae
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Shigella paradynteriae</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Poliomielitis
<i>Legionella gormanii</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	Retroviridae (VIH)
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Spirillum rubrum</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	Rotavirus
<i>Legionella micdadeld</i>	<i>Staphylococcus albus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Syphilis
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>Algas</b>	Tobacco mosaic
<i>Leptospira canicola</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	Herpes (todos los tipos)
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Staphylococcus faecalis</i>	<b>Nemátodos</b>	Rhabdoviridae (Rabia)
<i>Micrococcus candidus</i>	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	Huevos	<b>Levaduras</b>
<i>Micrococcus sphaeroides</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<b>Protozoos</b>	<i>Candida</i> (todas las formas)
<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Paramecium</i> (patógenas y no patógenas)	Levadura de panadería
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<b>Parásitos</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Saccharomyces</i> var. <i>Ellipsoideus</i>
<i>Neisseria catarrhalis</i>	<i>Vibrio comma</i>	<i>Giardia lambia</i>	<i>Saccharomyces</i> sp.

Tabla 2: Algunos de los microorganismos que son eliminados por ozono

Además, el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) que se forma gracias a las reacciones que tienen lugar, cuando el ozono se combina con las moléculas de agua disociadas, contribuye a mejorar la acción desinfectante frente a bacterias y virus.

Según el informe técnico sobre "Prevención y control de la infección en el manejo de pacientes con COVID-19" del Ministerio de Sanidad de España se ha validado como procedimiento de limpieza y desinfección de superficies y espacios, las soluciones de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 0,5% dejándolas actuar durante un minuto, ya que existe evidencia de que los coronavirus se inactivan de esta manera.

## Uso del agua ozonizada como desinfectante y factores a tener en cuenta

En el caso del agua ozonizada, la eficacia del tratamiento desinfectante puede verse influenciada por diversos factores:

- Con el aumento de la **temperatura**, el ozono se va haciendo menos soluble y estable, pero la velocidad de reacción con el sustrato se incrementa (Bablon et al., 1991, citado en Aguayo et al., 2017). Diversos autores indican que variaciones de temperatura entre 0 y 37°C afectan relativamente poco a la eficacia desinfectante del ozono (Gordillo, 2013). De ahí que se recomiende su uso con agua fría.
- Aunque el efecto del **pH** es menor sobre el ozono que sobre otros desinfectantes, también se ve afectado por este factor. El pH básico aumenta la velocidad de descomposición del ozono en especies oxidantes que tienen reactividades diferentes con los constituyentes de los microorganismos. Sin embargo, la capacidad biocida del ozono se mantiene estable en un pH que esté comprendido entre 5,5 y 9,8 (Gordillo, 2013, Aguayo et al., 2017).

Según el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano en España, el pH del agua a la salida por el grifo del consumidor ha de estar entre 6,5 y 9,5. Por esto, el agua de la Red Pública que se someta a un proceso de ozonización, con el resto de factores en condiciones favorables, mantiene la mencionada capacidad desinfectante.

- Otro factor que puede interferir en la eficacia del ozono como desinfectante es la presencia de **materia orgánica**, la cual por lo general es fácilmente oxidable por el mismo (Gordillo, 2013).

La presencia de sustancias orgánicas compite con los microorganismos ya que al demandar ozono reducen la dosis eficaz del mismo. La sensibilidad de los microorganismos al ozono está profundamente afectada no sólo por la cantidad sino también por la naturaleza de la materia orgánica presente en el medio (Restaino et al., 1995, citado en Aguayo et al., 2017).

Los microorganismos pueden encontrarse asociados o ligados a materia orgánica suspendida en la disolución, dificultando la accesibilidad del ozono. El apropiado mezclado o turbulencia aumenta el contacto con las burbujas y la solubilización del ozono en el agua y, además, rompe los grupos de microorganismos (Perry y Yousef, 2011 citado en Aguayo et al., 2017). En esta línea, se ha demostrado que los lavados con agua ozonizada aplicados en duchas incrementan el efecto microbicida del ozono frente a la inmersión directa del producto en agua ozonizada, recomendándose además efectuar primero un prelavado para eliminar la materia orgánica y después la desinfección con agua ozonizada (Aguayo et al., 2010).

- En cuanto a la **concentración de ozono** presente en el agua, se considera que manteniendo una dosis de 0,4mg/L durante un tiempo no inferior a 4 minutos, asegura una desinfección del agua prácticamente total (por encima del 99,9%), obteniendo la inactivación de la mayoría de los microorganismos con dosificaciones y tiempo de contacto menores (Gordillo, 2013).

## Propiedades del agua ozonizada

A pesar de ser uno de los antioxidantes más potentes, debido a su rápida descomposición **no deja residuos** detectables en los productos tratados (Paris et al, 2003, Linton et al 2006, Rodoni, 2008, citado en Marín, 2016). Este hecho lo convierte en un limpiador desinfectante ideal para su uso sobre superficies en contacto con alimentos y en general en todos los sectores de la industria alimentaria.

El tiempo medio de vida del ozono en el agua es muy variable. Dependiendo de diversos factores (temperatura, pH, sustancias presentes en el agua, etc.) puede variar de 1 a 300 minutos. A igualdad de condiciones es más estable en agua que en aire (Gordillo, 2013). En agua destilada a 20°C, la **vida media** de ozono es aproximadamente de **20 a 30 minutos** (Khadre et al, 2001 citado en Marín, 2016).

Por esta razón, el agua ozonizada utilizada como desinfectante se debe renovar con frecuencia, para garantizar su eficacia.

En cuanto a su **efecto sobre los materiales**, el ozono no afecta a materiales resistentes a la corrosión (Paris et al, 2003, Linton et al 2006, Rodoni, 2008, citado en Marín, 2016), como el acero inoxidable (series 300), el aluminio anodizado, el vidrio, la cerámica o los plásticos como el Teflón (PTFE), el PVC o el polietileno. Sin embargo, se ha observado el envejecimiento de materiales como el caucho natural en exposiciones prolongadas (Maloney Technical Products, 2013 citado en García – Chamizo et al., 2020).

A nivel toxicológico, el **ozono disuelto en agua resulta completamente inocuo**, dado que su acción sobre la materia orgánica provoca su rápida descomposición. Únicamente en el caso de tratamientos a altas presión podría producirse la liberación de ozono al aire, apareciendo entonces en las superficies de intercambio agua-aire concentraciones que podrían considerarse peligrosas, pero los tratamientos convencionales no se realizan en estas condiciones (Pérez. 2008). Recordamos en este punto que tanto a nivel europeo como nacional está autorizado como desinfectante en la potabilización de aguas de consumo.

En cuando al **peróxido de hidrógeno** (agua oxigenada) contenido en el agua ozonizada, existen informes de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la seguridad del uso de soluciones acuosas a base de peróxido de hidrógeno al 23% de concentración para la desinfección de frutas y verduras que indican que no implica ningún riesgo para la salud del consumidor (AESAN, 2019).



# ESTUDIO PARA COMPROBAR LA EFICACIA DEL PODER BACTERICIDA Y VIRICIDA DEL AGUA OZONIZADA

## 2. Objetivo

Los ensayos que se han diseñado en el marco de este estudio tienen por objetivo comprobar la eficacia desinfectante del agua tratada con ozono frente a las principales bacterias causantes de enfermedades de transmisión alimentaria y su poder viricida frente a los coronavirus.

Los ensayos que se han realizado son los siguientes:

- A. El ensayo realizado para comprobar la **eficacia bactericida** se basa en la inoculación de diferentes **microorganismos de interés en el ámbito de la seguridad alimentaria** en el agua ozonizada generada "in situ" con el equipo facilitado por ECOASTUR (ECO OZONO WATER INDUSTRIAL Modelo: P01 - Serial N°: ECO – 180819000672), para investigar a diferentes tiempos el efecto del mismo sobre los inóculos dosificados. Además, se determinará la concentración de ozono presente en el agua tratada.
- B. El ensayo llevado a cabo para validar el **poder viricida** del agua ozonizada **frente a los coronavirus y otros virus** se basa en la determinación por cromatografía de gases de la concentración de peróxido de hidrógeno presente en el agua ozonizada a diferentes tiempos desde su generación "in situ" con el equipo facilitado por ECOASTUR (ECO OZONO WATER INDUSTRIAL Modelo: P01 - Serial N°: ECO – 180819000409).

## A. ENSAYO PODER BACTERICIDA

---

## 3. Método

Se recogen dos muestras de agua fría de red, una tratada con ozono con el citado equipo y otra sin tratar, ambas decloradas para eliminar las posibles interferencias que pudiera producir el cloro libre contenido en el agua de red, y se inoculan con las 4 cepas de microorganismos seleccionados.

Una vez inoculadas las muestras se realizan muestreos y siembras cada 5 minutos hasta llegar a los 40 minutos, así como un muestreo y siembra a tiempo 0 (inicial). Las siembras se realizan en medios de cultivo selectivos para las cepas de microorganismos seleccionadas para el ensayo.

Adicionalmente, se tomará una muestra de agua ozonizada declorada previamente para medir la concentración de ozono presente en la misma inmediatamente después de generarse.

## 4. Procedimiento de ensayo

### Preparación de las muestras y tratamiento:

Se preparan las siguientes muestras:

- MUESTRA 1: Agua ozonizada formada a partir del agua procedente de la red utilizando el equipo proporcionado por ECOASTUR en un recipiente estéril de 1 litro de capacidad. En esta muestra la neutralización del cloro residual, que procede del agua de red, se realizará antes de la ozonización utilizando un filtro de carbono.
- MUESTRA 2 (blanco): Agua procedente de la red en un recipiente estéril de 1 litro de capacidad con tiosulfato sódico para neutralizar el cloro que pueda contener.

A continuación se realiza la inoculación en ambas muestras de las 4 cepas seleccionadas.

### Preparación del inóculo e inoculación de las muestras:

Las 4 cepas que se han utilizado para realizar la inoculación de las muestras son:

- *Staphylococcus aureus* CECT 239
- *Listeria monocytogenes* CECT 935
- *Escherichia coli* CECT 434
- *Salmonella enterica subsp. enterica* CECT 4594

Se inocula 1ml de la concentración de  $10^7$  ufc/ml de cada microorganismo en ambas muestras. En paralelo, se siembran también 3 placas de control para observar los recuentos de los inóculos sembrados en las muestras, como se aprecia en la Figura 1.

Una vez inoculadas y homogeneizadas, se procederá a la siembra de 0,1ml de las muestras cada 5 minutos en un intervalo de 40 minutos para comprobar la evolución de la carga microbiana en este período de tiempo, según el esquema de la Figura 1.

Los medios de cultivo empleados para cada microorganismo, así como las temperaturas y tiempos de incubación, fueron los siguientes:

Microorganismo	Medio de cultivo	Lote	Incubación	
			Tiempo	T°
<b><i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i></b>	Baird Parker Medium	4255160	48 horas	37°C
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Listeria Palcam Agar	021320142	48 horas	37°C
<b><i>Escherichia coli</i></b>	TBX Agar	LE 4903	24 horas	44°C
<b><i>Salmonella</i> <i>enterica subsp. enterica</i></b>	XLD Agar	031319501	24 horas	37 °C

Tabla 3: Medios de cultivo empleados para cada microorganismo y condiciones de incubación

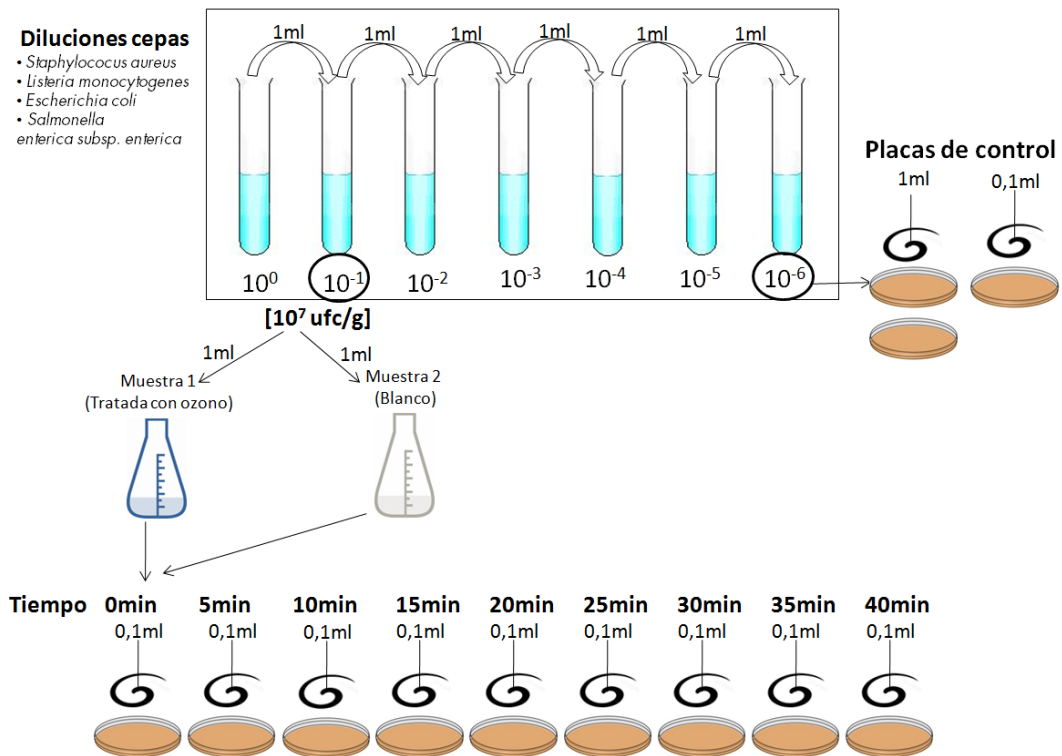


Figura 1: Esquema de inoculación y control de carga microbiana en muestras tratadas con ozono y sin tratar

### Determinación de la concentración de ozono en el agua tratada

El kit que se ha utilizado para determinar la concentración de ozono en el agua ozonizada es el kit HI38054 de Hanna Instruments. Este kit de pruebas químicas determina la concentración de ozono en muestras de agua con un rango de 0,0 a 2,3 mg/L.

Este método colorimétrico está basado en la determinación de la concentración de ozono a través de su reacción con DPD (dietil-p-fenilén diamina).

Para eliminar las posibles interferencias que pueda provocar el cloro, la medición se realizará con el agua ozonizada previamente declorada con un filtro de carbono.

## 5. Resultados











La temperatura de la agua ozonizada en el momento de recoger la muestra ha sido de 23°C.

Los recuentos en las placas de control que se hicieron en paralelo han sido los siguientes:









- *Staphylococcus aureus subesp aureus*:  $2,1 \times 10^7$  ufc/ml
- *Listeria monocytogenes*:  $1,3 \times 10^7$  ufc/ml
- *Escherichia coli*:  $6,3 \times 10^7$  ufc/ml
- *Salmonella enterica subsp. enterica*:  $2,8 \times 10^7$  ufc/ml

En las siguientes tablas se muestran los recuentos para cada una de las 4 cepas en las 2 muestras de agua:






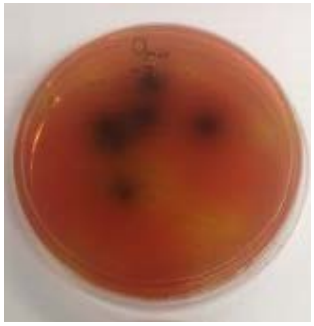
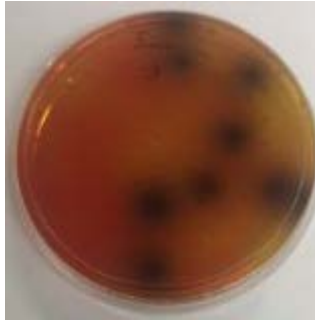
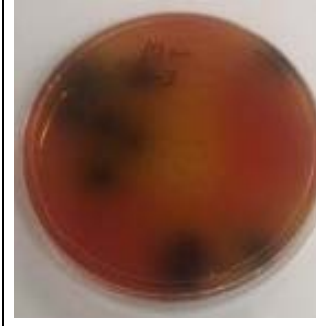
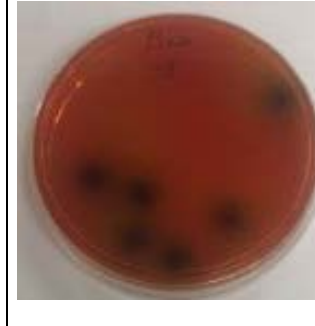
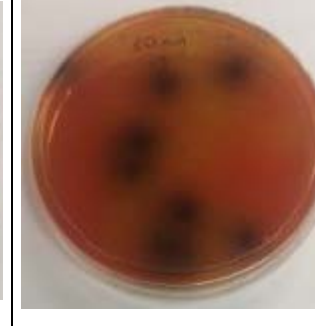
### *Staphylococcus aureus* CECT 239

Tiempo (min)	0	5	10	15	20
<b>Recuentos Muestra 1</b> Tratada con ozono					
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
<b>Recuentos Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)					
	$3,3 \times 10^4$ ufc/ml	$6,6 \times 10^4$ ufc/ml	$6,4 \times 10^4$ ufc/ml	$4,0 \times 10^4$ ufc/ml	$7,4 \times 10^4$ ufc/ml

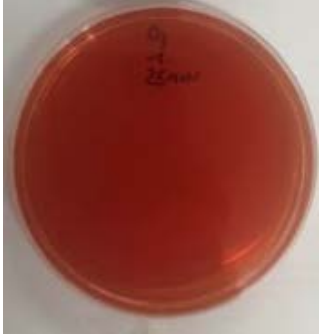


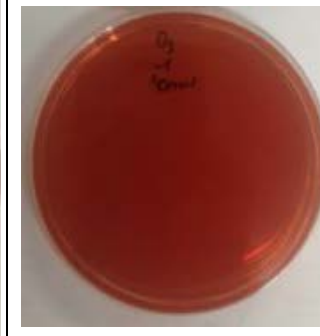
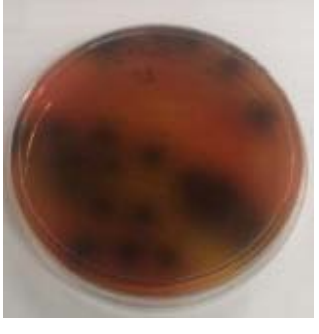
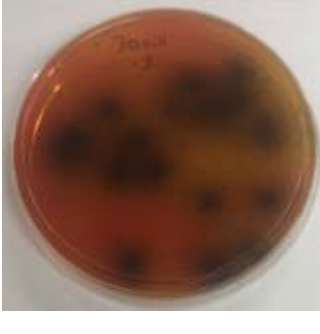
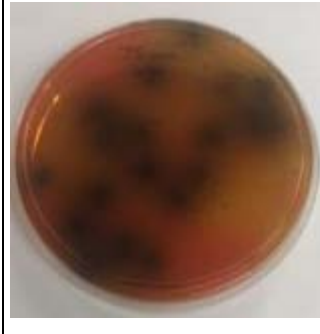
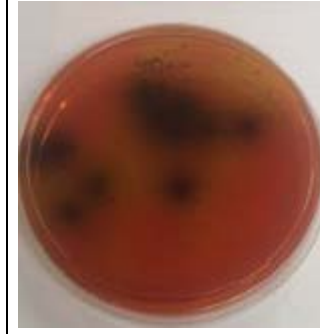
***Staphylococcus aureus* CECT 239**

Tiempo (min)	25	30	35	40
Recuentos <b>Muestra 1</b> Tratada con ozono				
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Recuentos <b>Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)				
	$4,6 \times 10^4$ ufc/ml	$5,6 \times 10^4$ ufc/ml	$6,9 \times 10^4$ ufc/ml	$5,7 \times 10^4$ ufc/ml






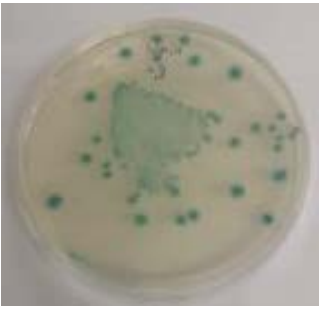
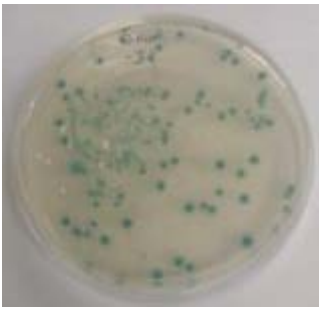
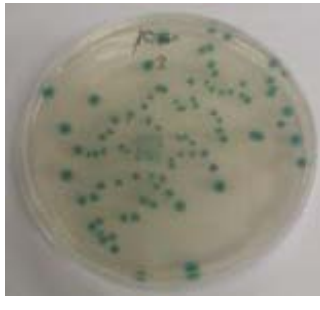
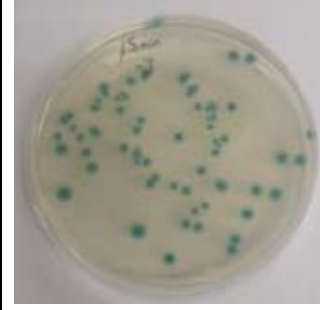
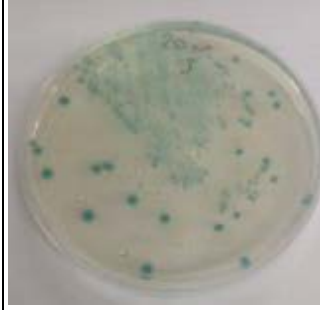
**Listeria monocytogenes CECT 434**

Tiempo (min)	0	5	10	15	20
Recuentos <b>Muestra 1</b> Tratada con ozono					
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Recuentos <b>Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)					
	$6 \times 10^3$ ufc/ml	$1 \times 10^4$ ufc/ml	$1,2 \times 10^4$ ufc/ml	$6 \times 10^3$ ufc/ml	$9 \times 10^3$ ufc/ml

**Listeria monocytogenes CECT 434**





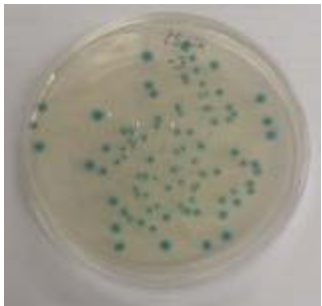
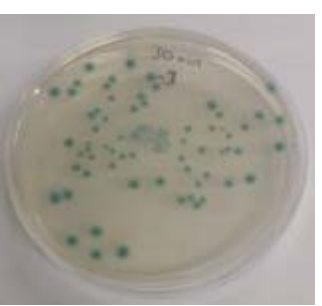
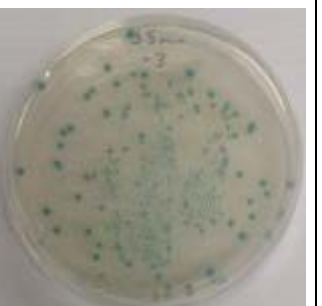
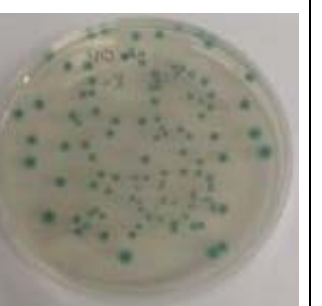
Tiempo (min)	25	30	35	40
Recuentos <b>Muestra 1</b> Tratada con ozono				
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Recuentos <b>Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)				
	$2,5 \times 10^4$ ufc/ml	$2 \times 10^4$ ufc/ml	$1,9 \times 10^4$ ufc/ml	$1,1 \times 10^4$ ufc/ml

**Escherichia coli CECT 935**


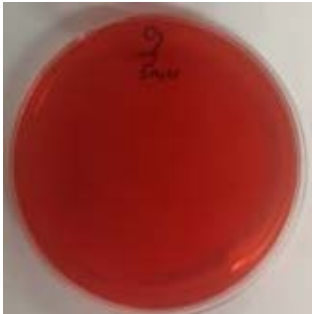



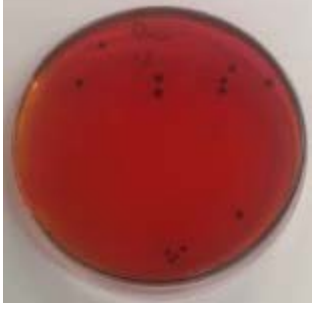
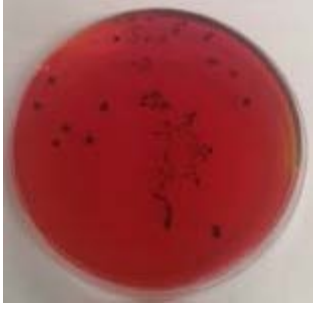
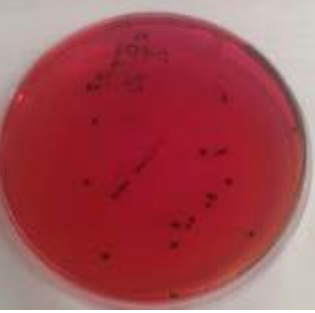
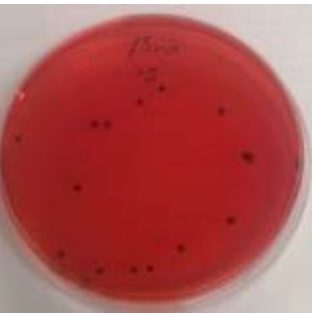
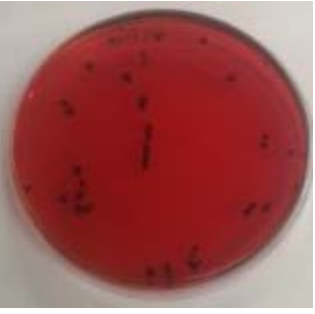
Tiempo (min)	0	5	10	15	20
Recuentos <b>Muestra 1</b> Tratada con ozono					
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Recuentos <b>Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)					
	$3,2 \times 10^4$ ufc/ml	$6,9 \times 10^4$ ufc/ml	$9,0 \times 10^4$ ufc/ml	$7,9 \times 10^4$ ufc/ml	$4,2 \times 10^4$ ufc/ml







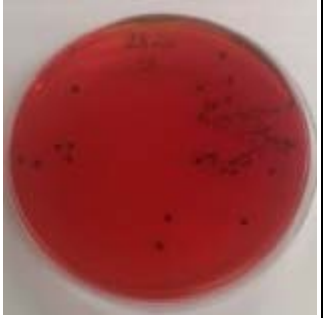
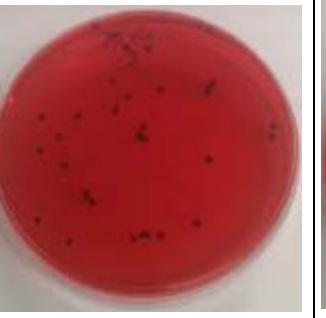
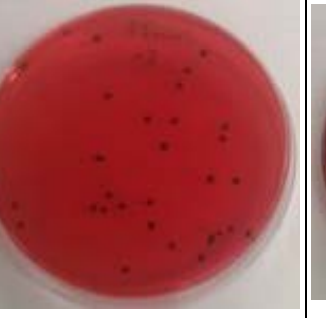
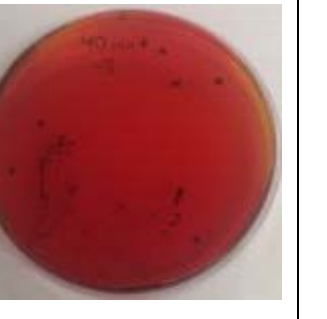
**Escherichia coli CECT 935**

Tiempo (min)	25	30	35	40
Recuentos <b>Muestra 1</b> Tratada con ozono				
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Recuentos <b>Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)				
	$9,6 \times 10^4$ ufc/ml	$8,9 \times 10^4$ ufc/ml	$8,7 \times 10^4$ ufc/ml	$11 \times 10^4$ ufc/ml

***Salmonella enterica subsp. enterica* CECT 4594**

Tiempo (min)	0	5	10	15	20
Recuentos <b>Muestra 1</b> Tratada con ozono					
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Recuentos <b>Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)					
	$1,4 \times 10^4$ ufc/ml	$5,2 \times 10^4$ ufc/ml	$5,7 \times 10^4$ ufc/ml	$2,7 \times 10^4$ ufc/ml	$4,6 \times 10^4$ ufc/ml

***Salmonella enterica subsp. enterica CECT 4594***

Tiempo (min)	25	30	35	40
Recuentos <b>Muestra 1</b> Tratada con ozono				
	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Recuentos <b>Muestra 2</b> Blanco (sin tratar)				
	$6,1 \times 10^4$ ufc/ml	$3,8 \times 10^4$ ufc/ml	$3,4 \times 10^4$ ufc/ml	$4,6 \times 10^4$ ufc/ml

### **Determinación de la concentración de ozono en el agua ozonizada**

La concentración de ozono en el agua ozonizada de clorada medida inmediatamente después de su generación ha sido de 0,4mg/L.

## **6. Interpretación**

Se ha observado un porcentaje de reducción mayor del 99,9% para todas las cepas estudiadas y a todos los tiempos controlados (desde el tiempo inicial hasta el tiempo 40 minutos).

El ensayo realizado ha demostrado la elevada eficacia bactericida frente a las cepas de microorganismos utilizadas en el mismo, evidenciando que el tratamiento del agua con ozono realizado con el equipo de ECOASTUR presenta un elevado poder desinfectante.

## **B. ENSAYO PODER VIRICIDA**

### **7. Método**

Se recoge una muestra de agua fría de red tratada con ozono con el equipo proporcionado por ECOASTUR en el mismo laboratorio donde se va a analizar.

A través de la técnica cromatografía de gases se determinará la concentración de peróxido de hidrógeno a tiempo 0 (inicial), a los 5 minutos y a los 10 desde que se ha generado.

### **8. Resultados**

<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>0 (inicial)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>Concentración de peróxido de hidrógeno</b>	21,2%	20,8%	17,6%

## **9. Interpretación**

El contenido en peróxido de hidrógeno en el agua ozonizada supera la concentración mínima requerida para inactivar a los virus y en particular al coronavirus SARS-CoV-2, tal y como se expone en el documento técnico sobre "Prevención y control de la infección en el manejo de pacientes con COVID-19" del Ministerio de Sanidad de España.

En dicho documento se indica como procedimiento de limpieza y desinfección válido para inactivar al coronavirus en superficies y espacios, las soluciones de peróxido de hidrógeno al 0,5% dejándolas actuar durante un minuto.

Además, en el listado de viricidas autorizados y registrados en España que han demostrado eficacia frente a virus atendiendo a la norma UNE-EN 14476 figuran dentro el apartado TP2 (desinfección de superficies y aérea, uso ambiental y uso clínico) y del TP4 (desinfección de materiales y equipos en contacto con alimentos/piensos, industria

alimentaria) varios productos cuya composición está formada sólo por peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones desde (0,36% a 59%).

Por todo lo anterior y unido a las referencias bibliográficas incluidas en el apartado de fundamentación y antecedentes que lo sustentan, podemos concluir que el agua ozonizada posee propiedades viricidas y puede emplearse para la desinfección de cualquier superficie o utensilio, incluidos los destinados a entrar en contacto con alimentos.

## RECOMENDACIONES GENERALES DE USO

---

- Todo proceso de higienización consta de 2 pasos: 1º limpiar y 2º desinfectar.  
Si la superficie que vamos a higienizar presenta abundante suciedad, primero se debe limpiar pulverizando el agua ozonizada sobre la superficie para eliminar la materia orgánica e inorgánica presente y después desinfectar para eliminar los microorganismos, pulverizando nuevamente el agua ozonizada y dejando actuar unos minutos antes de retirar.  
Lo ideal sería renovar el agua ozonizada entre una etapa y la otra, para garantizar que las concentraciones de ozono y de peróxido de hidrógeno son las óptimas y lograr así una desinfección completa.
- Tanto el ozono como el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) presentes en el agua ozonizada se descomponen con el paso del tiempo y no dejan residuos, por esa razón su poder desinfectante también se limita en el tiempo. Si la finalidad de su uso es la desinfección, se recomienda su renovación al menos cada 15 – 20 minutos para garantizar la completa eliminación de los microorganismos en las superficies que vamos a desinfectar.
- El poder desinfectante del agua ozonizada también depende de la temperatura que tenga la misma, siendo preferible que sea fría (entre 0 y 37°C).

Oviedo, 26 de Mayo de 2020



inoQua Instituto  
de SALUD ALIMENTARIA

Sara Aguirre Bastarrica  
Licenciada en medicina Veterinaria  
Colegiada 33/1616  
inoQua | Instituto de Salud Alimentaria

## Referencias

1. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (2019) Informe del Comité Científico de la en relación a la seguridad del uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético (23/17/15) como coadyuvante tecnológico para la desinfección bacteriana del agua de lavado de lechugas y zanahorias cortadas, ajos pelados, boniatos, caquis, mangos y aguacates en las plantas de procesado. Revista del Comité Científico de la AESAN, N°30. 29-48 Madrid
2. Aguayo, E., Gómez, P., Artés-Hernández F., Artés F. (2017) Tratamientos químicos desinfectantes de hortalizas de IV gama: ozono, agua electrolizada y ácido peracético. Agrociencia Uruguay - Volumen 21 1:7-14.
3. Bataller- Venta, M., Santa Cruz – Broche, S., García – Pérez M.A. (2010) El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol 41 n°3, pág 155-164.
4. Cepeda Sáez, A., Herrera Marteache, A., Martín de Santos, M.R., Martínez López, A., Pintó Solé, R. M., Miranda López, J.M., (2012) Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre riesgos microbiológicos asociados al consumo de frutos obtenidos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp. Revista del Comité Científico de la AESAN, N°16. 57-69. Madrid.
5. Del Barrio de Vergara, M. (2015) Cloración frente a ozonización en el tratamiento de agua potable. Ventajas y desventajas de ambos procesos. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
6. Domenech, J. (2004) "Ozono frente a Cloro. OFFARM Vol. 23 n° 5 120 - 126
7. Environmental Protection Agency (EPA) (1999). Folleto informativo de tecnología de aguas residuales. Desinfección con ozono. Office of Water Washington, D.C.
8. García – Chamizo, J.M., Alcañiz - Lucas, S., Ferrández - Pastor, F.J., Perez Maciá, J.J., Silveira Madrid, D., García Pérez M. (2020) Revisión de las Aplicaciones del Ozono y su Generación para el Uso en Mascarillas contra Patógenos. Versión Preliminar. Departamento de Tecnología Informática y Computación. Unidad de Experimentación. Vegetal Servicios Técnicos de Investigación. Universidad de Alicante.
9. Gordillo de Coss, G.E. (2013) Investigación técnica y económica sobre desinfección de aguas residuales por sistemas de oxidación (Tesis Doctoral) Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Universidad Politécnica de Madrid.
10. Marín León, V. (2016) Evaluación del efecto de la aplicación de ozono gaseoso sobre las características físico – químicas y parámetros de calidad poscosecha de mora fresca (*Rubus adenotrichos*) durante su almacenamiento a 2°C. (Trabajo Final de Graduación) Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica.

11. Ministerio de Sanidad. Listado de productos virucidas autorizados en España.  
[https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCoV-China/documentos/Listado\\_virucidas.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCoV-China/documentos/Listado_virucidas.pdf)
12. Ministerio de Sanidad (2020) Documento técnico "Prevención y control de la infección en el manejo de pacientes con COVID-19" Versión del 20 de mayo. Madrid.
13. O'Neil, M.J.(1989) The Merck Index : Una Enciclopedia de químicos, drogas y productos biológicos. New Jersey: Merck.
14. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2008) Guidelines for Drinking-water Quality 3<sup>o</sup> Edition. Vol1.  
[https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/fulltext.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf)
15. Parzanese, M. (2012) Ozono en los alimentos. Tecnologías para la Industria Alimentaria. Alimentos Argentinos N°54 Junio 72 -80.
16. Pérez Calvo, M.M., (2008). Tratamiento avanzado de aguas residuales para riego mediante oxidación con ozono: una alternativa ecológica. Congreso Nacional de Medio Ambiente, cumbre del Desarrollo Sostenible.
17. Rodríguez Ferri, Elías F. (2008) Importancia de la limpieza y desinfección en el procesado higiénico de la carne de ave. Revista del Comité Científico de la AESAN, N°8. 57-67 Madrid
18. Seminario L.A., Acuña J.F., Williams, S. (2010) El ozono y su aplicación en la conservación de alimentos. Universidad de Concepción. Chile.

### Notas:

- Los resultados de este Estudio solo dan fe de las muestras analizadas
- No se permite la reproducción total o parcial del presente informe sin previa autorización escrita de su autora
- Ensayo poder bactericida: Las muestras han sido analizadas en un laboratorio con autorización administrativa de funcionamiento de Castilla y León (n° 093/BU), acreditado por ENAC según ISO 17025, con número de certificado 552/LE1225 según el anexo técnico para análisis de aguas, desde Octubre 2006, con número de certificado 552/LE1333 según el anexo técnico para análisis de alimentos, piensos y sus materias primas, desde Junio 2008, certificado por URS según la norma UNE- EN ISO 9001 y autorizado por la Consejería Salud y Bienestar Social de la Comunidad de Castilla la Mancha (LA/AL/CS069) desde noviembre de 2008.
- Ensayo poder virucida: La muestra ha sido analizada en un laboratorio autorizado por la Consejería de Salud y Servicios Sanitarios del Principado de Asturias, como laboratorio privado independiente de análisis y control sanitario de alimentos, aguas y bebidas, con el número de registro 05/O, desde febrero de 1.997, acreditado por ENAC, de acuerdo a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025, para la realización de ensayos en el sector medioambiental, según lo indicado en la acreditación número 780/LE1514, desde marzo de 2.010 y entidad colaboradora de la Administración Hidráulica en materia de control y vigilancia de calidad de las aguas y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico al amparo de la Orden MAM/985/2006.