

Microbicidal effect of solar radiation (SODIS) combined with *Artemisia annua* Efecto microbicida de la radiación solar (SODIS) combinado con *Artemisia annua*

Mariana Muñoz-Restrepo ^a, Leidy Viviana Orrego ^b, Diana Carolina Muñoz-Arango ^c, Carlos Neftaly Lozano-Andrade ^d, Diana Carolina Guzman-O. ^e, Maria Cecilia Escobar-Restrepo ^f, Yamilet Arcos-Arango ^g, Néstor Jaime Aguirre-R. ^h, Pierre Lutgen ⁱ & Roberto Mejia-Ruiz ^j

^a Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia, Colombia, mariana412@gmail.com

^b Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia, Colombia, vivianajph@hotmail.com

^c Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia, Colombia, diana.udea@gmail.com

^d Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia, Colombia, neftaly.lozano@gmail.com

^e Estudiante del programa de Ingeniería Ambiental de la Universidad del Cauca, Colombia, diancguz@gmail.com

^f Bacterióloga y Laboratorista Clínico, MSc en Biología, Universidad de Antioquia, Colombia, mariaac@udea.edu.co

^g Bacterióloga y Laboratorista Clínico, MSc en Biología, Universidad de Antioquia, Colombia, yaarcos@hotmail.com

^h PhD en Recursos Naturales, Universidad de Antioquia, Colombia, naguirre@udea.edu.co

ⁱ PhD en Físico Química, Université Catholique de Louvain, lutgenp@gms.lu

^j Ingeniero Sanitario, MSc en Ingeniería, Universidad de Antioquia, Colombia, rmejia@udea.edu.co

Received: August 23th, 2013. Received in revised form: October 28th, 2013. Accepted: November 29th, 2013

Abstract

This study evaluates the SODIS and SODIS method combined with *Artemisia annua* (SODIS+A. *annua*) as an alternative for water disinfection in communities without access to potable water. The efficiency of the method in removing *E. coli*, *B. subtilis*, *E. faecalis* and *S. typhimurium* was determined using PET bottles with sterile distilled water and an initial concentration of 1x10⁶ UFC/ml of each microorganism. For SODIS+A. *annua* a 10% (v/v) infusion of *A. annua* was added; the bottles were exposed to sunlight for at least 6 hours and three variables (water temperature, solar radiation and turbidity) were measured. It was found that SODIS treatment was more efficient in the removal of the four microorganisms than SODIS + *A. annua*. The removals were higher after four hours of exposure to the bacterial species in their vegetative state.

Keywords: Solar disinfection (SODIS), *Artemisia annua*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, solar radiation.

Resumen

En este estudio se evaluó el método SODIS y SODIS combinado con *Artemisia annua* como una alternativa para la desinfección del agua en comunidades sin acceso a agua segura. Se determinó la eficiencia del método en la remoción de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella typhimurium* usando botellas tipo PET con agua destilada estéril y una concentración inicial de 1x10⁶ UFC/ml de cada microorganismo. Para la combinación SODIS-A. *annua* se adicionó a las botellas una infusión de *A. annua* al 10% (v/v); las botellas fueron expuestas al sol durante mínimo 6 horas y se determinaron las variables temperatura del agua, radiación solar y turbidez. Se encontró que el tratamiento SODIS fue más eficiente en la remoción de los cuatro microorganismos que el tratamiento SODIS + *A. annua*. Las remociones más altas se encontraron a partir de las cuatro horas de exposición para las especies bacterianas en estado vegetativo.

Palabras Clave: Desinfección solar (SODIS), *Artemisia annua*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, Radiación solar.

1. Introducción

El agua para el consumo humano es responsable de cerca de 4 millones de muertes al año en todo el planeta, cada ocho segundos un niño muere a causa de enfermedades relacionadas

con la contaminación del agua [1]; razón por la cual los procesos de desinfección o de potabilización tienen como objetivo principal la inactivación de microorganismos patógenos que viven o llegan al agua desde diferentes fuentes. [2,3]

Entre las tecnologías para desinfectar el agua de consumo que más se acerca a los requisitos de eficiencia y bajo costo, está la tecnología que utiliza la radiación solar (SODIS) del acrónimo SOLar-DISinfection. La desinfección solar no es una tecnología nueva, existen descripciones de comunidades en el subcontinente de la India hace cerca de 2000 años que disponían su agua de beber en bandejas abiertas para ser “bendecidas por el sol”; su efecto bactericida fue primero investigado por Downes y Blunt en 1877 [4], pero fue el investigador Afim Acra y colaboradores en Beirut 1984 [5], quienes publicaron el primer trabajo sobre el uso de la luz solar para desinfectar agua contaminada para uso en rehidratación oral; desde entonces varios grupos de trabajo de diferentes universidades en todo el mundo han investigado el potencial de SODIS para inactivar una amplia gama de patógenos de origen hídrico [6-14].

El rango ultravioleta del espectro solar que alcanza la superficie terrestre está limitado a longitudes de onda superiores a 290 nm. De toda esta radiación menos del 10% es luz UV, de la cual solo una pequeña parte es útil para la desinfección del agua [15]; sin embargo, se ha demostrado extensamente su capacidad para eliminar diferentes organismos patógenos evitando la generación de productos tóxicos típicos de las tecnologías convencionales [6-7-9].

El efecto biocida de la luz solar se debe al efecto sinérgico entre la radiación y la temperatura, cuando excede los 45°C. La luz solar es absorbida por fotosensibilizadores naturales presentes en el agua que reaccionan con el oxígeno produciendo moléculas altamente reactivas tales como el peróxido de hidrógeno y el ión superóxido [16,17].

Entre otras alternativas utilizadas para la desinfección del agua se ha planteado con mucha expectativa el uso de *Artemisia annua*, planta de origen chino que en los últimos 30 años se le han redescubierto propiedades microbicidas contra una serie de organismos causantes de enfermedades incluida la malaria. En los años ochenta los chinos consiguieron aislar su sustancia activa, la artemisinina y desde entonces las sociedades farmacéuticas la utilizan en sus píldoras ACT (artemisia combined therapy) contra la malaria [18].

Además de las propiedades antimaláricas de la planta los trabajos realizados por los investigadores Pierre Lutgen y Bernard Michels [19], les han permitido concluir que el té de *Artemisia annua* tiene un fuerte efecto bactericida; en sus experimentos con la bacteria *Vibrio fischeri* encontraron que *Artemisia annua* tiene un notable efecto en la luminiscencia de esta bacteria [19,20]. Otros investigadores han encontrado un efecto inhibitorio de los aceites esenciales de *A. annua* sobre la bacteria *Enterococcus hirae* [21].

En este trabajo se evaluó el efecto microbicida del método SODIS y el método SODIS combinado con el extracto de *Artemisia annua* sobre los siguientes indicadores microbiológicos: *Escherichia coli* (*E. coli*), indicador de contaminación fecal, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), causante de la fiebre tifoidea y uno de los principales causantes de enfermedad diarreica aguda [22]; *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), indicador de contaminación fecal, muy resistente a condiciones adversas

(congelación, desecación, tratamiento térmico, etc.) y *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), que tiene la habilidad para formar endosporas las cuales presentan un alto grado de resistencia a la inactivación por tratamientos físicos que incluyen calor seco y húmedo, radiación gamma y ultravioleta, oxidantes químicos, desecación extrema, no es considerado patógeno humano [23].

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas

Para esta investigación se utilizaron las cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) conservadas en viales criopreservados con glicerol a -20°C.

2.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

El procedimiento para la preparación de las cepas microbianas consistió en la inoculación de 100µL de los viales de *E. coli*, *E. faecalis* y *S. typhimurium* en caldo Luria Bertani (Merck, USA) y caldo nutritivo (Merck, USA) para *B. subtilis*, se incubaron a 35± 0.5°C durante 18 a 24 horas, pasado el tiempo de incubación 25 µL de cada caldo fueron sembrados sobre placas de agar Luria Bertani para *E. coli* y *E. faecalis* y agar nutritivo (Merck, USA) para *S. typhimurium*, se incubaron a 35± 0.5°C durante 18 a 24 horas. A partir del crecimiento sobre el agar se prepararon las suspensiones bacterianas comparando con un patrón de turbidez 0.5 de la escala de McFarland, se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Para la obtención de las esporas de *B. subtilis*, se siguió la metodología propuesta por dos autores [6-24]; con las variaciones que a continuación se especifican. Se inocularon 12 placas de Petri que contenían agar tripticasa soya (Merck, USA) con 25 µL del crecimiento obtenido previamente en caldo nutritivo, se incubaron a 35±0.5°C durante 15 días aproximadamente para permitir una buena esporulación; pasado el tiempo de incubación, se lavaron y rasparon las superficies de las placas petri con 10 ml de agua destilada estéril hasta recoger una suspensión de aproximadamente 100 ml. Para eliminar las células vegetativas dicha suspensión se sometió a 80°C por 15 a 20 minutos al baño maría, la esporulación fue confirmada mediante el uso de la coloración verde de malaquita y observación microscópica. La suspensión obtenida se conservó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

2.3. Infusión de *Artemisia annua*

Se preparó una infusión de *Artemisa anua* al 10% (v/v) siguiendo la metodología propuesta en dos trabajos de investigación [25,26]. Para confirmar la presencia de artemisinina se colocó la infusión frente a una lámpara de UV con el objetivo de evaluar la fluorescencia emitida por este compuesto.

La especie de *A. annua* utilizada en este estudio fue donada por el Profesor Pierre Lutgen de la ONG IfbV-Luxemburgo.

2.4. Ensayos de inactivación

Para los ensayos de inactivación con el tratamiento SODIS se utilizaron botellas tipo PET, una por cada microorganismo evaluado, con 400ml de agua destilada estéril y una concentración bacteriana aproximada de 1×10^6 UFC/ml; para el tratamiento SODIS + *A. Annua*, se adicionó además una infusión de *A. annua* al 10% (v/v). Para los controles de los experimentos SODIS y SODIS + *A. Annua* se prepararon botellas adicionales, que se conservaron en oscuridad y fueron evaluadas de forma paralela en cada tiempo de muestreo.

2.5. Análisis fisicoquímicos y microbiológicos

Se llevaron a cabo tres campañas de muestreo durante tres meses. Las botellas fueron colocadas en posición horizontal sobre una lámina de acero inoxidable en el techo del laboratorio de procesos biológicos de la Universidad de Antioquia ($6^{\circ}16'16.36''N$; $75^{\circ}34'12.12''O$; 1483m). Estas botellas fueron expuestas a la radiación entre las 9:00am y 5:00 pm, hora local. En cada campaña de muestreo, se evaluaron tanto variables fisicoquímicas como microbiológicas a intervalos regulares de 30 minutos, 1, 2, 4 y 6 horas para *E. coli*, *S. typhimurium* y *E. faecalis* y para *B. subtilis* además se evaluaron los tiempos 8, 12, 16 y 20 horas.

En cada intervalo de tiempo se realizó por duplicado el recuento de los microorganismos mediante el método de extensión en placa (9215C, APHA) [27]; inoculando 100 μ L del contenido de cada botella en agar Luria Bertani para *E. coli* y *E. faecalis*, agar nutritivo para *S. typhimurium* y agar TSA para *B. subtilis*; todas las placas de agar se incubaron durante 24 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}C$. La temperatura del agua se midió con termómetro Beek Mann, la radiación solar con un cuantómetro (LI-1400 data LOGGER) y la turbidez con turbidímetro portátil HACH 2100Q (APHA) [27].

Para evaluar la posible reactivación de los microorganismos las botellas expuestas a los tratamientos SODIS y SODIS + *A. annua* fueron incubadas en oscuridad durante 48 horas; después del tiempo de incubación se realizó el recuento de las colonias que crecieron sobre el agar. [7].

Los ensayos microbiológicos y fisicoquímicos se llevaron a cabo en las instalaciones de los Laboratorios de Microbiología Ambiental de la Escuela de Microbiología y de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia.

2.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la información obtenida se empleó como software el programa Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.15. Se elaboraron curvas de remoción microbiana y se realizó un análisis de componentes de

varianza para determinar el posible efecto de los factores (tipo de microorganismo, muestreo, tratamiento, hora de exposición y replica) sobre la variable respuesta (LOG UFC/ml).

3. Resultados y discusión

Los resultados de remoción de cada microorganismo durante los tres muestreos con el tratamiento SODIS se muestran en la Figura 1; al compararlos con los resultados de los controles (Figura 2); se observó una reducción significativa de los cuatro microorganismos después de las cuatro horas de exposición continua, obteniéndose remociones del 100% en algunos microorganismos.

Según el análisis de componentes de varianza la hora fue el factor que más contribuyó a la variabilidad de los datos con un 63,81%; estos resultados fueron coherentes con el comportamiento en la intensidad lumínica acumulada, que osciló entre 14000 y 193000 luxes a medida que aumento el tiempo de exposición (Figura 3).

El mecanismo de acción del método SODIS, se basa principalmente en el efecto sinérgico de la radiación y la temperatura cuando ésta última sobrepasa los $50^{\circ}C$ [28-29]. Aunque la temperatura, en ninguno de los muestreos superó los $50^{\circ}C$ y la intensidad lumínica presentó valores entre 14000 y 193000 luxes, se obtuvieron remociones significativas de los microorganismos evaluados. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de otros autores [30], quienes llevaron a cabo un estudio comparativo, exponiendo a la radiación solar botellas oscuras y transparentes con agua contaminada, para evaluar la incidencia de la temperatura y la radiación en el proceso de desinfección. Entre los resultados más importantes encontraron que las remociones de microorganismos en botellas oscuras fueron más bajas, por lo tanto la temperatura no fue un factor predominante en la eliminación bacteriana, a diferencia de la radiación que determinó la eficiencia del método, de allí que la reducción microbiana, para nuestro caso, se dió principalmente por la intensidad lumínica alcanzada.

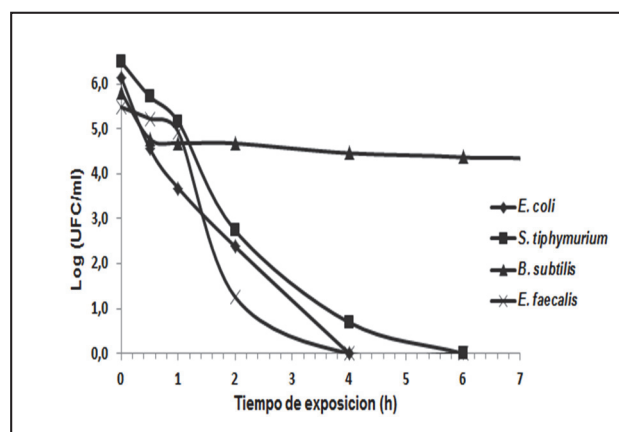


Figura 1. Cinética de remoción de las poblaciones bacterianas: *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* y *B. subtilis* expuestas al tratamiento SODIS expresadas en unidades logarítmicas.

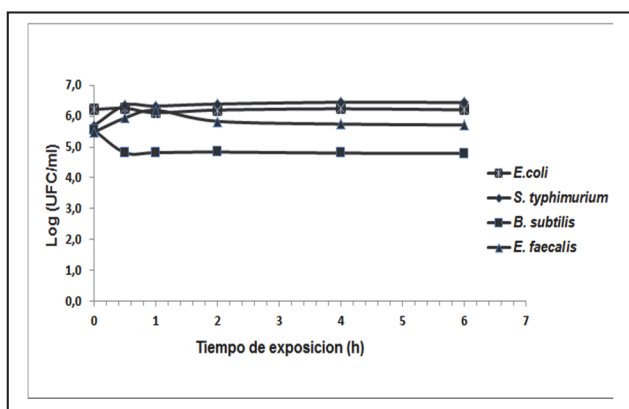


Figura 2. Control de la cinética de remoción de las poblaciones bacterianas: *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* y *B. subtilis* expuestas al tratamiento SODIS expresadas en unidades logarítmicas.

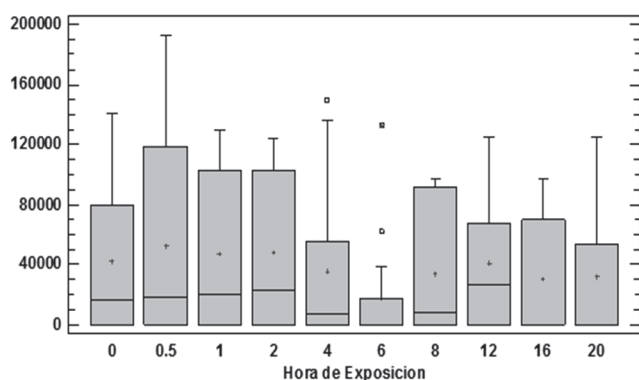


Figura 3. Evolución de la intensidad lumínica durante las horas de exposición.

En cuanto a los porcentajes de remoción de cada uno de los microorganismos en el tratamiento SODIS (Figura 1), encontramos que para *E. faecalis* y *E. coli* fue del 100% a las cuatro horas de exposición, mientras que para *S. typhimurium* solo se alcanzó la remoción completa a las seis horas de exposición continua.

En la figura 4 se puede observar que la exposición prolongada durante 20 horas no logró una remoción del 100% de *B. subtilis*; ya que es una bacteria que forma una endospora altamente resistente a las condiciones medioambientales adversas.

Resultados de estudios moleculares y bioquímicos han explicado como las esporas de *B. subtilis* pueden resistir la exposición prolongada al calor, la radiación UV y agentes oxidantes, debido a la disminución en el contenido de agua de la spora y a la presencia de ácido dipicolínico y calcio, adicionalmente los fotoproductos que se acumulan en el DNA de las esporas durante la exposición a la radiación son reparados de manera muy eficiente durante la germinación cuando estas dejan de estar expuestas a la radiación [31].

A diferencia de *B. subtilis*, las bacterias *E. faecalis*, *S. typhimurium* y *E. coli* (Figura 1) fueron más sensibles a los efectos de la radiación solar; lo que coincide con lo reportado por otros investigadores quienes encontraron que

la radiación solar fue determinante en la tasa de disminución de bacterias en estado vegetativo [32], debido a que no tienen la capacidad de generar estructuras de resistencia, además su proceso de respiración lo llevan a cabo muy cerca a la superficie celular lo que las hace más vulnerables a los efectos oxidativos y degenerativos de la radiación [22].

Otro factor que pudo contribuir a la baja remoción de *B. subtilis* pudo ser la turbiedad, ya que a lo largo de las jornadas de muestreo llama la atención que en los experimentos con *E. faecalis*, *S. typhimurium* y *E. coli* la turbiedad se mantuvo entre 0 y 2 UNT, mientras que la turbiedad en los experimentos con *B. subtilis* estuvo entre 13,2 y 22,3 UNT debido posiblemente a la presencia de los detritos celulares producto de los procesos de esporulación, está claro que la turbiedad disminuye en gran medida la efectividad de la radiación, ya que puede tener un efecto protector sobre el microorganismo [2-32].

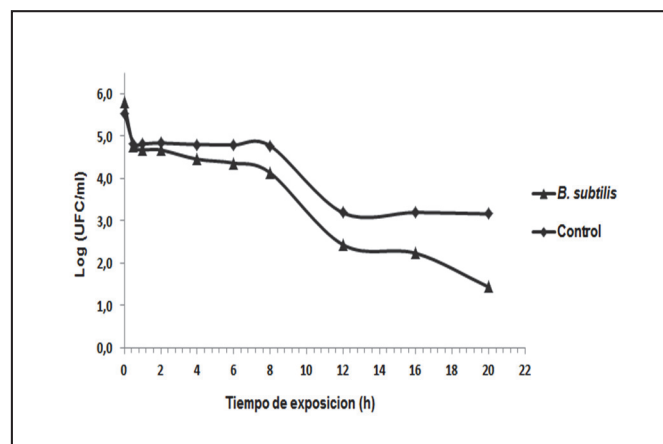


Figura 4. Cinética de remoción de *B. subtilis* expuestas al tratamiento SODIS expresadas en unidades logarítmicas.

Después de seis horas de exposición continua al tratamiento SODIS, las botellas fueron conservadas 48 horas en oscuridad para determinar el efecto reparador que pueden experimentar ciertos grupos bacterianos cuando dejan de estar expuestos a la radiación ultravioleta. En nuestros resultados no encontramos recrecimiento de ninguno de los microorganismos sometidos al tratamiento SODIS, lo que coincide, para el caso de *E. coli*, con la investigación realizada por Berney [33], quienes encontraron que esta bacteria después de 6 horas de exposición al sol no reparó los daños causados por la radiación solar.

Los resultados obtenidos con el tratamiento SODIS + *Artemisia annua* no mostraron un efecto ni sinérgico ni antagónico, ya que los controles para este tratamiento tuvieron un comportamiento constante demostrando que *A. annua* por sí sola no tiene un efecto inhibitor, debido posiblemente a varios aspectos; primero, la actividad antimicrobiana de la planta no se debe solamente a la concentración de artemisinina la cual varía en las diferentes partes de la planta (hoja, semilla, flores, raíz); sino también a la especie de artemisia utilizada; segundo, la síntesis y

acumulación de algunos metabolitos secundarios como sesquiterpenoides, flavonoides, cumarinas, triterpenoides, esteroides, fenoles, purinas, lípidos, compuestos alifáticos y monoterpenoides también influyen en la actividad antimicrobiana [34-36].

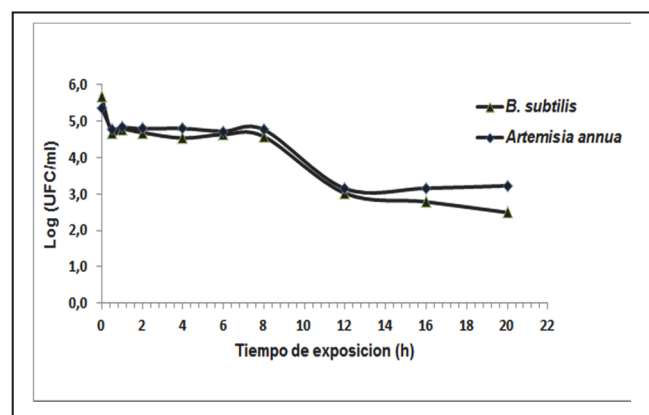


Figura 5. Cinética de remoción de *B. subtilis* expuesta al tratamiento SODIS+*A.annua* expresada en unidades logarítmicas.

4. Conclusiones

Las especies bacterianas en su estado vegetativo como *E. coli*, *S. typhimurium* y *E. faecalis* se inactivaron fácilmente, mientras que aquellas especies que forman esporas como *B. subtilis*, fueron menos sensibles a las condiciones térmicas y oxidativas establecidas durante el tratamiento SODIS.

Las remociones más altas se encontraron después de cuatro horas de exposición con excepción de *B. subtilis*, la cual disminuyó después de 20 horas de exposición.

El método SODIS fue más eficiente en la remoción de los microorganismos evaluados que la combinación SODIS+*A. annua*, por lo que se sugiere en futuras investigaciones profundizar en el conocimiento de la interacción química y/o molecular entre los compuestos activos de la planta con las estructuras bacterianas que pudieran explicar los resultados obtenidos.

Es importante evaluar la combinación de SODIS con diferentes especies de *Artemisia*, ya que algunos estudios han reportado diferencias en la actividad microbicida de la planta de acuerdo a su genotipo.

En este estudio la determinación de artemisinina se realizó de forma cualitativa confirmando su presencia por el método de fluorescencia, por lo que sería importante cuantificar la concentración de la sustancia activa de *Artemisa annua* utilizando otras técnicas de análisis como HPLC para determinar si la cantidad presente en la infusión es suficiente para ejercer una actividad desinfectante efectiva.

Referencias

[1] OMS. Informe sobre la Salud en el Mundo. Capítulo "Mejorar el desempeño de los sistemas de salud", Switzerland. Organización Mundial de la Salud, 2000.

[2] Arboleda, J., Teoría y Práctica de la Purificación del Agua. Mc Graw Hill, Bogotá, Colombia, 2000.

[3] Bitton, G., Wastewater Microbiology. Wiley-Liss, New York, 2005.

[4] Downes, A. and Blunt, T. P., Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms. Proc. R. Soc., 28, pp. 488-500, 1877.

[5] Acra, A., Raffoul, Z., y Karahagopian, Y., Solar disinfection of drinking water and oral rehydration solutions: Guidelines for household application in developing countries, 1984.

[6] Boyle, M. C., Sichel, P., Fernández, G. B., Arias-Quiroz, M., Iriarte-Puñá, A., et al. Bactericidal Effect of Solar Water Disinfection under Real Sunlight Conditions: Appl. Environ. Microbiol. 74, pp. 2997-3001, 2008.

[7] Dejung, S. I., Fuentes, G., Almanza, R., Jarro, L., Navarro, G. et al. Effect of Solar Water Disinfection (SODIS) on Model Microorganisms under Improved and field SODIS Conditions. J. water supply: Research and technology-AQUA. 56.4, pp. 245-256, 2007.

[8] Lujan, G. C., Evaluación de la efectividad del método de desinfección de aguas contaminadas de algunas zonas rurales del municipio de Ayapel, empleando la radiación solar [Tesis pregrado] Medellín, Universidad de Antioquia, 2005.

[9] Lester W. Sinton, Caeolyn H. Hall, Philippa A. Lynch, and Robert J. Davies-Colley. Sunlight Inactivation of Fecal Indicator Bacteria and Bacteriophages from Waste Stabilization Pond Effluent in Fresh and Saline Waters: Appl. Environ Microbiol. 68, pp. 1122-1131, 2002.

[10] Mausezahal, D., Christien, A., Pacheco, D. G., Tellez, A. F., Iriarte, M. et al. Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial. Journal.pmed. 6(8), 2009.

[11] Jaimes, X., Mejía, R., Lutgen, P. y Aguirre, N., Sodis. Desinfección solar del agua. Guía de Aplicación. Universidad de Antioquia, Corpoayapel, IfbV-Luxemburg. ISSN 00000065322. Medellín, 2007.

[12] Aguirre, N., Lutgen, P. y Schosseler, P., Mise en oeuvre de la methode de stérilisation de l'eau SODIS en Colombie. Revue Technique Luxembourgeoise, pp. 151-152, 2006.

[13] Cano, A., Arcos, Y., Lutgen, P. y Aguirre, N., Interaction entre le rayonnement solaire et la tisane d'artemisia annua pour la désinfection de l'eau de la Ciénaga de Ayapel Colombie. Revista FAEC. Fundación Argentina de Ecología Científica. 2010.

[14] Wolyniak, E.A., Hargreaves, B.R., and Jellison, K. L., Biofilms Reduce Solar Disinfection of Cryptosporidium parvum Oocysts. Appl. Environ Microbiol. 78(12) pp. 4522-4525, 2012.

[15] Fernandez, P., Solar disinfection of drinking water. Course on: Innovative Processes and Practices for Wastewater and Re-use, Ankara University. Innova-Med, 2007.

[16] Heaselgrave, W. and Kilvington, S., Antimicrobial activity of simulated solar disinfection against bacterial, fungal and protozoan pathogens and its enhancement by riboflavin: Appl. Environ Microbiol. 76 (17), pp. 6010-6012, 2010.

[17] Khaengraeng, R. and Reed, R.H., Oxygen and photoinactivation of Escherichia coli in UVA and sunlight: J. Appl Microbiol. 99, pp. 39-50, 2005.

[18] WHO. Monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for Artemisia annua L. Switzerland. Organización Mundial de la Salud, 2006.

[19] Lutgen, P. and Bernard, M., Bactericidal properties of artemisia annua tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light. Datos no publicados. 2008.

[20] Lutgen, P., La Tisane d'Artemisia annua une puissante polythérapie!. Memorias 2ème congrès Maladies tropicales, aspects humanitaires et scientifiques. Luxembourg, Avril 2009.

- [21] Juteau, F., Masotti, V., Bessie're, J. M., Dherbomez, M. and Viano, J., Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia*, 73, pp. 532-535, 2002.
- [22] Madigan, M., Martinko, J. M. Parker, J. y Sánchez, M., Brock: *Biología de los microorganismos*. Southern Illinois University Carbondale, 2003.
- [23] Riesenman, P. J. and Nicholson, W. L., Role of the Spore Coat Layers in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar Uv Radiation: *Appl. Environ Microbiol.* 66, pp. 620-626, 2000.
- [24] Driedger, A., Staub, E., Pinkernell, U., Mariñas, B., Koster, W. et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation: *Water research*. 35(12), pp. 2950-2960, 2001.
- [25] Allahdin, O., Gothard-Bassebe, M., Biteman, O., Foto, E., Mabingui, J. et al. Essay about the disinfection of well water by *Artemisia annua* in Central African Republic (CAR). Datos no publicados. 2008.
- [26] Mueller, M. S., Karhagomba, I. B., Hirt, H. M., y Wemakor, E., The potencial of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the topics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J. Ethnopharmacol.* 73(3), pp. 487-493, 2000.
- [27] APHA-AWWA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22th ed. American Public Health Association. Washington, DC. 2012.
- [28] Wegelin, M., Canonica, S., Mechsner, K., Fleischmann, T., Pesaro, F. and Metzler, A., Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. *J. Water SRT-Aqua*, 43 (3), pp. 154-169, 1994.
- [29] Joyce, T. M., Mcguigan, K. G, Elmore-Meegan, M. y Conroy, R. M., Inactivation of faecal bacteria in drinking water by solar heating: *Appl. Environ Microbiol.* 62, pp. 399-402, 1996.
- [30] Martin, A., Alarcon, M. T., Martín, I. R., y Gonzalez, A., Efficiency in the disinfection of water for human consumption in rural communities using solar radiation. *Solar Energy* 78 (1), pp. 31-40, 2005.
- [31] Nicholson, W. L., Munakata, H., Melosh, H. J. and Setlow, P., Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol.* 64, 548-572, 2000.
- [32] Luke, M., Garcia, F. y Palacio, C., Determinación del T90 en la Bahía de Santa Marta (Col). *Rev. Dyna*, 78 (167), pp. 122-131, 2011.
- [33] Berney, M., Weilenmann, H. U. and Egli, T. "Flow cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS)": *Microbiol*, 152, pp. 1719-1729, 2006.
- [34] Bhakuni, R. S., Jain, D. C., Sharma, R. P. and Kumar, S., Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*, 80 (1), pp. 35-48, 2001.
- [35] Cavar, S., Maksimovi'c, M., Vidica, D., y Pari, A., Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind.Crops Prod.* 37, pp. 479-485, 2012.
- [36] Vermaa, R. K., Chauhana, A., Vermaa, R. S. and Guptab, A. K., Influence of planting date on growth, artemisinin yield, seed and oil yield of *Artemisia annua* L. under temperature climatic conditions. *Ind.Crops Prod.* 34, pp. 860-864, 2011.