

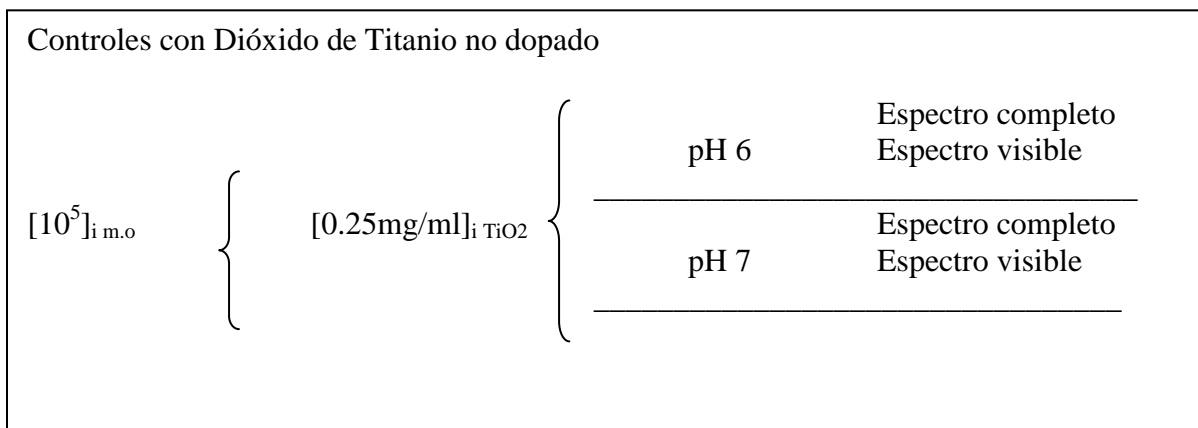
9 MATERIALES Y MÉTODOS.

Se evaluó la inactivación de *Escherichia coli* ATCC 25922 en agua destilada utilizando Dióxido de Titanio dopado con Nitrógeno, a diferentes condiciones de pH y de radiación solar (espectro completo y espectro visible, sin UV).

Se probaron 6 valores de pH: 6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 8.5. Se evaluaron grupos control en oscuridad, espectro completo y espectro visible sin catalizador; así, como controles en oscuridad para cada concentración de catalizador.

La concentración inicial de microorganismos en cada reactor se ajustó a 10^5 UFC a partir de un cultivo fresco.

9.1 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.



Ensayos por triplicado con N-TiO ₂		
<p>[10⁵]_{i m.o}</p> <p>[0.1mg/ml]_{i N-TiO₂}</p>	pH 6	Espectro completo Espectro visible
	pH 6.5	Espectro completo Espectro visible
	pH 7	Espectro completo Espectro visible
	pH 7.5	Espectro completo Espectro visible
	pH 8	Espectro completo Espectro visible
	pH 8.5	Espectro completo Espectro visible
	pH 6.	Espectro completo Espectro visible
	pH 6.5	Espectro completo Espectro visible
	pH 7	Espectro completo Espectro visible
	pH 7.5	Espectro completo Espectro visible
[0.25mg/ml] _{i N-TiO₂}	pH 8	Espectro completo Espectro visible
	pH 8.5	Espectro completo Espectro visible

Ensayos por triplicado con N-TiO ₂		
$[10^5]_{i.m.o}$	$[0.5mg/ml]_{i.N-TiO_2}$	pH 6 Espectro completo Espectro visible
		pH 6.5 Espectro completo Espectro visible
		pH 7 Espectro completo Espectro visible
		pH 7.5 Espectro completo Espectro visible
		pH 8 Espectro completo Espectro visible
		pH 8.5 Espectro completo Espectro visible

Controles con N-TiO ₂ sin radiación		pH 6	Obscuridad	
		pH 6.5	Obscuridad	
[10 ⁵] _{i m.o}	[0.1mg/ml] _{i N-TiO2}	pH 7	Obscuridad	
		pH 7.5	Obscuridad	
		pH8	Obscuridad	
		pH 8.5	Obscuridad	
		[0.25mg/ml] _{i N-TiO2}	pH6	Obscuridad
			pH6.5	Obscuridad
			pH 7	Obscuridad
	pH 7.5		Obscuridad	
	pH 8		Obscuridad	
	[0.5mg/ml] _{i N-TiO2}	pH 8.5	Obscuridad	
		pH 6	Obscuridad	
		pH 6.5	Obscuridad	
		pH 7	Obscuridad	
		pH 7.5	Obscuridad	
		pH 8	Obscuridad	
pH8.5		Obscuridad		

9.2 DISEÑO DEL MONTAJE.

9.2.1 DISEÑO DEL REACTOR Y MONTAJE EXPERIMENTAL.

Debido a la necesidad de captación de luz solar se diseñaron bioreactores utilizando matraces de vidrio pyrex. Para aquellos ensayos en los que se elimina la fracción UV del espectro, se utilizó un filtro de polimetilmetacrilato.

Los reactores se prepararon conteniendo 300 ml de agua destilada, la concentración establecida de catalizador y ajustando el pH al valor deseado, utilizando H_2SO_4 o $NaOH$ (0.1 M).

Los reactores se colocaron en exposición a la luz solar, con y sin filtro UV, verificando que el área de irradiación coincidiera con el área de exposición. Para evitar el asentamiento del catalizador y garantizar su distribución homogénea y su exposición a la luz, se utilizó un agitador magnético en la base del matraz.

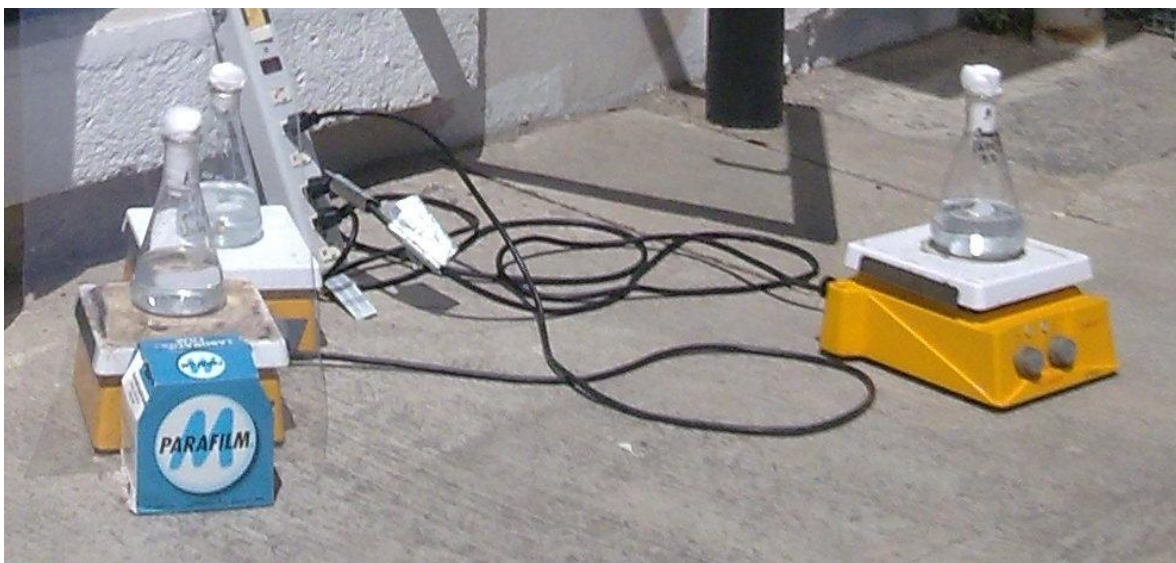


Figura 1. Montaje experimental. Reactores expuestos a radiación solar en espectros completo y con filtro ultravioleta.

9.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO: CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO INDICADOR: *ESCHERICHIA COLI* Y DETERMINACIÓN DE LA CUENTA VIABLE.

Se usaron cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 del cepario del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de las Américas, Puebla. Estas cepas se sembraron, cultivaron y conservaron en medio Soya Tripticasa (ST) (ver apéndice B).

Cultivos frescos de *E. coli* se inocularon en caldos de medio Soya Tripticasa (TS) y se mantuvieron en crecimiento durante la noche encubados a 37°C en un agitador. A las 12 horas de incubación y durante su fase de crecimiento exponencial, se determinó la concentración celular de los medios, mediante absorbancia por espectrofotometría (a 620 nm), con referencia en cuenta de Mac Farland (véase Apéndice B). Una vez conocida la concentración en los cultivos se determinó el volumen necesario para obtener, a partir de ellos, una concentración celular de 10^5 UFC/ml en los reactores conteniendo un volumen final de 300 ml; las bacterias fueron colectadas e inoculadas en la solución estéril contenida en los reactores (300 ml de agua destilada y N-TiO₂) y expuestas a la radiación solar.

A lo largo de los ensayos se colectaron diferentes muestras a los 5, 10, 15, 25, 35, 60, 90 y 180 minutos. Se tomaron 100 µl de la solución y se diluyeron en 900 µl de solución salina (agua destilada con 8.5% de NaCl). Posteriormente se hicieron 5 diluciones seriadas de la misma magnitud y de cada una de ellas se depositaron 10 µl en placas con agar Soya Tripticasa. Después de incubar estas placas durante la noche a 37°C, se realizó el recuento de las UFC por ml.



En las placas se dibujaron cuadrantes en los cuales se depositaron los 10 µl provenientes de cada dilución como se aprecia en la Figura 9.

1X10 ⁻³	1X10 ⁻⁴	1X10 ⁻⁵
1X10 ⁻⁶	1X10 ⁻⁷	1X10 ⁻⁸
1X10 ⁻⁹	1X10 ⁻¹	Blanc

Figura 2. Cuadrícula de placas conteniendo 10µl de cada dilución.

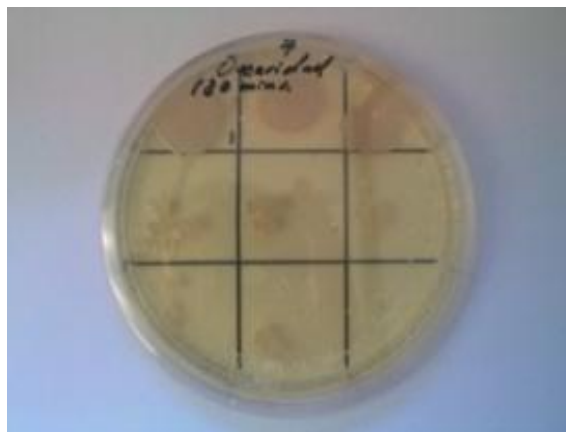


Figura 3. Ensayo control de oscuridad con N-TiO₂ a los 180 minutos.

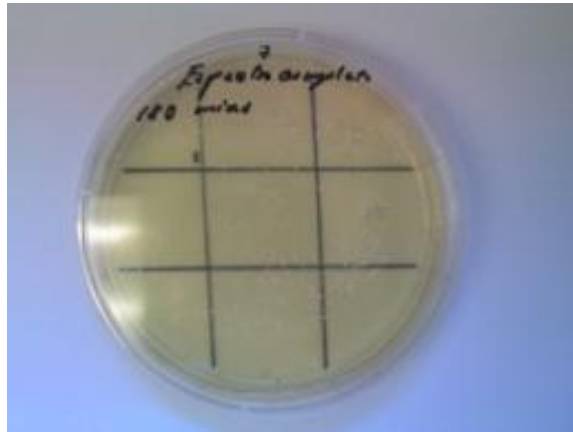


Figura 4. Ensayo con espectro solar completo, 0.25 mg/ml de N-TiO₂ a los 180 minutos.

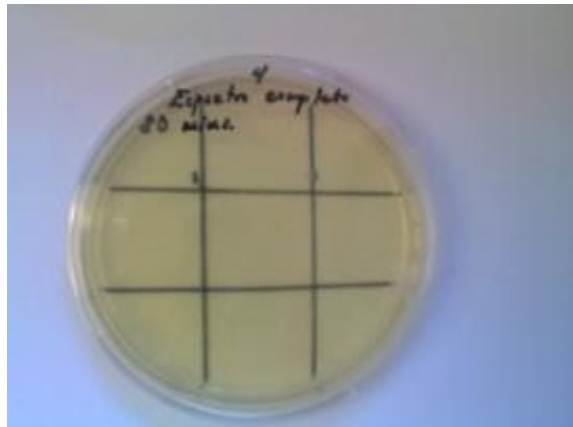


Figura 5. Ensayos con espectro solar completo, 0.25 mg/ml de N-TiO₂ a los 80 minutos.



Figura 6. Placas que muestran cuentas viables de los ensayos.

La toma de muestras de los reactores se realizó bajo condiciones de esterilidad. La pureza del cultivo fue examinada por morfología microscópica y colonial en placas de medio ST al final de cada experimento.

El uso de *E. coli* como microorganismo indicador se debe al amplio conocimiento que se tiene sobre esta bacteria, su fisiología celular y sus requerimientos; además, es fácil de conseguir, factible económicamente, fácil de manipular, de determinar espectrofotométricamente y de contar sus Unidades Formadoras de Colonias.

En la actualidad se cuenta con una amplia gama de investigaciones previas de *E. coli* como modelo en tratamiento de agua. De igual manera es importante porque es un microorganismo que se encuentra en aguas contaminadas por compuestos biológicos, y algunas cepas son causantes de diversas enfermedades que pueden llegar incluso a causar la muerte (Blanco & Malato, 1996).

A lo largo de los ensayos realizados se obtuvieron los valores de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) contenidas en los reactores a diferentes tiempos de comenzado el proceso.

Cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados de la inactivación de la bacteria se presentan como el promedio de tres experimentos independientes. Los datos finales se expresan en el análisis como la fracción de sobrevivida C/C_0 , en donde C es el número de bacterias al tiempo t y C_0 es el número inicial de bacterias en el reactor (Véase Apéndice A) y como el promedio de las UFC/ml registradas en las muestras al tiempo t.

La ecuación correspondiente a la desinfección del microorganismo es una ecuación de primer orden: $\ln C/C_0 = kt$.

Se obtuvieron los datos de $\ln (C/C_0)$ y se graficaron contra el tiempo de radiación; de esta forma se obtuvo el valor de la constante de degradación, correspondiente al valor negativo de la pendiente de la gráfica. Una vez contando con estos datos se analizaron los efectos del catalizador y de la radiación solar sobre el microorganismo indicador.

9.3 GRUPOS CONTROL.

Se realizaron los ensayos respectivos a los grupos control que señalan, a diferentes valores de pH, el efecto del espectro solar completo (Vis+UV) y visible (sin UV) sobre el microorganismo, sin presencia del catalizador; el efecto del catalizador sin radiación y la eficiencia de desinfección del TiO₂ sin modificar.