

10 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES.

10.1. CONTROLES ESPECTRO COMPLETO, SIN CATALIZADOR, DIFERENTES PH.

Se evaluó la muerte celular bacteriana en ausencia del semiconductor bajo radiación solar en ensayos control. Se comprobó el efecto de desinfección que tiene la exposición de los microorganismos a la radiación solar. Los resultados muestran que el espectro solar, por sí solo (radiación UV, visible e IR), genera la desinfección total en todos los valores pH evaluados a un tiempo aproximado a los 60 min, con excepción del pH7 y pH7.5 (consistente con lo reportado por (Liu, Li, Qui, & Burda, 2007), en donde se alcanza la eliminación total pero a un tiempo muy elevado de radiación (Véase figura 14). Esto, probablemente debido a que conforme el pH se aleja del neutro, aumenta el stress sobre las bacterias, haciéndolas más vulnerables a la radiación y disminuyendo la eficiencia de sus sistemas de reparación.

Las bacterias son destruidas por el efecto sinérgico de las componentes de la radiación solar en las regiones IR y UV-A. La radiación infrarroja conduce al aumento de la temperatura del agua y la desnaturalización de la acción enzimática. La radiación UV, en el rango de longitudes de onda entre 320 y 400 nm, actúa directamente sobre el ADN, ácidos nucleicos y enzimas de las células vivas, cambiando la estructura molecular de las bacterias presentes en el agua y conduciendo a la muerte celular. La radiación UV-A también reacciona con el Oxígeno disuelto en el agua, produciendo especies altamente reactivas de oxígeno. Estas moléculas reactivas también interfieren con las estructuras de las células y matan los organismos patógenos (Litter & Mansilla, 2003).

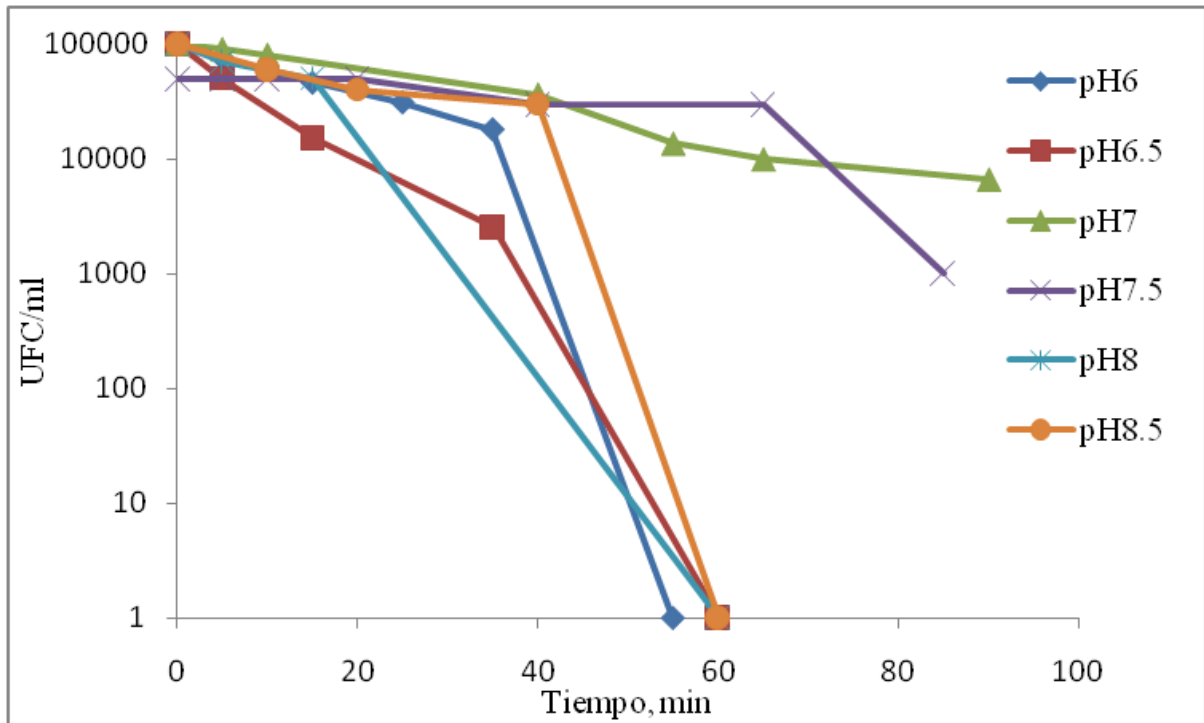


Figura 1. Controles espectro completo (Vis+UV), a diferentes valores de pH.

10.1.1 CONTROLES ESPECTRO VISIBILE, SIN UV, SIN CATALIZADOR, DIFERENTES PH.

Según la (EPA, 1999), para que ocurra una efectiva inactivación bacteriana, los microorganismos deben absorber la radiación UV (EPA, 1999); asimismo, el pH no afecta el proceso de desinfección con UV. En los ensayos control de exposición de los microorganismos al espectro visible, sin la fracción UV y sin catalizador, como se esperaba, el crecimiento microbiano no cesa a lo largo del ensayo puesto que no está presente el espectro UV (véase Figura 15).

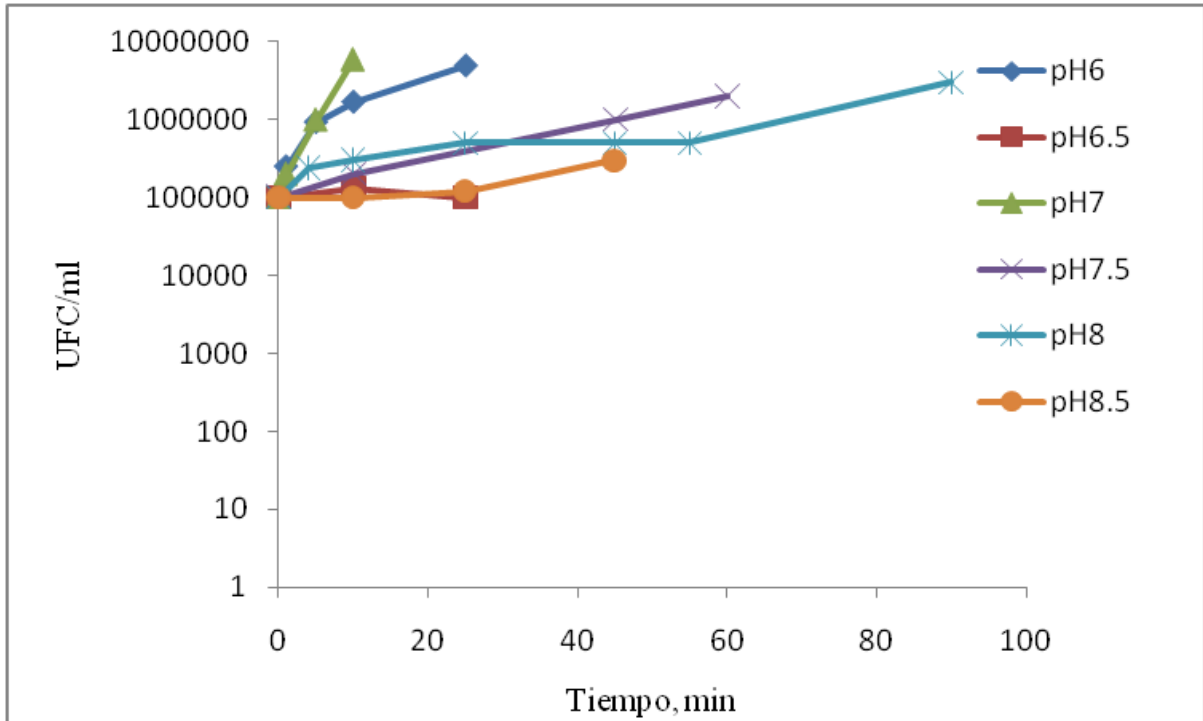


Figura 2. Controles espectro visible (Sin UV), a diferentes valores de pH.

10.1.2 CONTROLES OSCURIDAD, DIFERENTES PH, SIN CATALIZADOR.

Para registrar el efecto que el pH ejerce sobre los microorganismos, se registraron también las UFC/ml en los reactores, sin radiación y sin catalizador, a diferentes valores de pH. A partir de los ensayos control, en los cuales se evaluó el efecto del pH sobre el crecimiento de los microorganismos se determinó que el pH (a los valores evaluados), por sí solo, no afecta negativamente el crecimiento del microorganismo.

10.1.3 CONTROLES N-TiO₂, OSCURIDAD, DIFERENTES PH.

Se evaluó la interacción entre las bacterias y el catalizador en oscuridad incubando diluciones mezcladas del semiconductor con la bacteria a temperatura ambiente. Como se

esperaba, los ensayos control en obscuridad, con diferentes concentraciones de catalizador, bajo diferentes valores de pH no exhiben disminución en la cuenta viable. Los resultados revelaron que no existe muerte celular detectable generada por el catalizador en ausencia de luz; lo cual indica que la toxicidad del catalizador hacia la bacteria no es apreciable bajo estas condiciones experimentales. Estos resultados coinciden con reportes anteriores debido a que el óxido semiconductor es estable, no tóxico y no soluble y produce radicales altamente oxidativos solo bajo la radiación que suficiente para superar la brecha de banda (Winkler, 2003) (Blake, Maness, Huang, Wolfrum, Huang, & Sep, 1999) (Kaneko & Okura, 2000).

10.1.4 CONTROLES DIÓXIDO DE TITANIO SIN DOPAR, ESPECTRO COMPLETO Y VISIBLE, [0.25MG/ML], PH7.

El Dióxido de Titanio sin modificar es un fotocatalizador capaz de utilizar la energía del espectro UV para generar la desinfección. Como grupo control, en este estudio también se utilizó el Dióxido de Titanio como referencia para observar el incremento en la eficiencia de desinfección del N-TiO₂. Se realizaron ensayos con TiO₂ sin modificar y los resultados se presentan en la figura 16. En el gráfico se puede observar que la desinfección se alcanza alrededor de los 180 min, cuando el reactor es sometido al espectro completo de radiación solar (consistente con lo reportado por (Liu, Li, Qui, & Burda, 2007) . Sin embargo, al ser expuestos al espectro visible, los microorganismos no logran ser eliminados. Esto debido a que el TiO₂ sin dopar es capaz de captar únicamente el espectro UV, mismo que está ausente en los ensayos con filtro.

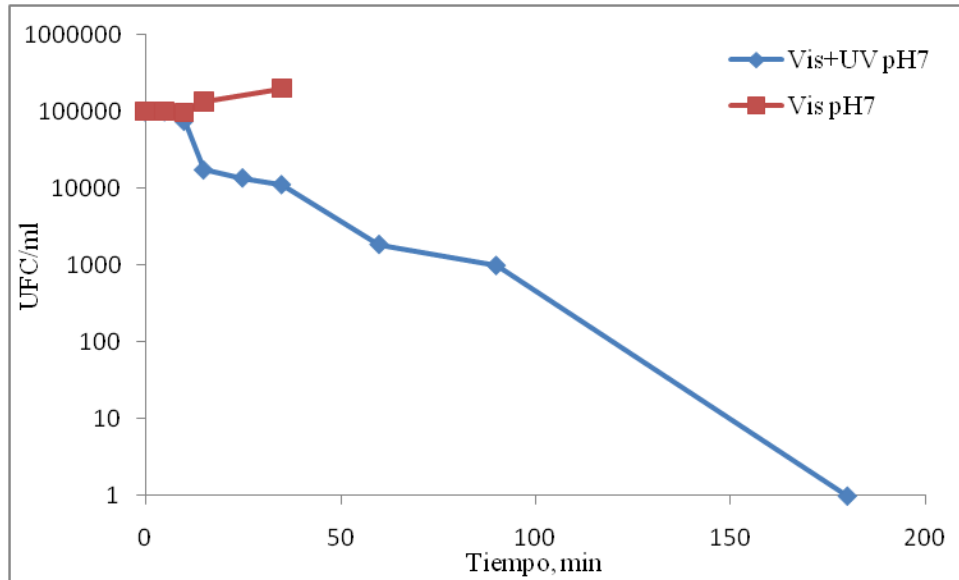


Figura 3. Controles TiO₂ no modificado, espectro completo y visible, pH7.

Después de demostrar la radiación solar visible no provoca la inactivación del microorganismo indicador, se comenzaron los ensayos con fotocatalisis con el objetivo de evaluar el efecto del catalizador irradiado.

10.2 ENSAYOS N-TiO₂, ESPECTRO COMPLETO Y VISIBLE, [0.1, 0.2, 0.5MG/ML], PH6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5.

Una vez conociendo los datos generados en los ensayos control, se realizaron estudios para analizar el efecto del catalizador bajo radiación, a continuación se presentan los resultados obtenidos.

10.2.1 ENSAYOS N-TiO₂, ESPECTRO COMPLETO [0.1, 0.2, 0.5MG/ML], PH6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5.

Los resultados indican que la irradiación durante un periodo aproximado de 60 min produce una reducción significativa en el número de bacterias totales, como se muestra en las Figuras 17 a 22. Estos resultados indican que se pueden eliminar totalmente los microorganismos presentes en la muestra, ya que se alcanza la eliminación completa de microorganismos viables. Por lo tanto, se concluye que el método de fotocátalisis heterogénea con el N-TiO₂ evaluado permite inactivar el microorganismo indicador sin recrecimiento y que el semiconductor muestra aplicaciones potenciales para técnicas de desinfección alternativas para uso ambiental y clínico.

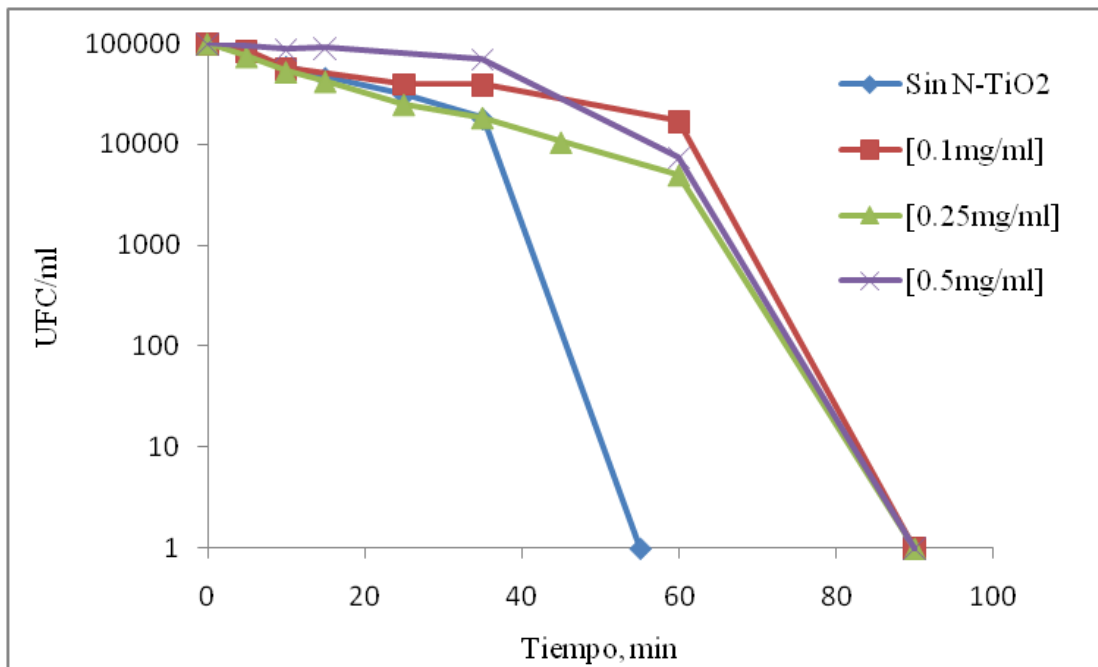


Figura 4. Ensayos espectro completo (Vis+UV), pH6.

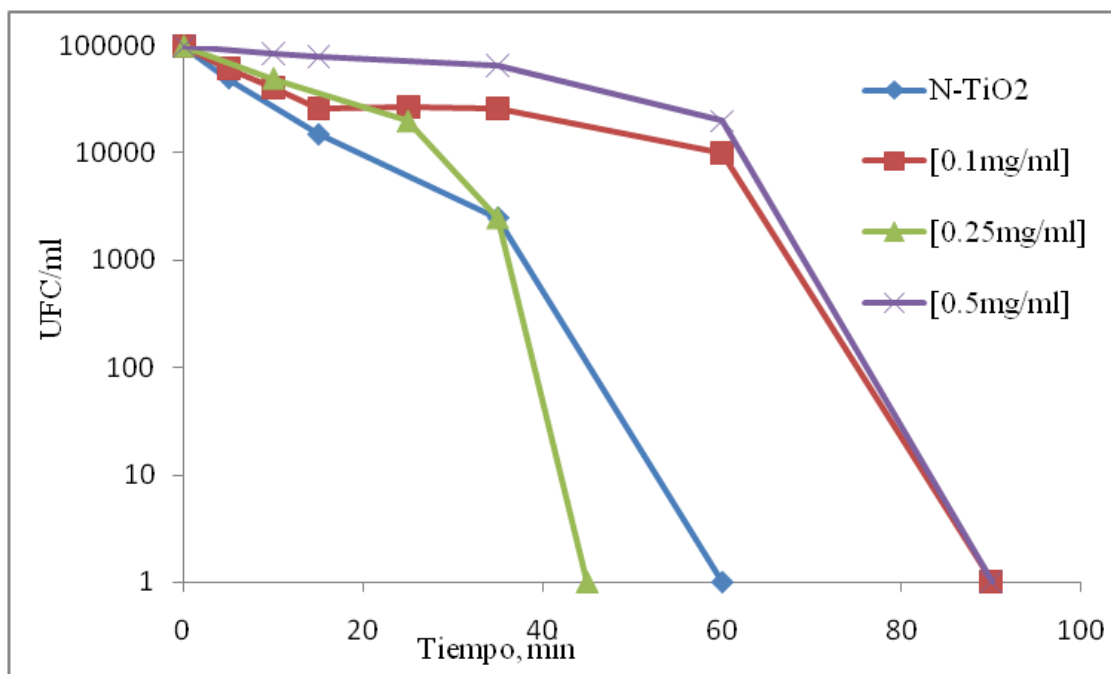


Figura 5. Ensayos espectro completo (Vis+UV), pH 6.5

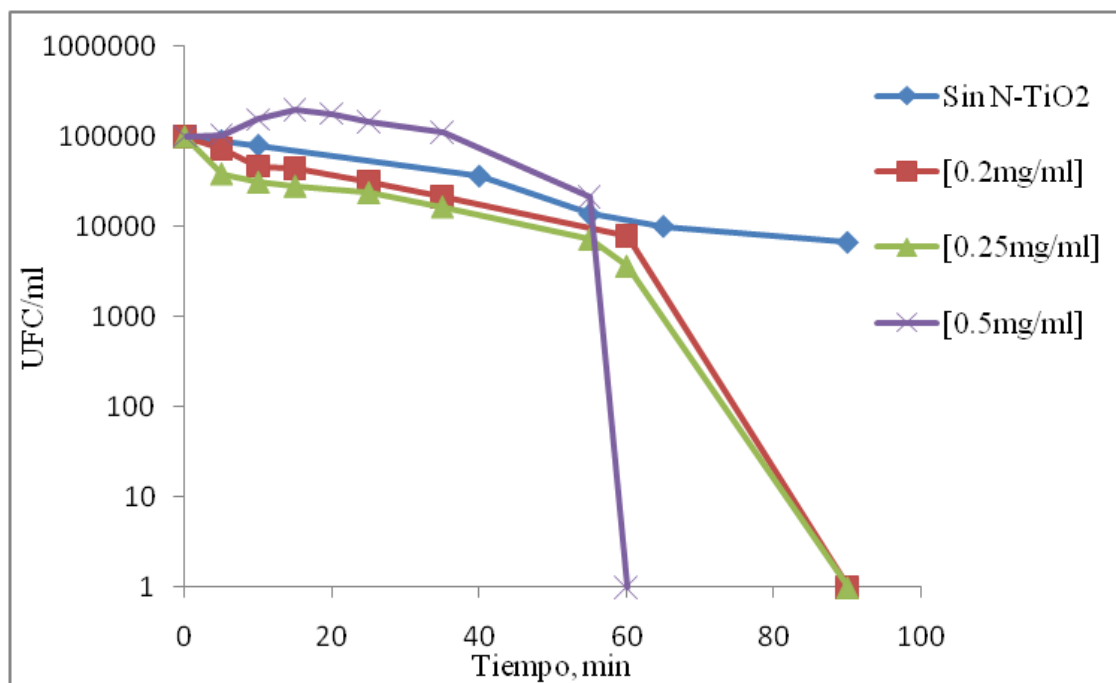


Figura 6. Ensayos espectro completo (Vis+UV), pH7

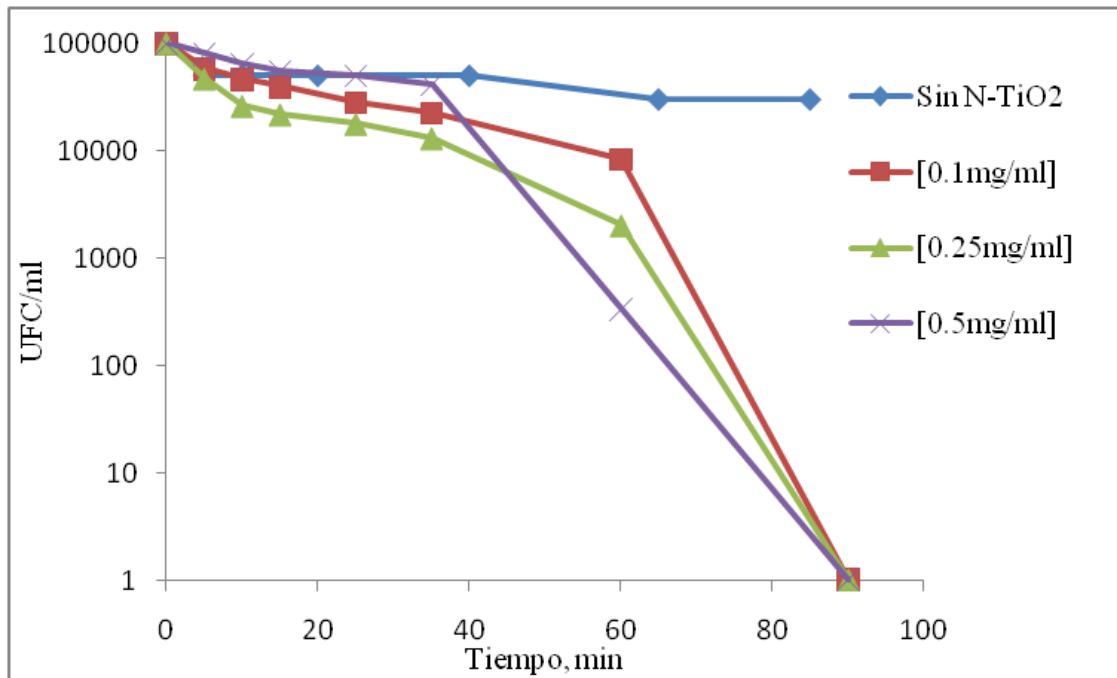


Figura 7. Ensayos espectro completo (Vis+UV), 7.5

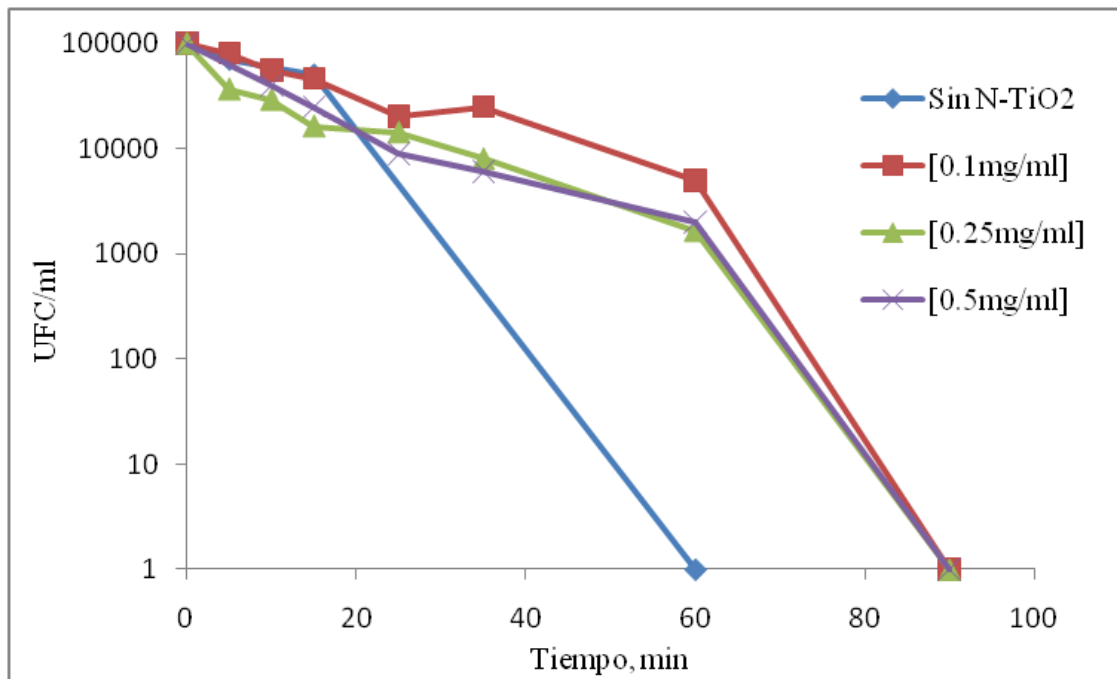


Figura 8. Ensayos espectro completo (Vis+UV), pH8

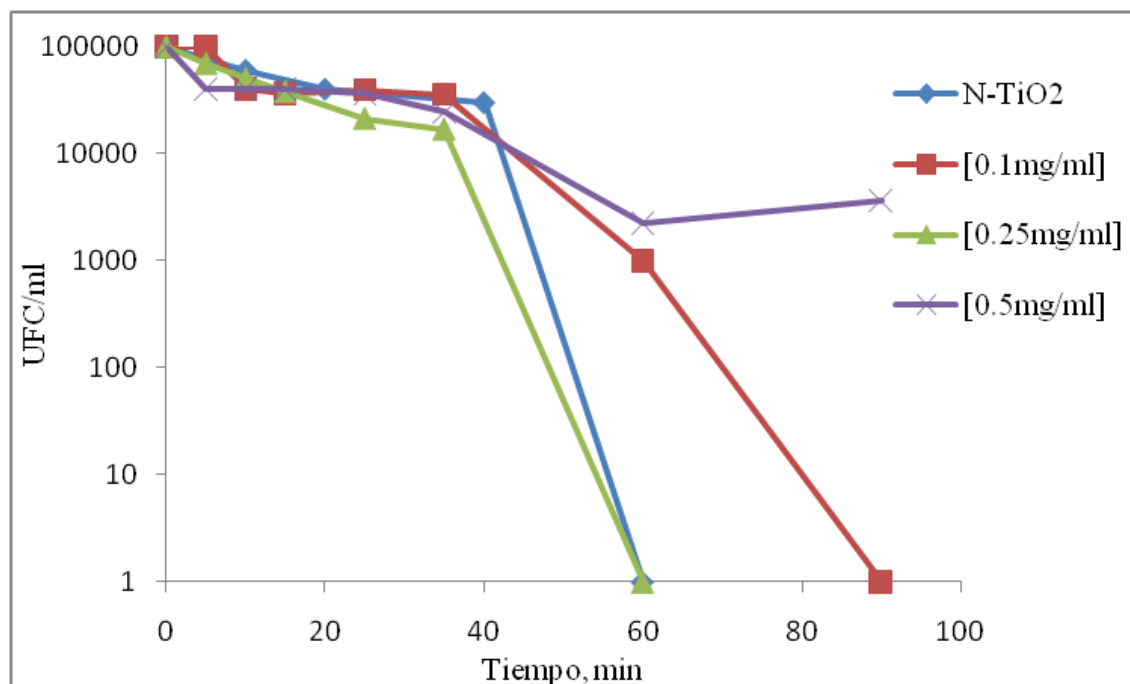


Figura 9. Ensayos espectro completo (Vis+UV), pH8.5

Las bacterias son destruidas por el efecto sinérgico de los componentes de la radiación solar en las regiones infrarrojo y ultravioleta (UV-A). La radiación infrarroja ($\lambda \geq 700\text{nm}$) conduce al aumento de la temperatura del agua y desnaturaliza la actividad enzimática. La radiación UV-A, en el rango de longitudes de onda 320-400 nm, actúa directamente sobre el ADN, ácidos nucleicos y enzimas de las células vivas, cambiando la estructura molecular de las bacterias presentes en el agua y conduciendo a la muerte celular. La radiación UV-A también reacciona con el oxígeno disuelto en el agua, produciendo especies altamente reactivas de oxígeno (radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno). Estas moléculas reactivas también interfieren con las estructuras de las células y matan los organismos patógenos (Litter & Mansilla, 2003).

Además, el efecto bactericida del Dióxido de Titanio ha sido generalmente atribuido a la descomposición de la membrana externa de la bacteria por las especies de oxígeno reactivas (ROS), principalmente radicales hidroxilos (OH^{\bullet}), lo cual conduce a la peroxidación de los fosfolípidos y finalmente a la muerte celular (Liu, Li, Qui, & Burda, 2007).

Gogniat y colaboradores (2006) señalan que la agregación de las bacterias en las partículas de TiO_2 es el punto clave en la muerte celular debido a que los radicales hidroxilos tienen un tiempo de vida media extremadamente corto (10^{-9} s); por lo cual deben ser generados cerca de la membrana celular (Gogniat, Thyssen, Denis, Pulgarin, & Dukan, 2006).

Y se ha comprobado que en el proceso de fotodesinfección, los radicales hidroxilos, el ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) participan en la inactivación de *E. coli* (Liu, Li, Qui, & Burda, 2007).

En las Figuras 17 a 22 se observa que la inactivación fotocatalítica de *E. coli* puede dividirse en tres fases, consistente con estudios anteriores (Liu, Li, Qui, & Burda, 2007).

Inicialmente se presenta una fase larga (aproximadamente 40 min) de inactivación bacteriana, lo cual se atribuye a los mecanismos de defensa bacterianos al ataque ROS en los componentes de la pared celular. Estas estructuras desempeñan el papel principal en el control de la cinética bactericida debido a que la degradación del peptidoglicano, lipopolisacáridos y fosfatidiletanolcolina toma el mayor tiempo en el proceso de desinfección (Liu, Li, Qui, & Burda, 2007) (Kiwi & Nadochenko, 2005).

Después de este tiempo de exposición solar, la bacteria fue fotodegradada a tasas mayores debido a que los radicales libres superan los mecanismos de defensa celular. El ataque a los componentes de la pared celular provoca su ruptura y por consecuencia la pérdida de sus funciones. Posteriormente, la descomposición de la pared celular permite la entrada de especies reactivas que alcanzan la membrana celular y oxidan los fosfolípidos provocando los desórdenes funcionales que conducen a la muerte celular (Srinivasan & Somasundaram, 2003).

Por último, después de los 60 min de iluminación, disminuye la velocidad de inactivación bacteriana hasta el final de los ensayos, probablemente debido a la competencia por los radicales hidroxilo entre las células viables y el material remanente de las células inactivadas durante el proceso fotocatalítico. Conforme la reacción progresa la concentración de los intermediarios metabólicos aumenta; lo cual conduce a la disminución de la tasa de inactivación como se observa en los ensayos con TiO_2 reportados por Gumy y colaboradores (Gumy, y otros, 2006).

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

En donde:

C= Concentración bacteriana al tiempo t.

C₀= Concentración bacteriana inicial.

La pendiente que se obtiene al graficar el ln de C/C₀ contra el tiempo de irradiación t, corresponde al valor negativo del coeficiente de reacción.

Los resultados se muestran en la Tabla 1:

	Sin N-TiO ₂	TiO ₂	N-TiO ₂ [0.1mg/ml]	N-TiO ₂ [0.25mg/ml]	N-TiO ₂ [0.5mg/ml]
pH6	0.0478		0.0277	0.0485	0.0416
pH6.5	0.0646		0.0329	0.0985	0.0257
pH7	0.0327	0.0389	0.0419	0.0434	0.0267
pH7.5	0.0159		0.0374	0.0515	0.0238
pH8	0.0465		0.0482	0.0607	0.0647
pH8.5	0.0292		0.0298	0.0611	0.0534

Tabla 1. Constantes de desinfección a diferentes pH y concentraciones de N-TiO₂, en espectro solar completo.

Al comparar el efecto bactericida del N-TiO₂ probado en *E. coli* ATCC25922 con los resultados obtenidos con TiO₂ puro y con los grupos control, el análisis muestra que la eficiencia de desinfección se incrementa cuando el catalizador se añade al sistema.

10.2.1.1 Dependencia de la desinfección con la concentración de catalizador.

El proceso de desinfección empleando TiO_2 es un método de Oxidación Avanzada ya que se generan altas concentraciones de radical hidroxilo OH^\cdot (Fox & Dulay, 1993). No obstante, la capacidad de desinfección del N- TiO_2 no incrementa conforme su concentración; por lo tanto, se determinó la concentración de N- TiO_2 con la cual se registra la eficiencia más alta en el proceso de eliminación del microorganismo de los reactores.

En los ensayos se alcanza la inactivación total del microorganismo, sin recrecimiento; y en presencia de N- TiO_2 , la concentración que muestra la tasa más alta de eliminación corresponde a los [0.25mg/ml] para todos los valores de pH (con excepción del pH8), seguida de [0.1mg/ml].

El incremento de la concentración de N- TiO_2 provoca el aumento de la tasa de desinfección debido a una mayor cantidad de radicales generados; no obstante, este efecto se atenúa por el efecto de sombreado a partir de la concentración óptima. Como se observa en la tabla de tasas de desinfección, el incremento de las constantes en función de las concentraciones de catalizador disminuye cuando el catalizador aumenta a los [0.5mg/ml].

Durante un proceso fotocatalítico, el contaminante se fija en la superficie del catalizador en donde ocurren las reacciones de óxido-reducción. Al existir cierta cantidad de espacios desocupados para la adsorción, aumenta la cantidad de moléculas de sustrato sobre la superficie del catalizador, aumentando la desinfección. Sin embargo, si la concentración del catalizador excede el óptimo, se presenta un efecto de sombreado (Magrini, 1994) en el cual los microorganismos resultan protegidos contra la radiación; efecto que se observa a lo largo de los ensayos evaluando una concentración de N- TiO_2 igual a [0.5mg/ml] (Véase Tabla1).

Por otro lado, cuando la concentración de N- TiO_2 es menor de la óptima, se presenta un efecto similar de disminución de la eficiencia de desinfección, pero en esta ocasión se debe a la competencia que surge entre los contaminantes y las partículas del catalizador por la energía. Este efecto puede observarse en los ensayos que evalúan la desinfección a concentraciones de N- TiO_2 iguales a [0.1mg/ml]. Se espera que al disminuir o aumentar aún más la concentración del N- TiO_2 en los ensayos el proceso de desinfección se vea aún más disminuido.

10.2.1.2. *Enzimas de defensa bacteriana contra stress oxidativo.*

La catalasa es una enzima muy bien estudiada que los microorganismos producen como una estrategia de protección contra el stress oxidativo.

La función de esta enzima es descomponer el peróxido de hidrógeno en H₂O y O₂ inhibiendo el efecto fotocatalítico bactericida en el sistema.

10.2.1.3. *Efecto del Punto Isoeléctrico en la cinética de desinfección.*

La pared celular de *E. coli* tiene grupos funcionales de carga positiva como las amidas, proteínas y péptidos, y grupos funcionales con cargas negativas como carboxilatos, polisacáridos y fosfatos (Blake, Maness, Huang, Wolfrum, Huang, & Sep, 1999) (Rincon & Pulgarin, 2004) (Kiwi & Nadtochenko, 2004). Estos grupos funcionales están orientados de manera diferente en el espacio y distribuidos sobre la superficie de la pared celular de *E. coli* (Rincon & Pulgarin, 2004). De todas las cargas presentes, los grupos negativos predominan confiriendo una carga total negativa a la pared celular, pero debido a la distribución de los grupos se complica la interpretación de la interacción entre la bacteria y el TiO₂.

El N-TiO₂ evaluado alcanza su Punto Isoeléctrico a pH6; por lo cual tiene carga positiva hasta un valor de pH mayor (similar al TiO₂ Degussa P-25) (Gumy, y otros, 2006), debido a las cargas en la superficie celular se esperaría que la atracción electrostática favoreciera o interfiriera en el coeficiente de reacción al generar atracción o repulsión entre el catalizador y las células. No obstante, las cinéticas son muy similares entre los diversos valores de pH evaluados en los ensayos.

Estos resultados coinciden con los reportados por Gumy y colaboradores (2006) en ensayos con una concentración de TiO₂ Degussa P-25 de 0.2mg/ml, en los cuales la inactivación de

E. coli a pH6 y pH8.5 es similar y donde no se observa que la atracción electrostática sea un factor que controle la cinética del proceso de fotoinactivación bacteriana (Gumy, y otros, 2006).

En términos estrictamente electrostáticos, la inactivación de *E. coli* debería resultar favorecida a valores de pH debajo de 6 y disminuida a valores de pH mayores, debido a la carga negativa de la bacteria; sin embargo, no se observa este fenómeno en los ensayos.

Gumy y colaboradores (2006) han reportado también que los valores de pH iniciales de las soluciones se desplazan hacia valores más ácidos conforme la reacción progresa, lo cual genera cargas positivas en la superficie del catalizador, favoreciendo la atracción electrostática con la bacteria. Las moléculas de agua adsorbidas en el semiconductor permiten la transferencia de la deficiencia electrónica de la banda de valencia mediante la siguiente reacción:



Lo cual contribuye a explicar la variación del pH de la solución hacia valores más ácidos durante la inactivación de *E. coli*. También se deben tomar en cuenta las cargas positivas de la pared celular aún cuando constituyen una minoría.

El pH6.5 resulta ser el más eficiente para desinfección por fotocátalisis heterogénea debido a que, a este pH las proteínas de membrana de *E. coli* se desestabilizan y se incrementa el efecto de los radicales hidroxilos en la membrana, favoreciendo el daño celular.

Las inconsistencias en los datos pueden explicarse debido a las fluctuaciones de la radiación durante los experimentos, ya que el análisis no se generó en función de la energía proveniente de la luz UV utilizada por el sistema, ni de su rendimiento en radicales libres; sino meramente en el tiempo de exposición a la radiación que a su vez presentó variaciones conforme a al clima. Se sugiere continuar la investigación tomando en consideración las variables mencionadas y empleando una fuente de radiación artificial fija que simule el espectro solar.

Una vez conociendo la eficiencia del N-TiO₂ en la desinfección del microorganismo bajo el espectro solar completo, se procedió a analizar su efecto bajo irradiación del espectro solar

visible. Es importante recordar que el TiO_2 solo se activa con la fracción UV; por lo que, si se logra aprovechar un espectro más extendido, el rendimiento del proceso puede mejorar y ser más eficiente.

10.2.2 ENSAYOS DIÓXIDO DE TITANIO DOPADO CON NITRÓGENO, ESPECTRO VISIBLE, [0.1, 0.2, 0.5MG/ML], PH6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5.

Los resultados indican que la irradiación durante un periodo aproximado de 90 min produce una reducción significativa en el número de bacterias totales como se muestra en las Figuras 23 a 28. Con estos datos se comprueba que el catalizador absorbe más allá del espectro UV dado que, en la mayoría de los ensayos se alcanza la desinfección al filtrar el espectro solar.

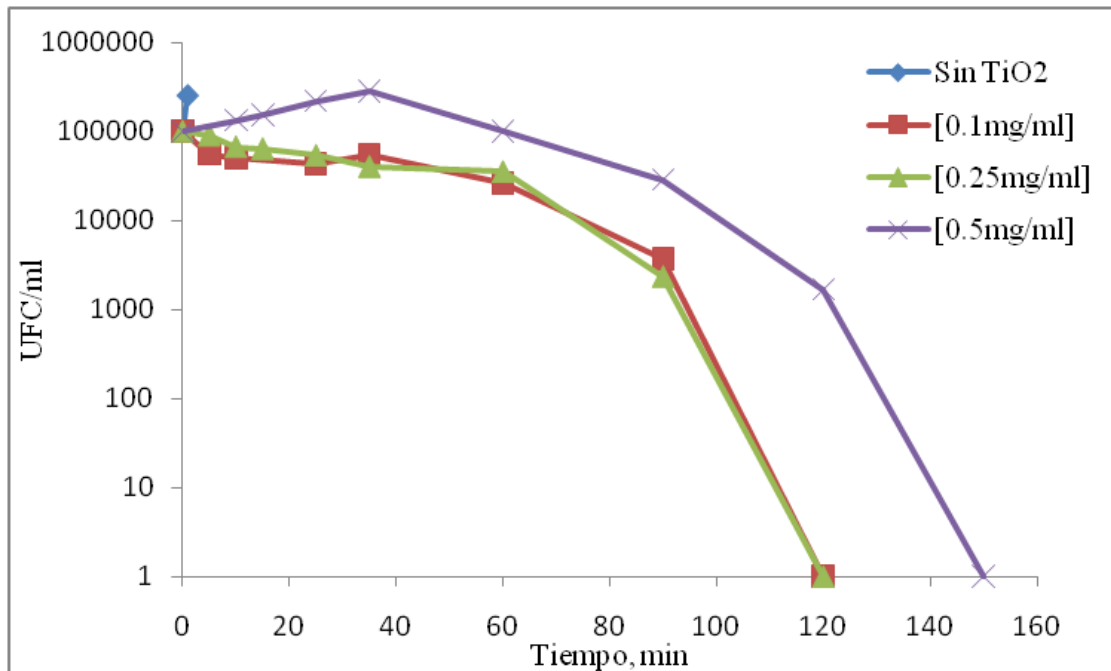


Figura 10. Ensayos espectro visible (Sin UV), pH6

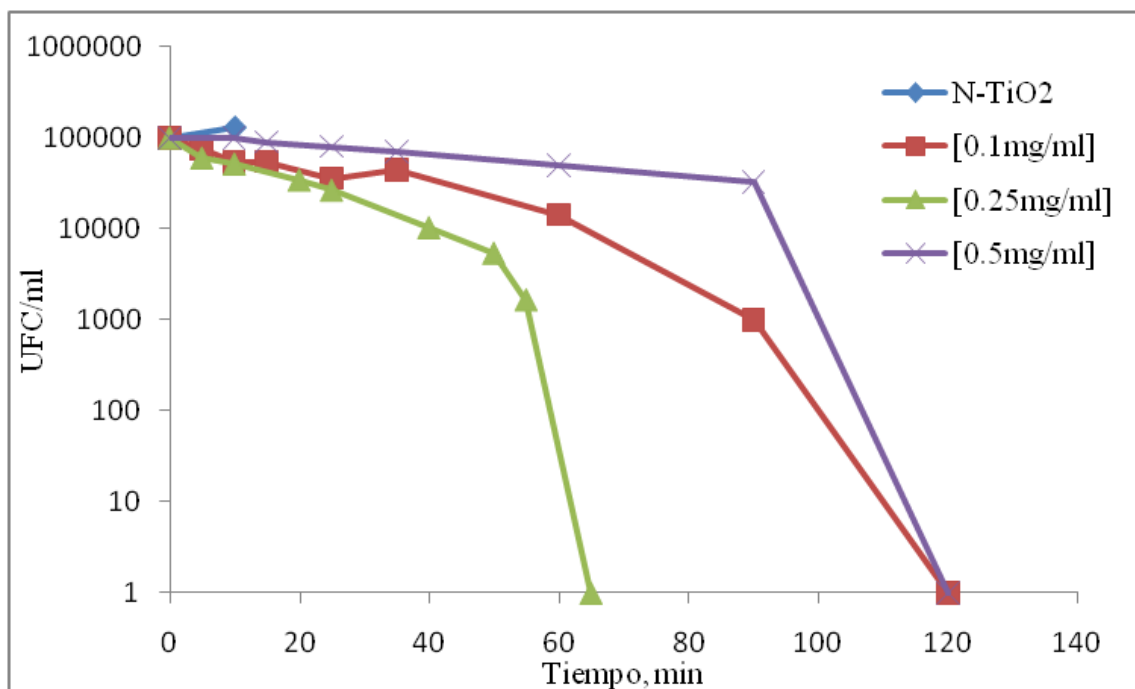


Figura 11. Ensayos espectro visible (Sin UV), pH6.5

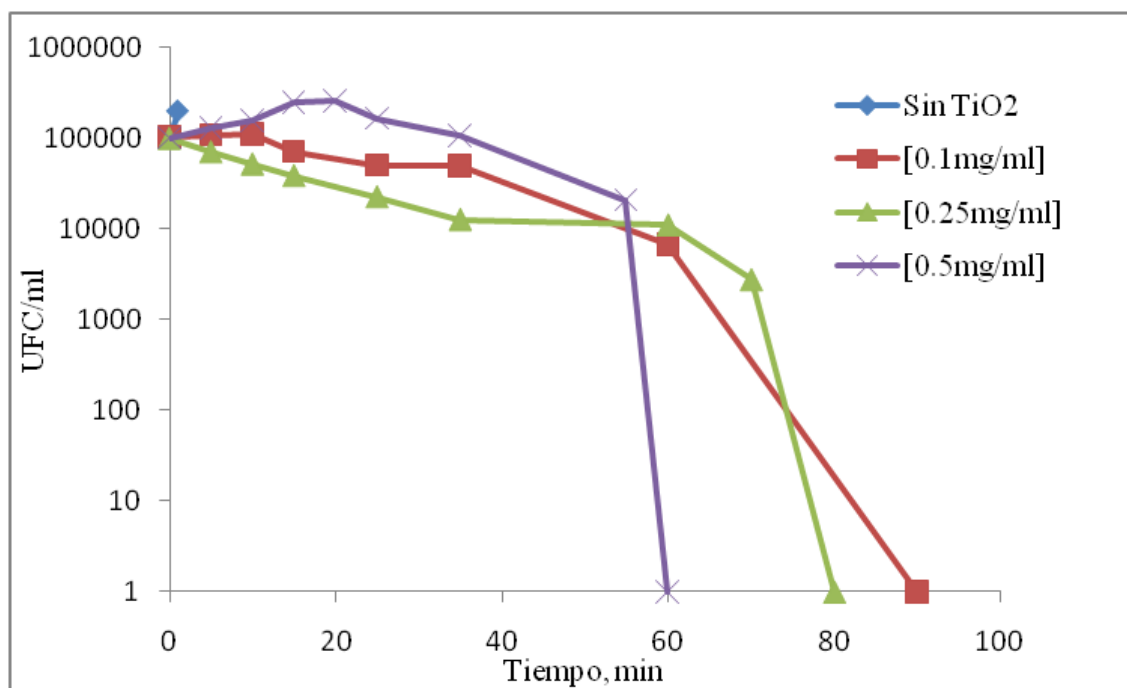


Figura 12. Ensayos espectro visible (Sin UV), pH7

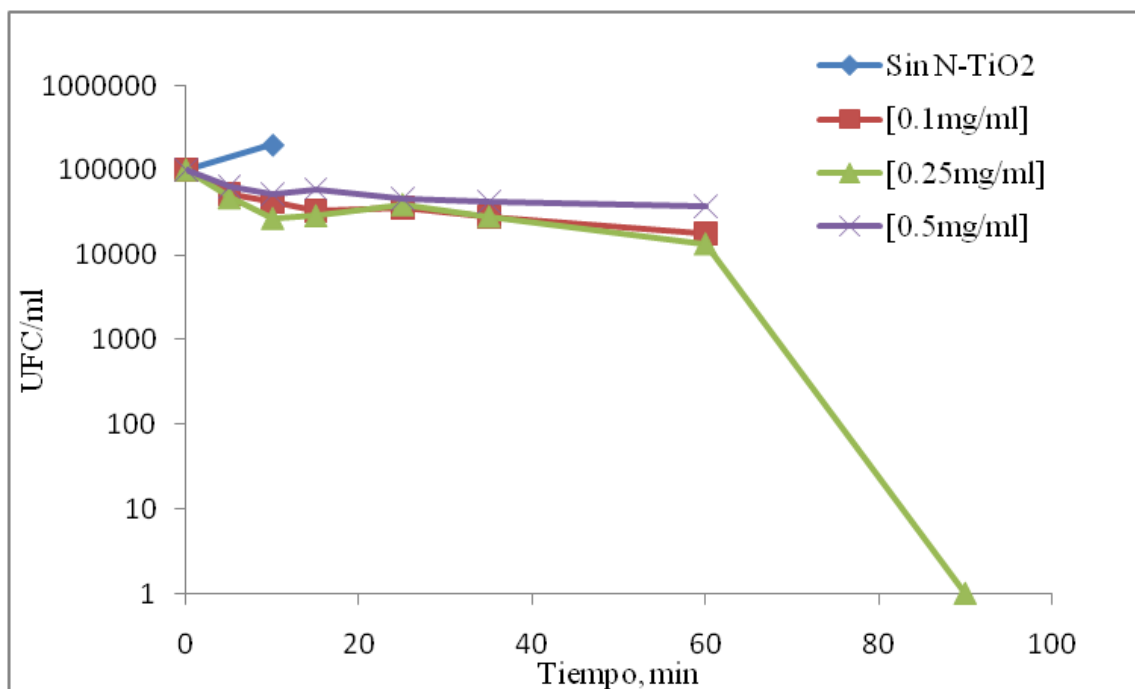


Figura 13. Ensayos espectro visible (Sin UV), pH7.5

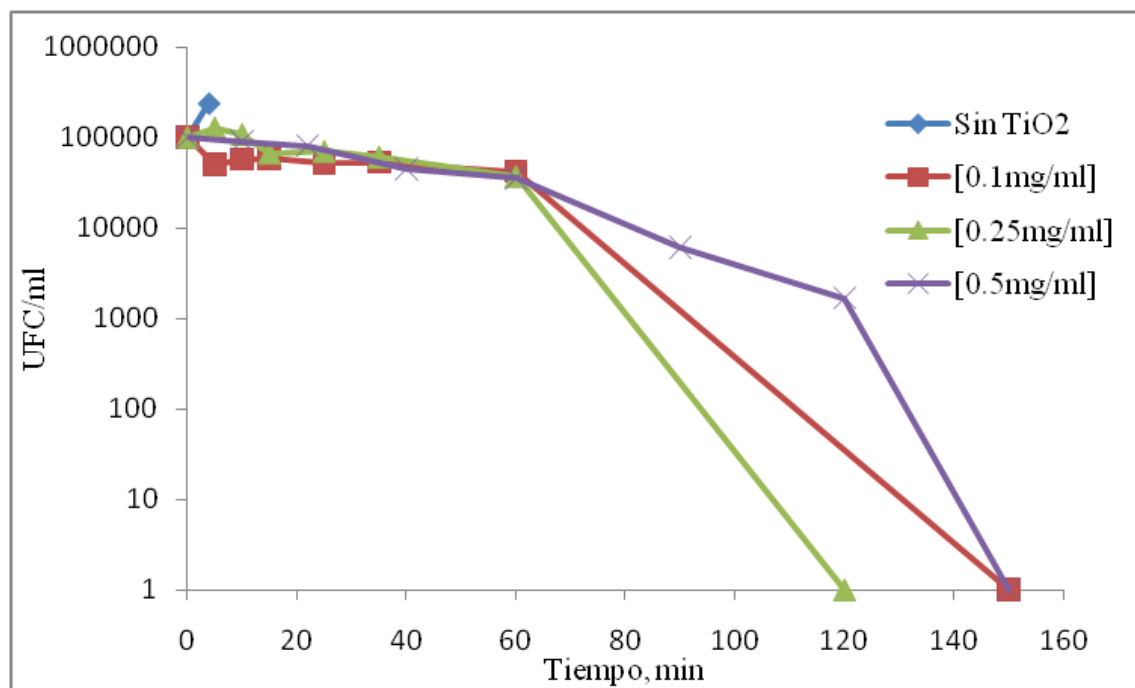


Figura 14. Ensayos espectro visible (Sin UV), pH8

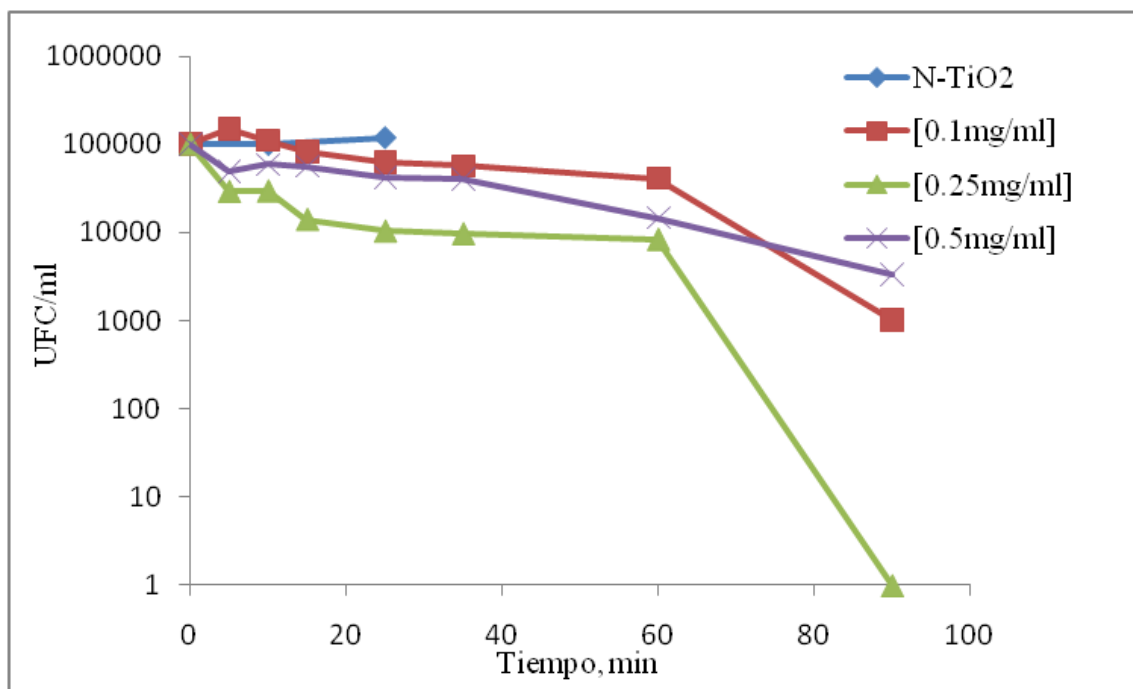


Figura 15. Ensayos espectro visible (Sin UV), pH8

Nuevamente, en los ensayos se observa que la inactivación fotocatalítica de *E. coli* puede dividirse en tres fases; sin embargo, en ausencia de radiación UV disminuye la cinética de desinfección. Gummy y colaboradores (2006) han reportado que la cinética de inactivación de *E. coli* incrementa conforme aumenta la intensidad de la luz que incide en el reactor. Conforme la intensidad de la luz aumenta, incrementa también la cantidad de pares e^-/h^+ , de radicales hidroxilos y de otros radicales oxidativos generados en la superficie del catalizador activa durante la desinfección (Gummy, y otros, 2006).

En estas condiciones, la fase inicial de inactivación bacteriana se extiende hasta los 60 min, debido a que en ausencia de radiación UV no hay daño al DNA y disminuye la producción de radicales hidroxilos; por lo tanto, los mecanismos bacterianos de defensa al ataque ROS en la membrana celular son más eficientes. Después de este tiempo de exposición solar, la bacteria fue fotodegradada a tasas mayores; y finalmente se presenta la tercera fase de cinética disminuida hasta el final de los ensayos, por la competencia por los radicales hidroxilo entre las células viables y los metabolitos intermedios remanentes de las células inactivadas durante el proceso fotocatalítico.

Los valores de las cinéticas de desinfección para todas las condiciones evaluadas en radiación visible se muestran en la tabla 2:

	[0.1mg/ml]	[0.25mg/ml]	[0.5mg/ml]
pH6	0.0299	0.0233	0.0151
pH6.5	0.0288	0.0650	0.0130
pH7	0.0451	0.0509	0.0294
pH7.5	0.0148	0.0243	0.0131
pH8	0.0090	0.0189	0.019
pH8.5	0.0194	0.0343	0.0335

Tabla 2. Constantes de desinfección a diferentes pH y concentraciones de N-TiO₂, en espectro solar visible.

Las constantes contenidas en la tabla 2 indican que en los ensayos sin exposición a la radiación UV se presenta el proceso de desinfección, y aún cuando las constantes son menores que en los procesos con radiación solar completa, el catalizador funciona a diferencia de los grupos control con TiO₂ sin modificar. Este descenso en la eficiencia de desinfección se atribuye a la ausencia de radiación UV por lo que no se genera daño celular por radicales libres.

Nuevamente la concentración en la que se presenta la cinética de desinfección más alta se ubica en los [0.25mg/ml] de N-TiO₂, seguida de [0.1mg/ml].

Se sugiere continuar el análisis del proceso de fotocatalisis evaluando el efecto de la radiación total como variable independiente sustituyendo al tiempo de radiación, y su rendimiento en radicales libres; dado que, los ensayos se realizaron en condiciones ambientales variables y, en el caso de nubes espesas, se provoca un bloqueo considerable de la luz solar.