

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Matriz experimental

Los experimentos de desinfección se realizaron con radiación solar simple y catalizada. Todos ellos se realizaron en un rango de temperatura ambiente entre 20-24° C. Las suspensiones de prueba se realizaron con agua sintética producida en base a agua destilada – desionizada (DD) y un buffer fosfato 0.01 M pH 6.0 para el experimento con cloro. Además de agregar alícuotas de 0.1-0.2 mL de microorganismos Esporas *Bacillus Subtilis* y concentraciones de 100µL de desinfectante para el experimento de desinfección con cloro, además se controló la temperatura mediante una tina de recirculación de agua, la cual mantuvo en baño maría a los reactores de prueba a una temperatura de 30° C.

3.2 Preparación de esporas *Bacillus subtilis*

El concentrado de esporas de *Bacillus subtilis* que se empleó para la fase experimental de este proyecto de tesis fue el mismo que se utilizó en los estudios de Guisar (2006) y Uscanga (2006). De forma muy breve el procedimiento para preparar un concentrado de esporas se divide en cuatro fases: **inoculación, esporulación, limpieza de esporas** y **shock térmico**. La **inoculación** consiste en colocar el caldo de soya con el sembrado de *Bacillus subtilis* en una incubadora durante 24 horas. Posteriormente se realiza la preparación de agar para dejarlo solidificar y agregarle un mililitro del caldo de soya

inoculado e incubar durante 7 días para lograr la **esporulación**. A continuación es necesario realizar la **limpieza de esporas**, que consiste en separar la mayor cantidad de esporas del caldo de soya, mediante enjuague y centrifugado de la muestra. Y finalmente el **shock térmico** que consiste en colocar las esporas *Bacillus subtilis* a una temperatura de 4° C.

3.3 Radiación solar simulada

Para la ejecución de los experimentos se utilizó un simulador solar Modelo 16S-150 (Solar Light Co., Glenside, PA), con la capacidad de emitir radiación equivalente a la de un sol ($\sim 1,100 \text{ W/m}^2$) a una distancia aproximada de 25.0 cm de la fuente (ver figura 3.1). El simulador utiliza una lámpara de xenón de 150 watts. , la cual genera un espectro solar completo (250-2,500 nm), como el que se muestra en la figura 3.2.



Figura 3.1 Arreglo experimental utilizado para pruebas de desinfección con radiación solar simulada.

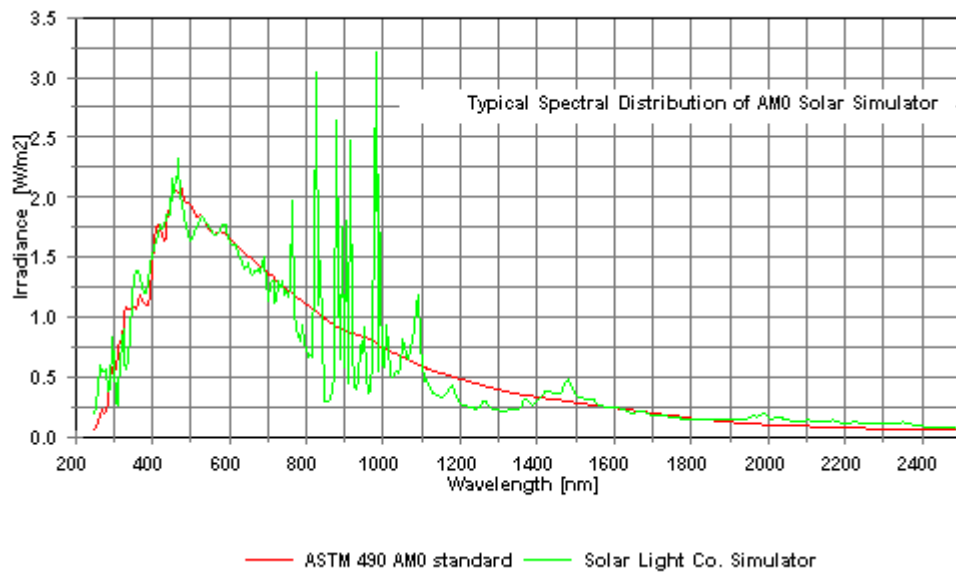


Figura 3.2 Espectro de la radiación emitida por el simulador.

Se puede observar la similitud entre el espectro emitido y el espectro solar real es muy adecuada y con ello se simula satisfactoriamente el rango ultravioleta, visible y buena parte de la fracción infrarroja.

El simulador solar cuenta con un potenciómetro que permite regular la intensidad y cantidad de radiación. Con este potenciómetro pueden medirse simultáneamente la corriente (Amperes) y el voltaje al que se encuentra conectado el equipo. Mediante un par de botones de ajuste (uno de ajuste “grueso” y otro de ajuste “fino”), el usuario puede incrementar o disminuir la corriente y con ello ajustar la potencia de salida de la lámpara a un valor adecuado.

La intensidad de la radiación puede medirse de manera puntual utilizando un piranómetro acoplado con un sensor de amplio espectro. Debido a problemas técnicos con el

funcionamiento del piranómetro, se opto por determinar la intensidad de la radiación utilizada con un procedimiento de “biodosimetría”

La biodosimetría consiste en la caracterización de la intensidad mediante resultados anteriores obtenidos por Guisar (2006) y Uscanga (2006), en los cuales se determinaron la eficiencia de la inactivación de esporas por radiación solar con intensidad definida con la ayuda de un radiómetro, al tener los porcentajes de inactivación e intensidad se realiza una curva de calibración de la radiación solar utilizada para determinar la intensidad utilizada para el experimento de este proyecto.



Figura 3.3 Piranómetro.

3.4 Análisis de viabilidad de esporas de *Bacillus subtilis*

Todas las muestras recolectadas durante la ejecución de una prueba de desinfección fueron colocadas en tubos de centrifugado de 50.0 mL (como se muestra en la figura 3.4) y

almacenadas a 4° C por un plazo máximo de 48 horas en un refrigerador convencional (ver figura 3.5).

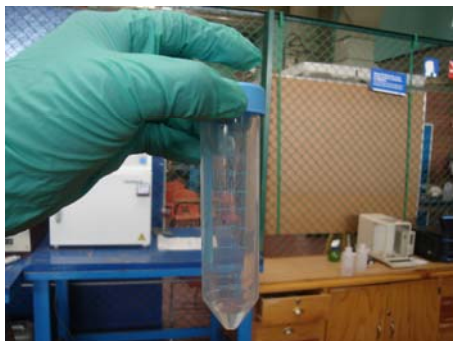


Figura 3.4 Tubo de centrifugado para colocarlo en refrigeración.



Figura 3.5 Refrigerador donde se mantienen los tubos de centrifugado.

Para cada uno de los experimentos se preparó agar nutriente en un matraz Erlenmeyer para un volumen de 0.5 L se le introdujo un agitador al matraz y éste a su vez se colocó en una parrilla (se enciende la opción de calentado y agitado al mismo tiempo). Este proceso termina cuando el agar toma una forma uniforme, sin ningún grumo, posteriormente el matraz con agar deber ser esterilizado en una autoclave.

El matraz debe dejarse enfriar para poder trabajar con él, para controlar el tiempo de enfriamiento se utilizó un baño María (Rocha S.A., Modelo Im 80 T) a 45° C que se encuentra en el laboratorio de Microbiología de Alimentos. Se debe tener cuidado en el proceso de enfriamiento porque de no ser así es probable que el agar nutriente se solidifique.



Figura 3.6 Baño María del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLA-P. Una vez preparado el agar, se vierten aproximadamente 1.0 mL en una caja petri de 100x15 mm y se combinan con 0.1 mL de muestra. Cada una de las cajas petri se debe marcar con el nombre del experimento y tiempo de exposición, comenzando con el tiempo cero y finalizando con el último tiempo de muestreo. Para concluir el proceso de preparación de las muestras, las cajas petri se colocan en una incubadora (Imperial III, Lab-Line, Modelo 310), a 35° C, y se incuban por 24 horas.

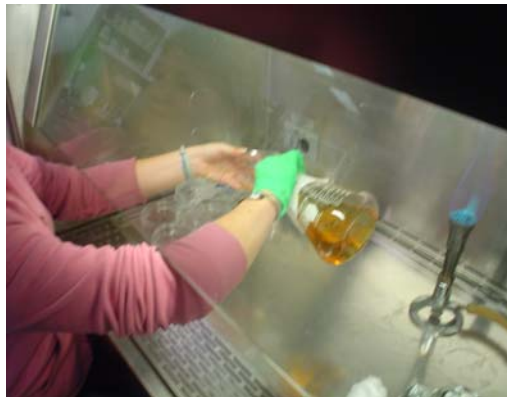


Figura 3.7 Adición de agar nutriente a las cajas petri con muestras (Gutiérrez y Delgado, 2006).



Figura 3.8 Detalle de cajas petri listas para colocarse en incubación.

Posterior a la incubación se debe realizar un conteo de las colonias de bacterias que se desarrollaron sobre la superficie del agar nutritivo (ver figura 3.9). Para realizar este conteo se emplea un contador, como el mostrado en la figura 3.10. Como puede apreciarse, el contador tiene una retícula con cuadros de diferentes tamaños. Se denomina “t1” al cuadro más pequeño, “t2” al mediano y “t3” al mayor como se muestra en la figura 3.11. Independientemente del cuadro utilizado como referencia, se recomienda realizar tres conteos en el mismo tamaño de cuadro. Los conteos obtenidos en “t1” deben multiplicarse por 9x56, que es la cantidad de cuadros contenidos en cada uno de los tamaños, los resultados obtenidos en “t2” deben ser multiplicados solo por 56 y finalmente el tamaño “t3” es el área total del contador.

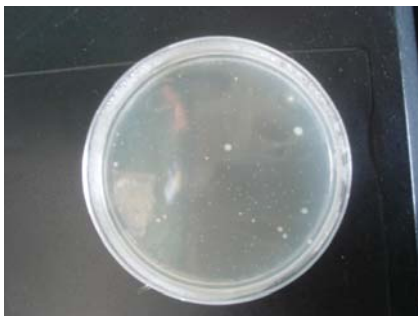


Figura 3.9 Caja petri posterior a la incubación.



Figura 3.10 Contador para realizar análisis de viabilidad.

Los tres conteos de colonias obtenidos para cada una de las muestras se promedian y con ello se obtiene el número de microorganismos viables que se registro para nuestra muestra en particular. Este número de microorganismos viables se denomina N para cualquier muestra, excepto para la muestra tomada al tiempo “cero”. Este conteo particular se denota como N_0 . Las fracciones de microorganismos que permanecen viables en algún tiempo determinado se calcula como N/N_0 . Estas fracciones pueden graficarse, con ayuda de una hoja de cálculo, contra tiempo de exposición o bien contra Cxt (mg-min/l) para el caso de los experimentos realizados con cloro libre.

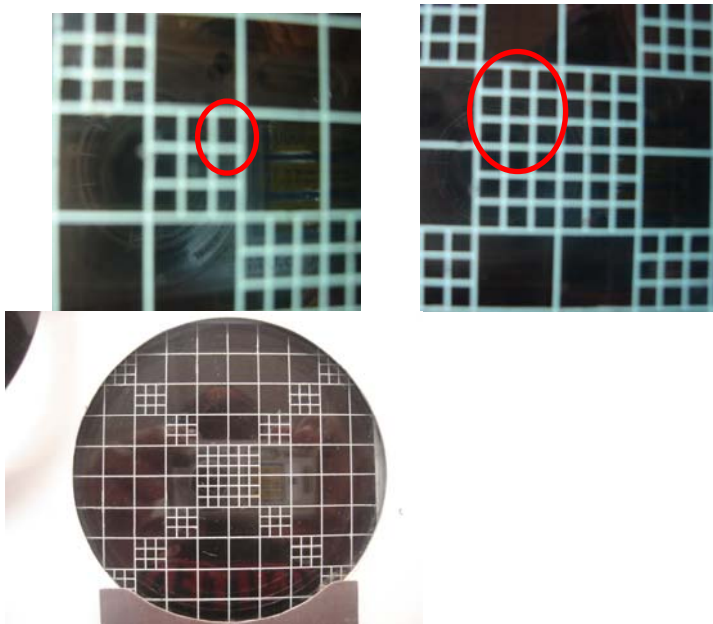


Figura 3.11 Diferentes tamaños del contador “t1,” “t2,” y “t3”.

3.5 Desinfección con radiación solar

Para realizar estos experimentos se necesita el siguiente material: un vaso de precipitado de 50.0 mL con agitador, pipetas y puntas de pipetas de 5.0 mL y 1.0 mL, agua destilada-deionizada todo el material es previamente esterilizado en una autoclave.



Figura 3.12 Vaso de precipitado de 50 mL



Figura 3.13 Pipetas y puntas de pipeta de 5 mL y 1 mL.

El simulador solar debe contar con 30 minutos de precalentamiento como lo indica el manual de usuario, además de regular la potencia de salida de la lámpara y mantenerla lo más próximo posible a 150 w para una mayor duración de la misma. Durante el tiempo de precalentamiento, se prepara el vaso de precipitado con 10.0 mL de suspensión total, los cuales incluyen 0.2 mL del concentrado de esporas con una densidad $\sim 10^7$ ufc / mL, y 9.8 mL de agua destilada-deionizada. El concentrado de esporas debe agitarse vigorosamente con la ayuda de un vortex para evitar la presencia de grumos de microorganismos en la suspensión. El vaso de precipitado es colocado bajo el haz de luz producido por el simulador y en ese momento se da por iniciado el experimento de desinfección. De manera inmediata se toma una muestra de 0.1 mL la cual proporcionará el valor de N_0 para el

experimento en cuestión. A cada tiempo de contacto se toman muestras de 0.1 ml siendo colocadas en los tubos de centrifugado con 0.9 ml de agua destilada-deionizada.



Figura 3.14 Agua destilada-deionizada.

3.6 Desinfección con fotocátalisis solar

Para este experimento se requiere el siguiente material: vaso de precipitado de 50.0 mL con agitador, puntas de 5.0 mL y 1.0 mL, agua destilada-deionizada, simulador solar, además de la placa de acero inoxidable (25 mm x 50 mm) impregnada con una película delgada de dióxido de titanio (TiO_2) (ver figura 3.15), debido a que el largo de la placa es mayor al tamaño del vaso de precipitado se recortó la placa en dos, quedando con las siguientes dimensiones (25.5 mm x 24.2 mm) y (26.7 mm x 24.4 mm), se observa que las dimensiones sufrieron variación consecuencia del corte con segueta. De nueva cuenta se debe precalentar el simulador solar y preparar el vaso de precipitado con 10.0 mL totales de agua destilada-deionizada, 0.2 mL de esporas (10^7 ufc / mL), el concentrado de esporas debe ser puesto en vortex para evitar formación de grumos y la placa recortada debe ser colocada en el fondo del vaso, la placa cuenta con dos lados cubiertos con la capa de TiO_2 , por lo que se debe tener mucho cuidado cuál es el lado que se expondrá al haz de luz del

simulador solar. La placa fue colocada en el fondo del vaso de precipitado que se utilizó como reactor, de manera que la suspensión de prueba la cubrió por completo.



Figura 3.15 Placa recortada de dióxido de titanio.

Como se muestra en la figura 3.16 el vaso de precipitado preparado es colocado bajo el haz de luz producido por el simulador solar, tomando muestras a los diferentes tiempos de contacto. Después de cada tiempo de contacto se toman muestras de 0.1 mL siendo colocadas en los tubos de centrifugado con 0.9 ml de agua destilada-deionizada. Los tubos de centrifugado deben ser guardados en refrigeración a una temperatura de 4° C, las muestras estuvieron en refrigeración en un periodo máximo de 48 horas antes de analizar su viabilidad.



Figura 3.16 Vaso-Reactor bajo el haz de luz producido por el Simulador Solar.

Posterior a la realización del experimento de fotocatalisis, se observaron las placas recortadas con la ayuda de un metaloscopio (Epiphot 200 marca Nikon) a diferentes aumentos, que van de 5x - 100x. En la figura 3.17 se observa a 100 aumentos el borde de una placa nueva sin corte, la placa fue observada a lo largo, por ser el extremo que se recorto de la placa, se puede observar que el borde tiene una forma uniforme, además el rallado de la placa es continuo y sin deformación.

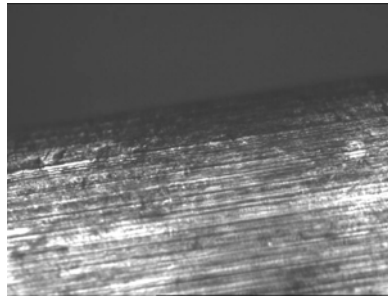


Figura 3.17 Borde original de la placa sin corte a 100x.

Para la figura 3.18 se tiene la imagen a 100 aumentos de la placa con corte, se puede observar que el borde tomó una forma irregular muy diferente al borde de la placa sin corte, deformándose en su extremo y mostrando irregularidades en la forma y rallado de la placa.

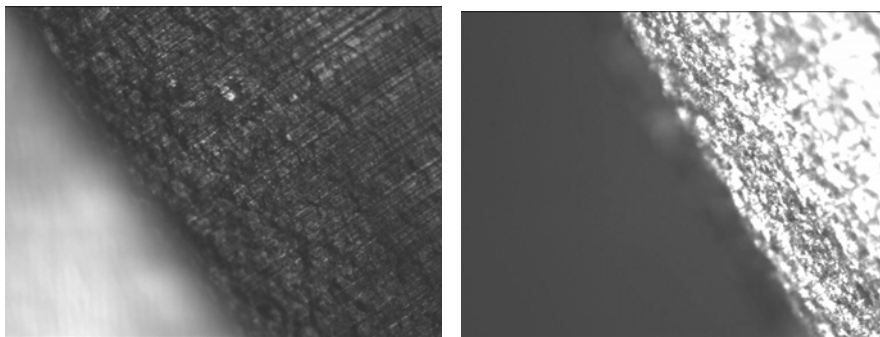


Figura 3.18 Borde recortado de la placa a 100x.

3.7 Desinfección con cloro libre

Los experimentos de desinfección con cloro libre se realizaron en soluciones buffer fosfato 0.01 M, pH 6.0, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL cubierto con papel aluminio. Para preparar la solución buffer se añadieron 1.41 mL de una solución 1.0 M $H_2PO_4^-$ y 0.18 mL de una solución 0.5 M HPO_4^{2-} a 150 mL de agua destilada-deionizada, Para poder ajustar el pH 6.0 se agregó hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N. Posteriormente se le agrega al matraz una alícuota de una solución 13% hipoclorito de sodio (NaOCl) y se mezcla para disolver el reactivo. Se determina la concentración del cloro con el método colorimétrico utilizando un espectrofotómetro. La concentración de cloro libre de la solución resultante fue de 1.06 – 4.26 mg/L de HOCl como Cl_2 .

Mientras se cumple el tiempo de reacción del cloro, se prepara una solución 3% tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_4$) que permite detener la acción del cloro. Para preparar esta solución se disuelven 0.75 g de reactivo en 25 mL de agua destilada-deionizada. Se agregan 1.0 mL de la solución de tiosulfato a cada tubo de centrifugado, y con ello se elimina cualquier residual de cloro que pudiera tener la muestra.

El experimento de desinfección con cloro se da por iniciado cuando se inyecta 1.0 mL del concentrado de esporas ($\sim 10^7$ ufc / mL) en el matraz Erlenmeyer que contiene la solución de cloro libre recién preparada. Es importante mencionar que previo a la inoculación del matraz, el contenido de éste es aclimatado a 30° C con ayuda de una tina de recirculación

como la mostrada en la figura 3.19. De manera similar al experimento con radiación solar, se toman muestras (de 2.0 mL en este caso) a diferentes intervalos de tiempo de contacto incluyendo la muestra a tiempo “cero”. Cada muestra es mezclada inmediatamente con 1.0 mL de tiosulfato y es guardada a 4° C por hasta 48 horas previo a su análisis de viabilidad.



Figura 3.19 Tina de recirculación y calentado.

Durante y al final del experimento se tomaron muestras de 5.0 mL las cuales fueron utilizadas para caracterizar la descomposición del cloro libre añadido. Cada una de las muestras fue mezclada con 5.0 mL de agua destilada-deionizada con la finalidad de diluir el cloro libre residual (dado que el límite máximo detectado por el método espectrofotométrico es de 2.0 mg/L).



Figura 3.20 Celda de 10 mL y espectrofotómetro para medir concentración de cloro.