CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

El propósito de este capitulo es describir a detalle cada uno de los procedimientos y técnicas de laboratorio utilizadas en este proyecto para evaluar la eficiencia de la radiación solar como desinfectante del agua potable. El capitulo comienza con una breve descripción de los procedimientos de cultivo, propagación y esporulación empleados en la preparación de las esporas de *B. subtilis*, y continúa describiendo los arreglos utilizados para la ejecución de experimentos de inactivación de estos microorganismos con radiación solar y con cloro libre. Además de los experimentos de inactivación con energía solar, fue necesario realizar algunos ensayos de inactivación de *B. subtilis* con cloro libre y también se describen los detalles en este apartado. Todos los experimentos de inactivación con radiación solar fueron conducidos en la azotea del edificio de Ingeniería (edificio 2) de la Universidad de las Américas-Puebla, mientras que los experimentos de inactivación con cloro se condujeron en los laboratorios de Ingeniería Civil de esta misma Universidad. Los correspondientes análisis de viabilidad de los microorganismos utilizados se llevaron a cabo en los laboratorios del Departamento de Química y Alimentos de la UDLA-P.

3.1 Matriz experimental

Todos los experimentos de desinfección con radiación solar y con cloro libre, efectuados en este estudio se realizaron en agua sintética, preparada a base de agua

destilada dosificada con fosfatos (0.01 M, pH 7.0). La finalidad de emplear esta solución "amortiguadora" fue la de garantizar un valor de pH constante en los experimentos de desinfección. La temperatura a la que se condujeron los experimentos de desinfección con radiación solar, fue controlada entre 12 y 18 °C, mientras que aquellos experimentos con cloro libre se realizaron a temperatura ambiente. Los experimentos con desinfección solar se trataron de llevar a cabo en días soleados entre las 10 de la mañana y las 5 de la tarde, teniendo una duración promedio de 5 a 7 horas. En cuanto a la desinfección con cloro libre se determinó utilizar concentraciones de 4 y 16 mg/L como Cl_2 y tiempos de contacto máximos de 2 horas.

3.2 Preparación de microorganismos

En este estudio se utilizaron dos tipos de microorganismos, las esporas de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli.* Fue necesario cultivar y propagar estos microorganismos en el laboratorio y a continuación se detallan las técnicas utilizadas para ello.

3.2.1 Esporas de *Bacillus subtilis*

El proceso de preparación de las esporas de *B. subtilis* a utilizar en el presente estudio inició con la preparación de un medio de cultivo a base de un caldo-peptona de caseína-peptona de harina de soya (Merck, EUA). Este tipo de caldo (caldo caso) se utiliza comúnmente para cultivar bacilos, y por esta razón se utilizó para el crecimiento del

microorganismo de estudio. La preparación de este caldo consistió en la disolución de 3 gramos de reactivo en 100 mililitros de agua destilada Valno® (ver Figura 3.1).

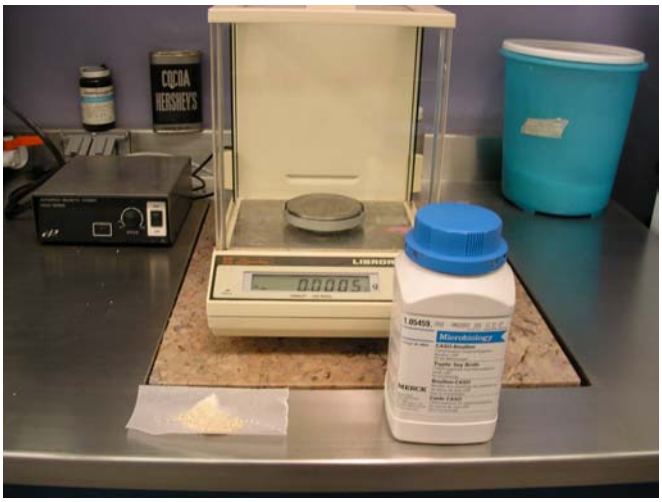

Figura 3.1 Preparación del medio de cultivo para la propagación de *Bacillus subtilis.*

La Tabla 3.1 muestra las características físicas y químicas del agua destilada utilizada para la preparación de medios de cultivo y soluciones de trabajo.

Conductividad especifica a 25°C	2.53 x 10^6 ohm~cm~
Densidad g/ml a 25°C	0.997
Metales pesados (Pb)	0.01 ppm
Sólidos totales	0.1 ppm
pH a 25°C	6.82

Tabla 3.1 Características del agua destilada Valno® utilizada en el presente estudio. (ppm = partes por millón).

Una vez preparado el caldo caso se disolvió perfectamente en el agua y se esterilizó en una autoclave Mod. Sterilizer SM 300 (Yamato, EUA) por un lapso de 15 minutos a

121°C. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, el pH del medio de cultivo preparado es de 7.1 a 7.5.

Figura 3.2 Propagación de *B. subtilis* en caldo caso bajo campana de flujo laminar y condiciones estériles.

Una vez esterilizado y frío, el caldo caso fue inoculado con una fracción del cultivo original de *B. subtilis* con el fin de propagar el microorganismo. El cultivo original utilizado para la preparación de las esporas fue proporcionado por el laboratorio de Química y Alimentos de la UDLA-P. El proceso de inoculación y propagación fue realizado bajo una campana de flujo laminar esterilizada, con el fin de evitar una posible contaminación en los cultivos (Figura 3.2). El cultivo inoculado fue incubado por 24 horas a 30ºC en una incubadora Labline Mod. Imperial III (Illinois, EUA) del laboratorio de Química y Alimentos de la UDLA-P

Una vez concluido el período de incubación de las esporas en caldo caso, las colonias de bacterias obtenidas se colocaron en un refrigerador a 4ºC, y se continuó con el proceso de esporulación. Para ello, se vertió el cultivo en un tubo de centrifugado de 50

ml., y se lavó un par de veces con solución amortiguadora. Posteriormente, las esporas fueron suspendidas en 400 ml. de la misma solución amortiguadora, y la suspensión resultante fue expuesta a una temperatura aproximada de 80°C en un mechero de Bunsen por 3 minutos (Figura 3.3).

Figura 3.3 Preparación de esporas por medio de shock Térmico.

La finalidad de este último paso fue la de inducir un "shock térmico" que eliminará a aquellas células vegetativas que pudieran subsistir en la suspensión. Esta técnica utilizada para la esporulación de *B. subtilis* genera una suspensión de esporas de ~10^7 ufc/ml. Finalmente, la suspensión se guardó a 4°C tal como se ilustra en la Figura 3.4.

Figura 3.4 Almacenamiento de la suspensión de esporas de *B. subtilis* a 4 ºC.

3.2.2 *Escherichia coli*

Además de exponer *B. subtilis* a la desinfección solar, se inactivó de manera paralela *Escherichia coli* (*E. coli*), con la finalidad de estimar las dosis de radiación solar recibidas por las muestras. Los detalles de cómo se estimaron las dosis de radiación solar se presentan en el Capítulo IV de esta tesis. A continuación se describe el procedimiento de preparación de *E. coli*.

De manera similar a la preparación de las esporas de *B. subtilis*, *E. coli* se preparó en caldo caso. Este medio se preparó disolviendo 3 gramos del reactivo en 100 mililitros de agua, se esterilizó en un matraz de 250 mililitros por 15 minutos a 121º C, y enseguida de su esterilización y subsecuente enfriamiento, se inoculó con algunas colonias de una cepa existente en el laboratorio de microbiología de la UDLA-P. Por último, la suspensión de *E. coli* se incubó por 18 horas a 30°C, obteniendo una densidad celular aproximada de ~10^6 cfu/ml. Esta suspensión se guardó a 4°C hasta el momento de ser requerida.

3.3 Procedimientos de desinfección

3.3.1 Desinfección solar

El objetivo principal de los experimentos con radiación solar fue determinar la eficacia de este tipo de radiación como desinfectante del agua potable. A continuación se

describen los procedimientos de prueba utilizados para evaluar la resistencia de las esporas de *B. subtilis* y *E. coli* a la radiación solar.

Una vez preparados los microorganismos necesarios para los experimentos con radiación solar, se procedió a preparar el material y equipo necesario para la ejecución de la parte experimental del proyecto. El material y equipo utilizado en cada uno de los experimentos de desinfección solar se muestra en la Tabla 3.2.

3	Vasos de precipitado de 250 mL.
2	Barras magnéticas de agitado
1	Parrilla de agitado
1	Tina de plástico de 45 x 30 cm.
1	Bomba para controlar temperatura
1	Micropipeta
1	Termómetro
25	Pipetas de 1 mL.
20	Botellas de dilución
30	Cajas petri de 15 cm.

Tabla 3.2 Material y equipo requerido para la elaboración de experimentos de desinfección con radiación solar.

Los tres vasos de precipitado indicados en la Tabla 3.2 sirvieron como reactores tipo "batch" para la exposición de los microorganismos a la radiación solar. Cada vaso de precipitado se preparó con 100 mL de solución buffer fosfato (0.01 M, pH 7.0), y esta operación se llevo a cabo dentro de una campana de flujo laminar con la finalidad de procurar un ambiente estéril tal como se muestra en la Figura 3.5. Dos de los tres reactores conteniendo 100 mL de buffer fosfato fueron inoculados con 0.1 mL (~10^6 células) de la suspensión de esporas de *B. subtilis* preparada previamente. El tercer vaso recibió una alícuota del mismo volumen, pero esta vez de *E. coli*. Uno de los vasos de *B. subtilis* sería expuesto a radiación solar, mientras que el otro serviría como control. El vaso que contenía

E. coli también sería expuesto a radiación solar y permitiría la posterior estimación de la dosis de radiación solar aplicada.

Figura 3.5 Preparación de reactores tipo "batch" utilizados para desinfección solar.

Es importante mencionar que, en todos los experimentos con radiación solar, también se prepararon reactores que permanecieron apartados de toda energía solar (controles). Estos "controles" fueron preparados, muestreados y analizados al igual que los reactores de estudio, teniendo como única diferencia su falta de exposición a la radiación solar. Dichos controles permitieron confirmar la resistencia de los microorganismos a las condiciones de pH y temperatura seleccionadas para los experimentos de desinfección.

También es importante señalar que todos los reactores, de estudio y "controles", fueron provistos de mezclado constante durante la duración de los experimentos de desinfección. Para este propósito se utilizaron parrillas de agitado y barras magnéticas, las cuales procuraron la formación de suspensiones homogéneas de *B. subtilis* y *E. coli* al tiempo que los reactores correspondientes fueron irradiados con energía solar.

Otra característica importante de los procesos de desinfección utilizados en esta tesis fue el control de temperatura. Se procuró mantener una temperatura de prueba constante (~15°C) con la finalidad de eliminar cualquier posible inactivación de los microorganismos de estudio debida al calentamiento del medio de exposición y "favorecer" así la inactivación de éstos por radiación exclusivamente. El control de temperatura se logró mediante la sumersión de los reactores inoculados en una tina de plástico que contaba con recirculación de agua hacia un dispositivo regulador como se muestra en la Figura 3.6.

Figura 3.6 Arreglo experimental utilizado para desinfección solar. La figura muestra una tina de agua con recirculación y control de temperatura, además de los dispositivos de mezclado utilizados.

La tina de plástico tenia dimensiones aproximadas de 30 x 40 cm y estaba perforada en uno de sus costados para permitir la entrada y salida de agua desde o hacia el controlador de temperatura. La Figura 3.7 muestra un detalle del interior de la tina e ilustra la manera en que la lámina de agua recirculada cubría en su totalidad las suspensiones de microorganismos contenidas en los reactores, asegurando así una temperatura controlada en su interior.

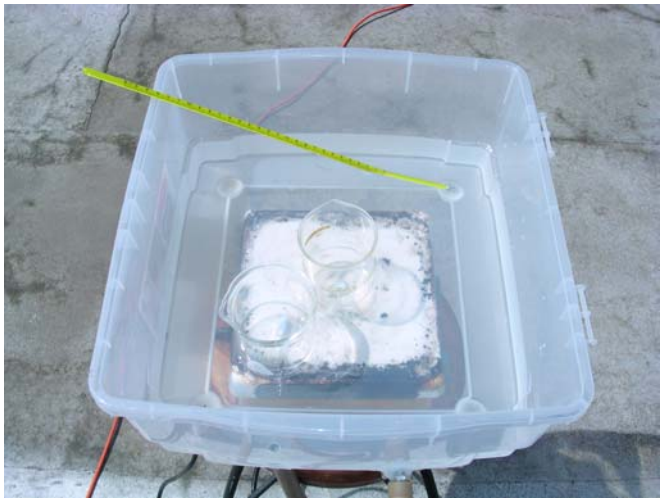

Figura 3.7 Reactores tipo "batch" inmersos en tina de agua con temperatura controlada (15°C).

Cabe mencionar que los reactores preparados en condiciones asépticas se mantuvieron siempre tapados con papel aluminio hasta iniciado el experimento de desinfección solar. El experimento se dio por iniciado al descubrir los reactores, previamente aclimatados a la temperatura de prueba, y dejarlos expuestos a la radiación solar. Posteriormente, los reactores fueron muestreados a tiempos previamente determinados. Cada muestra tomada tuvo un volumen total de 1.0 mL de suspensión y, una vez retirada al tiempo correspondiente, fue colocada en una botella de dilución que contenia 99 mL de solución buffer fosfato esterilizada. Todos los reactores fueron muestreados al tiempo cero (t = 0) con el objeto de conocer la viabilidad inicial de los microorganismos en las suspensiones. Los reactores de estudio (conteniendo esporas de *B. subtilis*) fueron muestreados a cada 1.5 hr desde iniciado el experimento hasta la conclusión del mismo. Por su parte, los reactores "control" sólo fueron muestreados al inicio, mitad y final del experimento de inactivación de *B. subtilis*. Finalmente, los reactores de *E. coli* se muestrearon a cada 20 minutos durante las primeras dos horas de

duración del experimento porque se estimó que la dosis de radiación solar sería suficiente para inactivar por completo a este microorganismo en este lapso de tiempo.

Figura 3.8 Botellas de dilución utilizadas para muestreo en experimentos de desinfección solar.

Una vez concluido el proceso de recolección de muestras, todas las botellas de dilución conteniendo a los microorganismos irradiados (y también aquellos utilizados para los reactores "control") fueron guardadas temporalmente en un refrigerador a 4°C. Las muestras serian requeridas posteriormente para su análisis de viabilidad, el cual se inició durante las siguientes dos horas de terminado el proceso de inactivación.

3.3.2 Desinfección con cloro libre

El segundo tipo de experimentos de desinfección conducidos en este estudio fue la inactivación de esporas de *B. subtilis* con cloro libre. El objetivo primordial de estos experimentos fue el de caracterizar la resistencia de las esporas utilizadas a otro

desinfectante de uso común (cloro libre), y con ello comparar su resistencia a la desinfección con la de esporas similares utilizadas en otros estudios.

Los procesos de preparación y prueba utilizados para la desinfección con cloro libre fueron muy similares a los descritos para desinfección solar con algunas diferencias que se describen a continuación. El experimento de inactivación de *B. subtilis* con cloro libre se llevó a cabo en reactores tipo "batch" que consistieron esencialmente de matraces Erlenmeyer de 250 mL, cubiertos en su totalidad por papel aluminio, los cuales se dosificaron con 100 mL de solución buffer fosfato cada uno. A pesar del "especiamiento" que sufre el cloro libre en función del pH (puede estar presente en forma ácido hipocloroso, HOCl, o ion hipoclorito, OCl^-, o ambos), se decidió mantener el mismo valor de pH para la solución buffer fosfato utilizado en los experimentos de desinfección solar (pH 7.0-8.0). Al igual que los reactores utilizados para desinfección solar, los reactores de cloro libre se prepararon en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar y se mantuvieron tapados con papel aluminio en todo momento. Además, el contenido de los reactores se mezcló de manera constante con la ayuda de una parrilla de agitado y barras magnéticas de manera similar a lo realizado durante la desinfección solar. Sin embargo, es importante mencionar que los experimentos de desinfección con cloro fueron desarrollados a temperatura ambiente (~22°C) a diferencia de aquellos elaborados con radiación solar a ~15°C.

Antes de comenzar el experimento de inactivación con cloro libre, los reactores fueron dosificados con la concentración inicial de cloro deseada y ésta se determinó por duplicado mediante el método colorimétrico DPD, usando para ello un espectrofotómetro

Hach® Mod. FN12BOX (EUA). La concentración de cloro libre fue nuevamente medida al final del experimento de inactivación con el propósito de estimar la tasa de descomposición del desinfectante. Las concentraciones iniciales de cloro libre que se utilizaron en los dos experimentos realizados fueron de 7.93 y 16.1 mg/L como Cl_2.

Una vez determinada la concentración inicial de cloro en el reactor, el experimento de inactivación se inició agregando una alícuota de 0.1 mL de la suspensión de esporas de *B. subtilis* al reactor. Muestras con volumen igual a 5 mL fueron retiradas del reactor a diferentes tiempos de contacto, incluyendo una tomada a $t = 0$, utilizando para ello una micropipeta automática. Los tiempos de muestreo empleados para este experimento fueron a cada 20 minutos, a partir de la inoculación, y por un máximo de 2 horas de contacto. De forma similar a lo realizado en desinfección solar, las muestras retiradas del reactor fueron colocadas inmediatamente en una botella de dilución que contenía 95 mL de solución buffer fosfato. Sin embargo, además de esta solución, las botellas contenían 5 mL de una solución 3% (peso/volumen) de tiosulfato de sodio $Na_2S_2O_4$. El objetivo de agregar esta cantidad de tiosulfato a cada botella de dilución fue el de destruir el cloro que también se encontraba presente como parte de la muestra tomada.

En comparación con los procedimientos descritos para desinfección solar, el análisis de viabilidad de las muestras recolectadas en los experimentos con cloro libre también se inició en las siguientes dos horas a la terminación del proceso de inactivación. Mientras tanto, las muestras se guardaron provisionalmente a 4^oC en el refrigerador. La

Tabla 3.3 muestra el material y equipo utilizado en los experimentos de desinfección con cloro libre realizados en esta tesis.

Cantidad	Material
3	Vasos de precipitado
14	Cajas petri
100	Mililitros de Hipoclorito de Sodio
1	Parrilla de agitado
1	Barras magnéticas
6	Botellas de dilución
1	Micropipeta
20	Pipetas
1	Probeta 100 mL.
3	Gramos de tiosulfato

Tabla 3.3 Material y equipo necesario para experimentos de desinfección con cloro libre.

Para llevar a cabo el análisis de viabilidad se tomo 5 mililitros de muestra y se coloco en el agar, para llevar a cabo el conteo entre las 18 y 24 horas después de la incubación de las esporas.

3.4 Análisis de viabilidad de microorganismos

Al término de cada experimento de desinfección fue necesario determinar la magnitud del "daño" inducido por los desinfectantes en los microorganismos y para ello se condujo un análisis de viabilidad con cada una de las muestras recolectadas. El principio de la técnica empleada para este propósito es muy sencillo y consiste en exponer una porción de la muestra de microorganismos a una superficie rica en nutrientes bajo condiciones "agradables" de temperatura. Todas las bacterias vivas responderán al estimulo y terminarán por reproducirse y formar colonias al cabo de un cierto periodo de tiempo de

incubación. Por el contrario, aquellas bacterias que hayan resultados dañadas de manera importante por la acción del desinfectante no podrán responder al estimulo y serán incapaces de reproducirse y formar colonias. Estas últimas bacterias se consideran muertas o inactivadas. Por lo tanto, el objetivo de este análisis fue determinar las fracciones de microorganismos que permanecieron vivos después de ser expuestos a una cierta dosis de desinfectante, y de esta manera caracterizar su cinética de inactivación con radiación solar y cloro libre. Resulta importante mencionar que esta técnica de análisis se basa en el supuesto de que cada colonia enumerada se genera de la reproducción binaria de una sola bacteria que entra en contacto con el agar.

La superficie rica en nutrientes mencionada se preparó con agar nutritivo Merck® en cajas Petri de 15 cm. La preparación del agar se inició disolviendo 5 g de reactivo en 750 mL de agua destilada. Después, la solución generada fue hervida en una parrilla de agitado con control de temperatura tal como se muestra en la Figura 3.10.

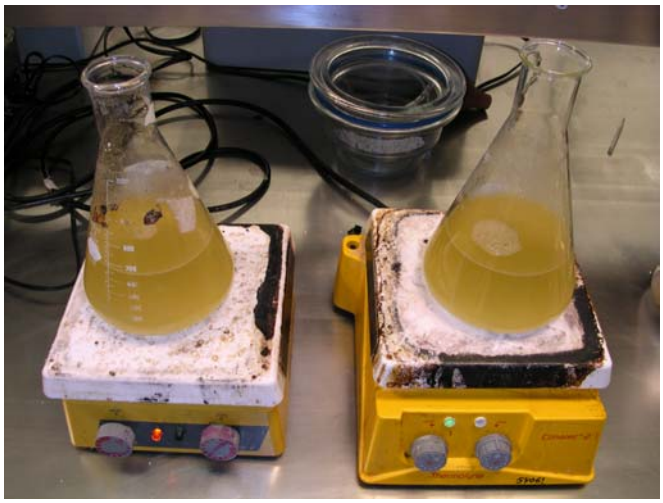

Figura 3.9 Preparación del agar para análisis de viabilidad de las muestras recolectadas en los experimentos de inactivación.

Una vez hervida, la solución de agar se autoclavó antes de vaciarse en las cajas Petri, asegurando así su esterilidad. El vaciado de esta solución de agar en las cajas Petri se realizó inmediatamente después de ser autoclavada, ya que ésta endurece (cuaja) al enfriarse, formando así la superficie sólida requerida para el análisis de viabilidad. Esta operación de vaciado se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar para garantizar la esterilidad de las cajas Petri como se ilustra en la Figura 3.11.

Figura 3.10 Preparación de cajas petri con agar para análisis de viabilidad de esporas de *B. subtilis* y *E. coli*.

Para determinar la viabilidad de una muestra determinada se tomó una alícuota de 0.1 mL de la botella de dilución correspondiente, y ésta se esparció por toda la superficie de agar de una caja Petri con la ayuda de un bastón de cristal previamente bañado con etanol y flameado para su esterilización. Es importante mencionar que la muestra se esparció en la caja Petri hasta ser consumida en su totalidad por la superficie de agar. El procedimiento descrito se muestra en la Figura 3.12.

Figura 3.11 Análisis de viabilidad del experimento: la muestra es colocada en la caja petri por medio de un bastón estéril.

Después de repetir la operación para todas y cada una de las muestras de un experimento de desinfección, las cajas Petri infectadas fueron incubadas por ~24 horas a 30°C. Al término de este periodo de incubación se procedió a enumerar las colonias desarrolladas en las superficies de agar. Para ello se empleó un cuenta-colonias (mostrado en la Figura 3.13), el cual tiene una cuadricula y una lupa.

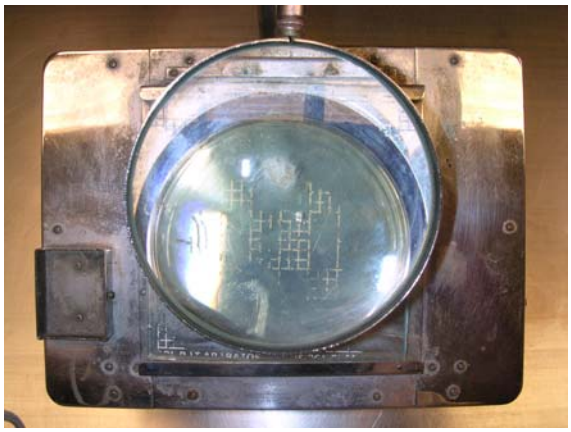

Figura 3.12 Manera de obtener el conteo de cada muestra.

En base al número de colonias observadas en la cuadricula, y en función del área de la caja Petri, se pudieron estimar los números de microorganismos viables (N) para cada muestra de un experimento de desinfección. Por lo tanto, la fracción de microorganismos viables observada a un tiempo determinado (t) se calculó como:

$$\text{Fracción de microorganismos viables} = \frac{N}{N_o}$$

en donde N_o representa el número de microorganismos viables observados a $t = 0$. La variación de N/N_o en función del tiempo de muestreo definió la cinética de inactivación de las esporas de *B. subtilis* y *E. coli* al ser expuestos a radiación solar y/o cloro libre.