

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de Microorganismos

En los experimentos de desinfección conducidos en este proyecto se utilizaron esporas de *B. subtilis*. La Tabla 2.1 muestra una relación de los experimentos conducidos con cada microorganismo, así como las condiciones de pH, temperatura y concentraciones de reactivo utilizadas.

Tabla 2.1 Relación de Experimentos

Prueba	Microorganismo	Desinfectante	Condiciones		Concentraciones de Reactivo	Observaciones
			Temp.	pH		
1	Esporas de <i>B. subtilis</i>	Radiación Solar	-	-	-	Guisar 2006
2	Esporas de <i>B. subtilis</i>	Fotocatálisis Solar	-	-	0.9 mM Fe ²⁺ y 352 mM H ₂ O ₂	Guisar 2006
3	Esporas de <i>B. subtilis</i>	Fotocatálisis Solar	-	-	0.5 mM Fe ²⁺ y 352 mM H ₂ O ₂	Guisar 2006
4	Esporas de <i>B. subtilis</i>	Cloro libre	20°C	6	Cl ₂ = 7.53 mg/L	-
5	Esporas de <i>B. subtilis</i>	Desinfección Secuencial	20°C	6	Cl ₂ = 10.5 mg/L	-
6	Esporas de <i>B. subtilis</i>	Desinfección Secuencial	20°C	6	Cl ₂ = 7.1 mg/L	-

2.1.1 Preparación de Esporas de *Bacillus subtilis*

Para llevar a cabo la preparación de las esporas de *Bacillus subtilis* se propagó un cultivo de este microorganismo el cual fue proporcionado por el laboratorio de Ing. Química y Alimentos de la Universidad de las Américas, Puebla

Se extrae con un asa esterilizada una pequeña cantidad del microorganismo que se encuentra en una cuña y se introduce en un caldo de soya previamente esterilizado.

Posteriormente el caldo de soya se coloca en una incubadora (Labline Mod. Imperial III Illinois, EUA) a una temperatura de 35°C durante 24 hr. El procedimiento explicado anteriormente fue realizado bajo una campana de flujo laminar esterilizada, para evitar contaminación en los cultivos.

Después de inocular el microorganismo se procede a la **esporulación** del cultivo. Primeramente se prepara agar de soya (conocido también como agar caso), disolviendo 40 g de reactivo en 1 L de agua destilada desionizada. El agar se esteriliza en una autoclave (Mod. Sterilizer SM 300 Yamato, EUA), durante 2 horas aproximadamente a una temperatura de 121°C. Al finalizar la esterilización del agar se deja enfriar hasta que solidifique. En seguida se le coloca 1 mL del caldo de soya inoculado y se deja incubar durante 7 días a una temperatura de 35°C. Se retira el matraz con el cultivo de la incubadora después de 7 días y se le añaden de 10 a 20 mL de agua destilada esterilizada. Se agita manualmente el matraz para tratar de desprender la mayor cantidad de microorganismos. El enjuague se coloca en un tubo de centrifugado de 50 mL; se repite este procedimiento 3 veces más para remover la mayor cantidad de esporas del matraz. Al finalizar el último enjuague, el tubo se instala en una centrifuga y se centrifuga a 10,000xg durante 10 minutos. Posteriormente se retira el tubo de centrifugado con el cultivo y se aspira el sobrenadante con una pipeta de 10 mL. Se deja aproximadamente hasta que el tubo tenga 10 mL y en seguida se agrega agua destilada esterilizada hasta llenar el tubo de centrifugado y se agita con un vortex. Después se coloca de nuevo en la centrifuga con las mismas condiciones y se repite el procedimiento 3 veces a partir del centrifugado (Figura 2.1).

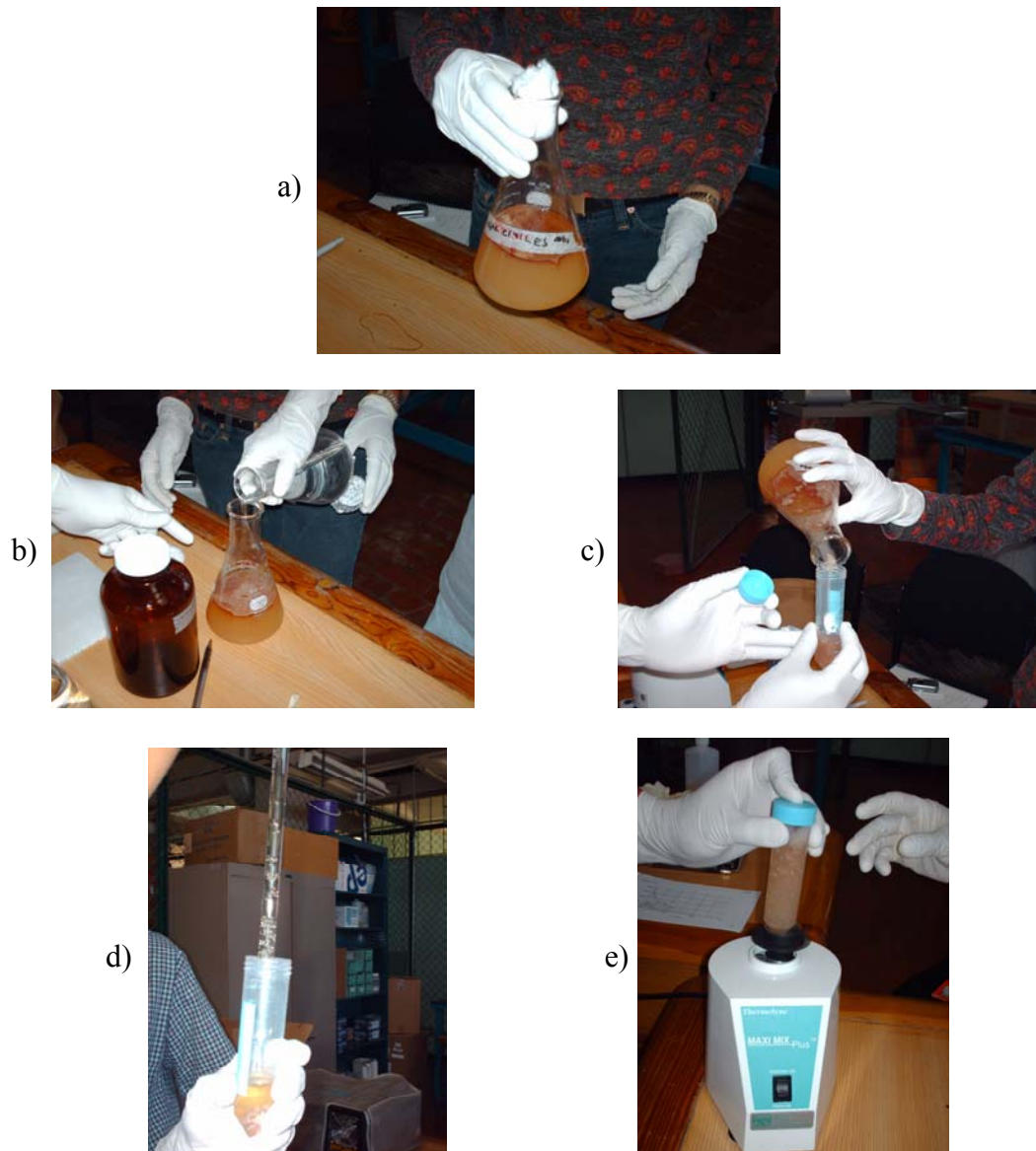


Figura 2.1 Preparación de Esporas de *B. subtilis*: a) Matraz con el Cultivo de Esporas de *B. subtilis*; b) Añadiendo Agua Destilada al Matraz; c) Vertiendo el Enjuague en el Tubo de Centrifugado; d) Quitando el Sobrenadante; e) Aplicando un Vortex al Enjuague

Después de realizar el último centrifugado y retirar el sobrenadante hasta 10 mL, se vuelve a llenar el tubo con agua destilada esterilizada, además se aplica un vortex y esta solución se vierte en una botella ámbar de 1 L. La botella ámbar se coloca en un tina a una temperatura de 80°C durante 12 minutos, a esto se le conoce como **shock térmico** (Figura 2.2). Por último, se retira la botella de la tina con las esporas de *Bacillus subtilis* y se guardan a 4°C hasta ser requeridas para su uso.

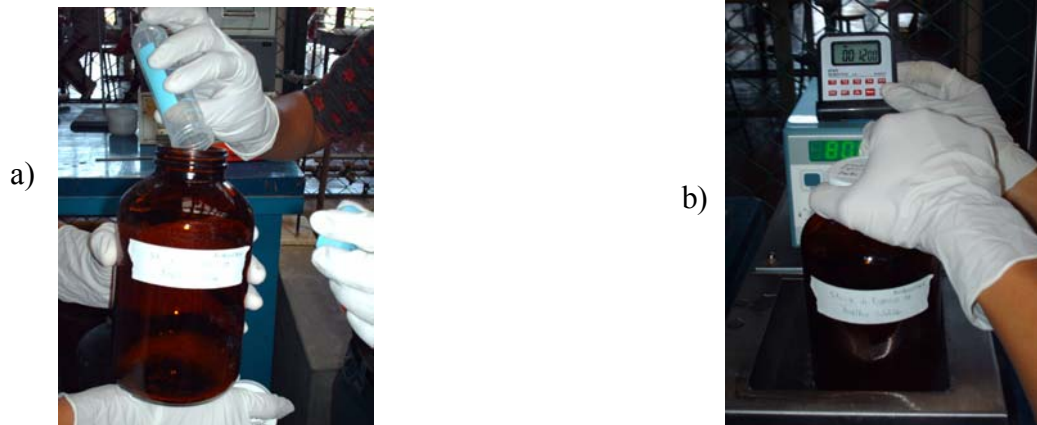


Figura 2.2 Preparación de Esporas de *B. subtilis*: Shock Térmico: a) Se Vierte el Concentrado de Esporas de *B. subtilis* en la Botella Ámbar; b) Aplicando Shock Térmico.

2.2 Procedimientos de Desinfección

A continuación se describen los procedimientos de desinfección utilizados en este proyecto de tesis.

2.2.1 Desinfección con Fotocatálisis Solar

En el proceso de fotocatálisis solar influyen varios factores tales como la radiación solar, la temperatura y la concentración de catalizadores, los cuales harán posible la inactivación de las esporas de *Bacillus Subtilis*. El catalizador utilizado en este proceso es una mezcla de Fe (Fierro) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno). Para las pruebas iniciales se utilizaron concentraciones de estos dos reactivos las cuales habían sido utilizadas exitosamente para degradar pesticidas con un proceso de fotocatálisis similar.

Las muestras expuestas a radiación solar se prepararon en vaso de precipitado de 25 mL, en los cuales se colocó 0.182 mL de la suspensión de esporas 0.2 mL de Fe^{2+}

25mM y 0.2 mL de H₂O₂ 352 mM. El volumen de la muestra se completó a 10 mL utilizando agua destilada-desionizada esterilizada.

Una vez preparada la muestra, ésta fue expuesta al haz de luz solar colimado proveniente del simulador solar (Figura 2.3). Las muestras fueron retiradas del vaso de precipitado a diferentes tiempos de exposición, ello con la finalidad de caracterizar la cinética de inactivación de las esporas con fotocatalisis solar. Todas las muestras fueron guardadas temporalmente a 4°C y, una vez concluido el experimento, fueron analizadas para viabilidad de esporas utilizando el método que será descrito posteriormente. Es importante mencionar que la concentración de esporas que se procuró en la muestra expuesta fue de aproximadamente un orden de magnitud de 10⁵ ufc/mL. También resulta importante que la muestra denominada “tiempo cero” fue tomada justo después de que se agregó el peróxido de hidrógeno a la muestra y antes de exponer a ésta a la radiación solar.

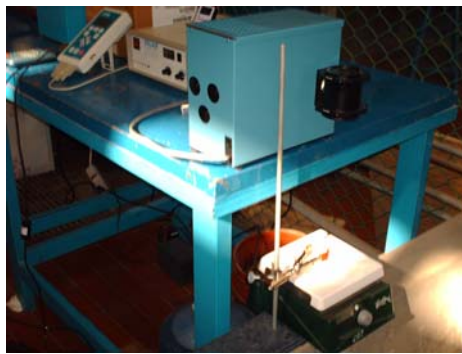


Figura 2.3 Arreglo Experimental para la Inactivación de Esporas de *B. subtilis* por Fotocatalisis Solar

2.2.2 Desinfección con Cloro Libre

Los experimentos de desinfección con cloro libre fueron conducidos bajo condiciones de pH y temperatura controladas (pH = 6.0, 20°C). Para ello se prepararon

muestras de 200 mL, las cuales se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Cada muestra fue preparada con 200 mL de una solución 0.01 M buffer fosfato, a la cual se agregó una alícuota muy pequeña de una solución aproximadamente de 13% hipoclorito de sodio. Después de mezclar profusamente, se determinó la concentración de cloro libre en la solución, y para ello se empleó el método colorimétrico DPD. Las concentraciones de cloro libre que se emplearon fueron de aproximadamente 8.0 mg/L como Cl₂ (Figura 2.4).



Figura 2.4 Tina de Recirculación con el Concentrado de Cloro

El experimento de inactivación se dio por iniciado justo en el momento en que se añaden los microorganismos. En este caso se añadió 1.0 mL de la suspensión stock de esporas de *Bacillus subtilis* es decir aproximadamente 10^7 ufc.

Posteriormente, se fueron retirando muestras de 1.0 mL del matraz reactor, y cada una de ellas fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 mL a los cuales se le aplico un vortex. Cada uno de estos tubos contenía 0.2 mL de una solución 3% tiosulfato de sodio, ello con la finalidad de detener inmediatamente el efecto oxidante del cloro sobre los microorganismos contenidos en la muestra (Figura 2.5).

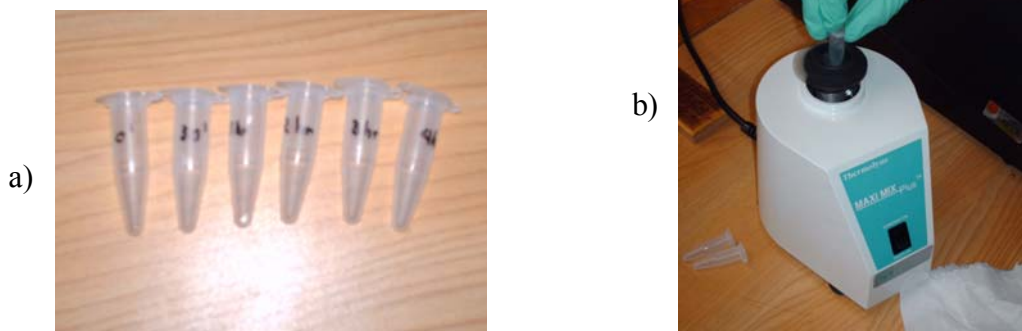


Figura 2.5 Muestras de Cloro Libre: a) Tubos Eppendorf; b) Aplicando un Vortex a los Viales

2.2.3 Desinfección Secuencial

En el proceso de desinfección secuencial se unen los procesos de desinfección con fotocátalisis solar y cloro libre. Para el proceso de la fotocátalisis solar, se utilizaron las mismas concentraciones de catalizador y de esporas de *B. subtilis*, además de que el procedimiento empleado fue muy similar al descrito en el punto 2.2.1, solo se tomaron 3 muestras: una al tiempo cero, otra al final del tiempo seleccionado para pretratamiento, y finalmente una intermedia.

Terminando el periodo de exposición de la fotocátalisis solar, el contenido del vaso de precipitado se vertió en un tubo de centrifugado y se realizaron 3 enjuagues de la muestra con agua destilada. Estos enjuagues permitieron remover los sobrantes de H_2O_2 y Fe^{2+} que acompañan a la muestra de *B. subtilis* al concluir con la etapa de pretratamiento con fotocátalisis solar.

Al término del último centrifugado, se retira de nuevo el sobrenadante y se le coloca agua destilada esterilizada. Se le aplica un vortex al tubo de centrifugado y posteriormente se vierte todo el contenido el reactor de cloro libre para dar por iniciada

la segunda etapa del tratamiento. La preparación de este reactor de cloro libre es idéntica a la descrita en el punto 2.2.2.

2.3 Análisis de Viabilidad para Esporas de *Bacillus subtilis*

Para determinar la viabilidad de las esporas de *B. subtilis*, se requiere que el material con el que se va a trabajar se encuentre previamente esterilizado y que el proceso se realice bajo una campana de flujo laminar.

Es posible que se necesiten hacer diluciones de las muestras, puesto que las concentraciones de esporas que se utilizaron fueron particularmente elevadas.

Cuando se llega a la dilución deseada, se coloca 1 mL de esta muestra en una caja petri, sobre la cual se vierte una pequeña cantidad de agar de soya. Se vierte una cantidad suficiente como para cubrir el fondo de la caja petri y para ello se agita circularmente la misma. (Figura 2.6).



Figura 2.6 Preparación de Cajas Petri



Figura 2.7 Contadora de Microorganismos.

Las cajas petri con la muestra y el agar se colocan en una incubadora a 35°C durante 24 hr. Después de este período, las cajas petri se colocan en una contadora de microorganismos (Figura 2.7) y se procede a enumerar unidades formadoras de colonias (ufc). La fracción de esporas viables que corresponden a una muestra en particular se calcula dividiendo el numero de esporas viables de la muestra (N) entre el numero de esporas viables observadas al tiempo cero (No).