

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de microorganismos.

El microorganismo de estudio son las esporas de *Bacillus subtilis*, las cuales se emplearán como indicadoras de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Para su obtención se hizo un cultivo de éstas a partir de una siembra provista por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Américas-Puebla. El cultivo contenía *Bacillus subtilis* en forma vegetativa, el cual tuvo que propagarse y esporularse tal como se describe a continuación.

Se inicia con la propagación del microorganismo, *B. subtilis*. En el laboratorio antes mencionado se encuentra lo que se denomina cuña, la cual contiene, en estado vegetal el *Bacillus subtilis*. Empleando instrumentos de captación se coloca el microorganismo dentro de un ambiente de cultivo, Caldo CASO o Caldo de Soya (Anexo 7), el cual permite el incremento poblacional del mismo. Esta propagación dura 24 horas, dentro de una Incubadora a una temperatura controlada de 37°C.



Figura 2.1 Detalle de Incubadora utilizada para la preparación de microorganismos y su análisis de viabilidad.

Después del periodo de propagación se procede a la obtención de las esporas de *Bacillus subtilis*. Del caldo de *B. subtilis* incubado se toma una cantidad suficiente para impregnarla en la superficie de un agar de soya (Ver Anexo 8), preparado y solidificado con anterioridad, contenido dentro de un matraz. Este agar de soya contiene los nutrientes necesarios para que el microorganismo se alimente y crezca en toda la superficie rociada por el mismo. Ya preparado el agar de soya con el *Bacillus subtilis* se procede a introducirlo dentro de la incubadora por un periodo de entre 7 y 10 días, a temperatura controlada de 37°C.

Terminado el tiempo de esporulación anterior se observa que la superficie del agar en el matraz se ha tornado de un color blanquecino lo cual indica que la esporulación se ha desarrollado de manera correcta. El siguiente paso es remover toda esa capa mediante agua destilada-desionizada-esterilizada, cada enjuague se coloca dentro de un tubo de centrifugado, se centrifuga a 10,000×g durante 10 minutos, se aspira el líquido sobrante, dejando sumergido sólo el concentrado de esporas de *B. subtilis*, haciendo un vortex por cada enjuague y aspirado obtenido, hasta observar que el líquido succionado sea lo más transparente posible, indicando que el microorganismo se ha concentrado en la parte inferior del tubo de centrifugado y que se han removido las partículas vegetales y del mismo agar.

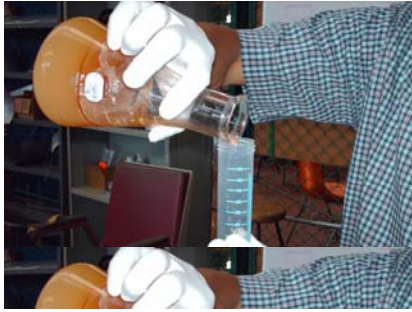


Figura 2.2 "Lavado" de Microorganismos de la Superficie de Agua y su Traspaso a Tubo de Centrifugado de 50mL.



Figura 2.3 Detalle de Vórtex.

En la Tabla 2.1 se señalan las especificaciones tanto químicas como físicas del agua destilada que será empleada para este proceso.

Tabla 2.1 Características del agua destilada Valno®

| | |
|--|--------------------------------|
| Conductividad específica 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 |

Fuente: De La Cruz, 2004.

Haciendo un último vortex se coloca todo el concentrado de esporas de *Bacillus subtilis* dentro de un frasco ámbar de 1L, en el cual también se encuentra una cantidad razonable de agua destilada-desionizada-esterilizada. Se puede observar la cantidad de esporas disueltas.

Como último paso, para la obtención del stock de esporas de *Bacillus subtilis*, se procede a realizar el shock térmico, el cual consiste en activar el microorganismo a partir del calor, eliminar las partículas vegetales restantes, y asegurar que sólo las esporas permanezcan vivas. El shock térmico se realiza con una tina de recirculación, donde el agua se encuentra a una temperatura controlada de 80°C, el frasco ámbar se sumerge y se emerge de manera oscilatoria, hasta que el interior del mismo se encuentre a la misma temperatura del aparato.

Finalizado este procedimiento, se coloca el Stock de esporas en refrigeración a 4°C.

Densidad del Stock de Esporas de *Bacillus subtilis*.

La obtención de un valor aproximado de la cantidad de esporas de *B. subtilis* encontradas en el stock de las mismas ayudará a mantener un control de la cantidad de microorganismos utilizados, inactivados o eliminados durante el proceso de fotocatalisis.

Este método se realizó a partir de los siguientes pasos:

- 1) Se tomó del stock de esporas de *Bacillus subtilis* 1mL el cual fue agregado a 9mL de agua destilada (Dilución 10^{-1}).
- 2) De la muestra anterior se realizan disoluciones en agua peptonada (Ver Anexo 9) hasta llegar al equivalente de una solución, que por su cantidad de unidades formadoras de colonia, facilite el conteo de estas. Colocando en cajas petri, por disolución, 1mL de muestra y homogeneizándolo con agar de soya.
- 3) Las cajas petri que contienen esporas en disolución y agar para su inoculación son colocadas en una incubadora durante 24 horas y a una temperatura de 37°C.

- 4) Terminado el periodo de incubación se procede, con ayuda de un contador de microorganismos, el conteo de esporas de *B. Subtilis* encontradas en cada una de las cajas correspondientes.
- 5) Con los datos del conteo se realizan los cálculos correspondientes, a fin de llevar las cantidades a un número con disolución igual a 0.
- 6) Las cantidades totales encontradas en una caja petri se consideran por unidad de volumen (1mL).

La realización de disoluciones mencionadas en este proceso, y en métodos subsecuentes, es un método que facilita, en este caso, la obtención de la densidad del microorganismos, así como en la viabilidad del mismo microorganismo donde es necesario verificar que las cantidades presentes en la experimentación cumplan con el valor de densidad obtenido para las esporas de *B. subtilis*.

2.2 Preparación de materiales y soluciones de prueba.

En la mayor parte de los experimentos realizados en este proyecto se utilizó agua destilada-esterilizada, para dos conjuntos de experimentos independientes.

Los materiales y los experimentos de desinfección se llevaron a cabo en condiciones asépticas.

2.2.1 Preparación de Soluciones Buffer Fosfato 0.01 M.

Esta solución resulta de la combinación de fosfatos en diferentes concentraciones disueltos en agua destilada (Ver Anexo 5).

Para la preparación de soluciones buffer para diferentes valores de pH, la Tabla 2.2 menciona las cantidades y combinaciones para dichos valores del potencial de hidrógeno.

Tabla 2.2 Proporcionamiento de ortofosfatos para la producción de soluciones buffer fosfato 0.01M.

| pH | H₂PO₄⁻ 1.0M (mL) | HPO₄²⁻ 0.5M (mL) |
|-----------|--|---|
| 5 | 20 | 0 |
| 6 | 18.81 | 2.4 |
| 7 | 12 | 16 |
| 8 | 3 | 34 |
| 9 | 0 | 40 |

Estos volúmenes de las soluciones de fosfatos son representativas de un volumen total de solución buffer de 2.0 litros, por lo cual se tiene que hacer la conversión para el volumen que se deseé.

Para este proyecto se utilizó buffer fosfato con pH 6.0, para obtener este valor se requirieron las siguientes cantidades fosfatos:

En un volumen total de 250mL H₂O DDI (agua destilada-desionizada) se disolvieron 2.35mL de H₂PO₄⁻ y 0.30mL de HPO₄²⁻. El registro del valor de pH se realizó a partir de lecturas mediante un potenciómetro.



Figura 2.4 Herramientas para realizar la Solución Buffer.

2.2.2 Preparación de Reactivo Fenton.

El compuesto que se utilizó como catalizador, como se mencionó en el primer capítulo, fue la combinación de Fe^{2+} y H_2O_2 .

Para la preparación de cada uno de estos se utilizarán diferentes compuestos y soluciones.

Reactivo Fe^{2+} . Se utilizó $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en estado sólido, una porción de éste se disolvió en agua destilada. Las cantidades del sulfato ferroso y el volumen del agua destilada proporcionaron, para el proceso de experimentación, una concentración 25mM y otra 18mM.

Reactivo H_2O_2 . Se utilizó H_2O_2 al 50% en peso, una fracción de éste se disolvió en agua destilada. Las cantidades de peróxido y el volumen de agua destilada para su disolución generaron concentraciones 1000mM y 352mM.

Las cantidades para la creación de ambos reactivos, así como sus características como peso molecular y otras, se anexan al final de este documento (Anexo 6).

2.3 Caracterización del Simulador Solar.

El cálculo de la energía que irradia sobre el microorganismo a partir de instrumentos tales como el canal parabólico y el simulador solar proporciona una aproximación de la cantidad de energía que impactó a la membrana de las esporas de *B. subtilis*. Dicha energía recibida por el microorganismo no es la misma en ambos sistemas, diferentes fuentes de energía y factores como la geometría del captador y del irradiador, interfieren en la recepción de tal potencia y, por lo tanto, en la magnitud del daño hacia las esporas.

A partir de un análisis del comportamiento de la radiación solar realizado entre reactores con transmisión de energía alta y baja (Curcó et al., 1996) se caracterizó la cantidad de fotones irradiados que son aplicados al microorganismo a inactivar.

Como se muestra en la figura 2.5, la radiación generada por el Sol que no impacta de manera directa la muestra de estudio pasa a través de la atmósfera, impacta en el concentrador, o canal parabólico, es transmitida hacia el contenedor de la muestra del microorganismo utilizado para pruebas de fotocátalisis solar, la radiación atraviesa dicho contenedor provocando la interacción con el catalizador y así genera los radicales que inactivan al microorganismo. Tal radiación emitida en un principio desarrolla cambios y ajustes provocados por el trayecto desde su paso por la atmósfera terrestre hasta el impacto con los reactivos que conforman el catalizador, estos cambios y ajustes tienen que ser aproximados a partir de ecuaciones y variables que a continuación se presentan.

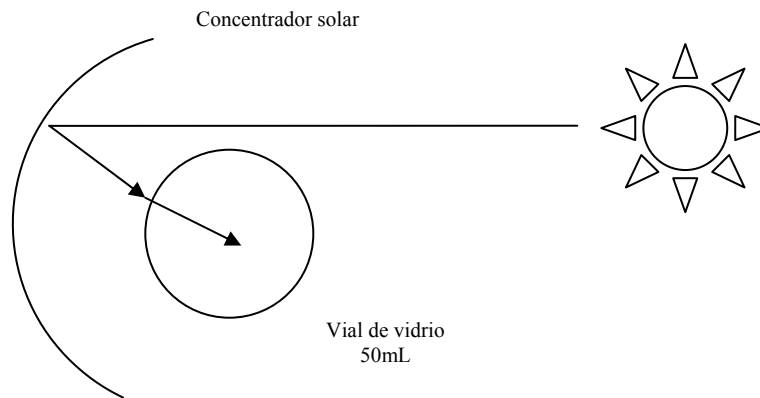


Figura 2.5 Transmisión de radiación solar a través de canal parabólico.

Se han caracterizado canales parabólicos desde el punto de vista de la radiación solar. Dicha cantidad de radiación que entra en estos colectores ha sido calculada a partir de una reacción actinométrica química. (Curcó et al., 1996)

Haciendo uso de un vaso de precipitados y una solución actinométrica (ácido oxálico 0.05M y sal de uranio 0.01M), la cual fue cubierta evitando su exposición a la luz, se expuso durante un tiempo determinado a la radiación emitida por un simulador solar, tomando antes una muestra cero para determinar la concentración inicial del ácido oxálico y después muestras a diferentes tiempos (ver página 38), y la correspondiente concentración del ácido antes mencionado fue calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$[Ox] = \frac{[KMnO_4] \cdot [V_{KMnO_4}]}{V_m}$$

La concentración de la solución de permanganato de potasio multiplicada por el volumen leído del mismo entre el volumen total de la muestra.

La radiación emitida por el simulador se registró a partir de un radiómetro conectado al mismo. En las pruebas realizadas se abarcó un rango de ondas de longitud de entre 300 y 540nm, que es el rango utilizable para la solución actinométrica.

La tasa de reacción depende de la radiación que entra al vaso de precipitado que está en exposición y de la radiación emitida por el simulador solar. Se han establecido ecuaciones matemáticas que relacionan ambos.

La radiación que arriba al vaso de precipitado se expresa como:

$$Fa = \sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} F_{\lambda}(t) \quad (\text{i})$$

donde:

Fa : radiación impactada en el vaso de precipitado.

$F_{\lambda}(t)$ = Flujo Fotónico (Einstein/s)

Einstein = 1 mol de fotones = 6.023×10^{23} fotones.

$$F_{\lambda} = \frac{N}{N_A} f(t) \quad (\text{ii})$$

donde:

N = número de fotones.

N_A = número de Avogadro.

$$N = \frac{W_{\lambda}}{E_{\lambda}} \quad (\text{iii})$$

donde:

W_{λ} = energía del haz de radiación.

E_{λ} = energía de un fotón.

de la ecuación de Planck:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (\text{iv})$$

donde:

h = constante.

c = velocidad de la luz en el espacio.

λ = longitud de onda.

sustituyendo en (ii), se obtiene:

$$F_{\lambda} = \left(\frac{1}{N_A \cdot h \cdot c} \right) \cdot W_{\lambda} \cdot \lambda \quad (\text{v})$$

ahora sustituyendo en (i), se obtiene:

$$Fa = \sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} F_{\lambda} = \frac{S}{N_A \cdot h \cdot c} \cdot \sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} W_{\lambda} \cdot \lambda \quad (\text{vi})$$

donde:

S = área de captación.

Como se sabe, sólo una parte de la radiación emitida por el simulador solar entra a la muestra expuesta a la misma. Para determinar estos dos aspectos existen dos factores: el factor de eficiencia, que está relacionado con las características del sistema, su geometría, su posición con respecto a la fuente de emisión de la radiación y no depende de la longitud de onda, y el segundo, factor de transmisión, el cual depende del material del reactor (vaso de precipitado) y es dependiente de la longitud de onda (Curcó et al., 1996). En algunos casos el proveedor del reactor informa el valor para el factor de transmisión del mismo, mientras que para el factor de eficiencia es necesario calcularlo para cada tipo de experimento.

Incluyendo en la anterior ecuación (vi) los factores de eficiencia y de transmisión, se tiene:

$$Fe = \frac{\Phi_{ef} \cdot S}{N_A \cdot h \cdot c} \cdot W_T \cdot \sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \lambda \cdot f_{\lambda} \cdot \Phi_T \quad (\text{vii})$$

donde:

Φ_{ef} = factor de eficiencia (relacionada con la geometría del concentrador y el movimiento del sol).

Φ_T = factor de transmisión (relacionado a las características de los materiales y la longitud de onda).

f_{λ} = distribución espectral.

f_{λ} se obtiene con la siguiente ecuación:

$$f_{\lambda} = \frac{UV_{\lambda}}{\sum_{\lambda=300nm.}^{\lambda=400nm.} UV_{\lambda}} * 1 \quad (\text{viii})$$

Dependiendo de la inclinación del Sol con respecto a la Tierra, al igual que la hora de proyección de ésta, será posible calcular el valor aproximado del factor de transmisión.

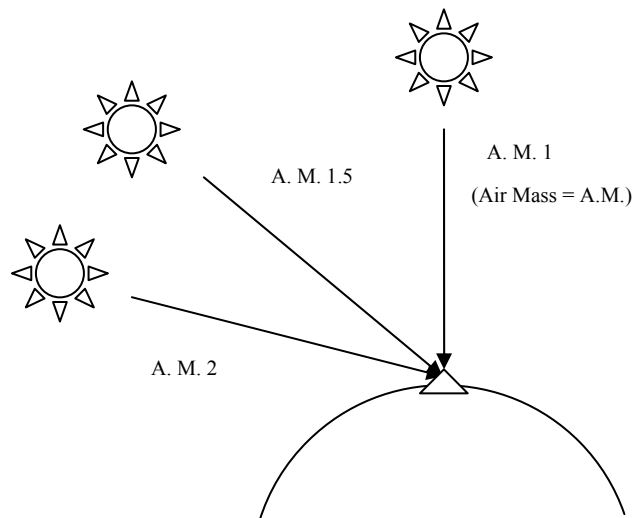


Figura 2.6 Distribución de Impacto de Radiación Solar sobre la superficie terrestre.

El Actinómetro, que consiste en el compuesto obtenido a partir de combinar sal de uranio y ácido oxálico, trabaja dentro de un intervalo de 300-550nm. de la radiación emitida por el Sol. La reacción entre ambos produce una tasa de reacción, la cual se puede ejemplificar con la siguiente ecuación:

$$r = \frac{dc}{dt} = f(F_{abs}) \quad (\text{ix})$$

La relación entre la velocidad de degradación del ácido oxálico (dc) y la radiación absorbida por el actinómetro (F_{abs}) es directa: a mayor degradación del primero mayor absorción del segundo.

La radiación absorbida y la entrante pueden ser relacionadas de manera óptica, además de tener un coeficiente de absorción (α_λ , por cm.) para la reacción media de cada onda de longitud.

$$F_{abs} = F_e \cdot [1 - \exp(-\alpha_\lambda \cdot D)] \quad (\text{x})$$

donde D es la lámina (altura) del actinómetro.

Agregando (x) en (vii) se obtiene:

$$F_{abs} = \frac{\Phi_{ef} S}{N_A hc} \cdot W_T \cdot \sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \lambda f_\lambda \cdot (1 - \exp(-\alpha_\lambda D)) \cdot \Phi_T \quad (\text{xi})$$

Introduciendo el factor de rendimiento cuántico (eficiencia fotónica) a la ecuación (xi), y a la vez esta ecuación expresada como la tasa de reacción, se tiene:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{\Phi_{ef} S}{V_T N_A hc} \cdot W_T \cdot \sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \lambda f_\lambda \cdot (1 - \exp(-\alpha_\lambda D)) \cdot \Phi_T \cdot \Phi_\lambda \quad (\text{xii})$$

donde:

V_T = volumen total del sistema.

Integrando la ecuación (xii) resulta:

$$c(t) = c_0 - \frac{\Phi_{ef} S}{V_T N_A h c} \cdot W_T \cdot \sum_{\lambda=300nm.}^{\lambda=500nm.} \lambda f_{\lambda} \cdot (1 - \exp(-\alpha_{\lambda} D)) \cdot \Phi_T \cdot \Phi_{\lambda} \quad (xiii)$$

donde:

$c(t)$ = concentración de ácido oxálico en cualquier tiempo de concentración.

c_0 = concentración de ácido oxálico inicial.

Observando la ecuación (xiii), todos los valores para las variables contenidas en la misma son conocidas, es decir, obteniendo la cantidad de fotones absorbidos por el sistema se puede obtener la cantidad de dosis de radiación que se aplica al microorganismo. El valor de concentración del ácido oxálico se conocerá a partir del procedimiento anexado al final del documento (Anexo 3).

2.4 Procedimiento de desinfección con fotocátalisis solar.

Se realizaron dos tipos de experimentos en los que se hizo uso de fotocátalisis solar, en condiciones de exposición natural y en condiciones de exposición artificial.

2.4.1 Fotocátalisis con Radiación Solar Natural.

Este método consiste en hacer uso de la energía solar, su radiación y la temperatura ambiente correspondientes, que influirán y harán factible la inactivación de esporas de *B. subtilis*.

De manera preliminar se prepararon los viales que contuvieron las muestras del microorganismo. Su adecuación consistió en crear una solución que contuviera: una cantidad calculada de esporas de *Bacillus subtilis*, las cantidades y concentraciones correspondientes del catalizador, un volumen también calculado de agua DDI. Se etiquetaron los viales de acuerdo a su tiempo de exposición y de almacenamiento. Se

crearon también: un control de sombra, el cual se colocó en un espacio exento de la radiación solar; un control de sol que contuviera la misma cantidad de microorganismos que las muestras anteriores; y finalmente, un control de temperatura, que contuvo agua DDI y a través de un termómetro de mercurio registrar la temperatura.

Se utilizó un canal parabólico de aluminio como transmisor de la radiación solar, cuya geometría provocara que el microorganismo suspendido fuera impactado por la energía solar emitida y así, lograr su eliminación. Este canal tuvo la longitud necesaria para la colocación de las muestras de esporas preparadas con anterioridad. Y su colocación fue en un espacio abierto y propicio para la captación de la radiación, y a un horario adecuado, al mediodía, para esta experimentación.

Para la medición de la radiación que impactó los viales colocados en el canal se utilizó un radiómetro, cuyo sensor estuvo ubicado en la misma posición que el captador, en la misma inclinación y alineación con respecto al Sol. Las unidades proporcionadas por este aparato son W/m^2 . La medición de la energía solar neta aplicada al microorganismo se obtuvo con el área del canal parabólico multiplicado por la cantidad de radiación leída por el aparato de medición.

El registro de datos de temperatura, radiación y tiempos de obtención de muestras después de su exposición se realizó a partir de una bitácora para mantener el control del experimento durante su tiempo de ejecución.

2.4.2 Fotocatálisis con Radiación Solar Artificial.

En este tipo de prueba las condiciones de radiación y de temperatura se logran controlar a partir de aparatos especializados, tales como el simulador solar.

La preparación de la muestra se realizará de igual manera que para una prueba con exposición natural, la diferencia se presenta en la cantidad de muestras. En condiciones artificiales sólo se requiere una muestra colocada en un vaso de precipitado cuyo diámetro no sobrepase el del haz de luz generado por el simulador.

El volumen total de la muestra será el suficiente para la toma periódica de muestras, dependiendo del control de tiempo acordado para el experimento.

2.5 Determinación de la viabilidad de esporas de *Bacillus subtilis*.

El siguiente procedimiento, y en el que se verifica la eficiencia y la calidad de la experimentación o, en algunos casos, aquellas condicionantes que evitan el óptimo resultado de la fotocatalisis solar es la viabilidad del microorganismos, es decir, el porcentaje de esporas vivas después de un proceso de inactivación en un tiempo determinado.

Este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología. Inicialmente, las muestras obtenidas durante un experimento de inactivación por fotocatalisis se llevaron al laboratorio antes mencionado, ahí se realizó el método de inoculación para esporas de *B. subtilis* que consistió en lo siguiente:

- Mediante una pipeta automática se extrajo 1mL de muestra y se colocó en el interior de una caja petri, este volumen puede variar dependiendo de la cantidad de microorganismos contenidos en la muestra.
- Se homogenizó la muestra mediante agar de soya, el cual ayudará al crecimiento de las esporas.
- Las cajas petri fueron etiquetadas con el tiempo de muestreo, la disolución de muestra y el tipo de experimento que representan.

- Las cajas fueron colocadas dentro de una incubadora a 37°C durante 24 horas.
- Al final de las 24 horas de incubación se procedió a la numeración de colonias contenidas dentro de las cajas.
- Mediante un contador electrónico (Véase Figura 2.9), el cual tiene una lupa para mejor visibilidad, se calcularon (si es de gran magnitud la densidad dentro de la caja) o se registraron el total de esporas encontradas en la caja correspondiente a una muestra.
- Registrando los totales por caja y recalculando el total de microorganismos, dependiendo las diluciones realizadas hasta la muestra inoculada, se graficaron con respecto al tiempo.
- La cantidad de esporas observadas en el tiempo cero se tomó como referencia para el cálculo de fracciones viables a otros tiempos.



Figura 2.7 Detalle de Inoculación de Esporas sobre Caja Petri de 100 mL.



Figura 2.8 Detalle de Vaciado de Agar y Homogeneización de Suspensión sobre Caja Petri.



Figura 2.9 Contador Electrónico de Microorganismos.