

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Densidad de Stock de Esporas de *Bacillus subtilis*.

En la sección 2.2 se señaló la importancia del conocimiento de la densidad del microorganismo por unidad de volumen. En la Tabla 3.1 se presentan los resultados de los conteos de las muestras realizadas:

Tabla 3.1 Resultados de Densidad de Esporas de *B. subtilis* en Muestras 1 y 2.

Dilución	u.f.c. Caja 1	u.f.c. Caja 2
-4	7,840	7,560
-3	78,400	75,600
-2	784,000	756,000
-1	7,840,000	7,560,000
0	78,400,000	75,600,000
Total:	78,400,000	75,600,000
Densidad Promedio Muestra 1 (^{ufc} /mL):	77,000,000	
Dilución	u.f.c. Caja 1	u.f.c. Caja 2
-5	712	658
-4	7,120	6,580
-3	71,200	65,800
-2	712,000	658,000
-1	7,120,000	6,580,000
0	71,200,000	65,800,000
Total:	71,200,000	65,800,000
Densidad Promedio Muestra 2 (^{ufc} /mL):	68,500,000	

Las densidades promedio de cada muestra realizada proporcionan, en ambos casos, un orden de magnitud 10^7ufc/mL .

3.2 Caracterización del Simulador Solar.

En sección 2.3 de este proyecto se realizó la deducción y definición de cada variable necesaria para el cálculo de la cantidad de fotones que entran al sistema del proceso de inactivación.

Mediante una hoja de cálculo (ver anexo No. 4) se realizaron los cálculos correspondientes dependiendo de los resultados obtenidos de la concentración de ácido oxálico en las pruebas llevadas a cabo en el laboratorio.

La siguiente figura muestra el comportamiento del ácido oxálico respecto a la radiación acumulada emitida por el simulador solar, es decir, a mayor radiación acumulada menor concentración de ácido.

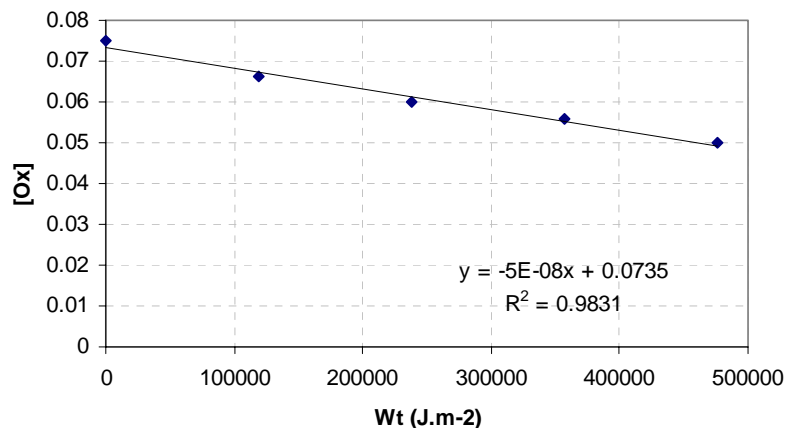


Figura 3.1 Concentración Ácido Oxálico vs Radiación Acumulada.

La cantidad de fotones (en Einsteins) que entra al sistema cada segundo para la potencia radiativa que se experimentó fue de:

$$Fe = 1.686E + 06 \frac{Eins}{s}$$



Figura 3.2 Set Experimental Empleado Para la Caracterización del Simulador Solar Utilizado.

3.3 Efecto de la energía solar simple como inactivador.

Esta prueba tuvo como finalidad el evaluar la eficiencia de la energía solar para inactivar de esporas de *Bacillus subtilis*.

A continuación se enlistan las condiciones bajo las cuales fue realizada esta prueba de inactivación solar:

- El material a utilizar se encontraba esterilizado.
- El volumen de microorganismo fue de 0.1mL tomado de una primera dilución del stock de esporas de *B. subtilis* original.
- El microorganismo fue disuelto en un volumen total de muestra de 10mL colocados en un vaso de precipitado de 25mL.
- Medio: agua destilada-desionizada.
- Para la toma de muestras se utilizó material tal como pipetas automáticas y contenedores para dichas muestras. El volumen de cada muestra fue de 0.1mL tomado del vaso de precipitados expuesto a la radiación.
- Las muestras tomadas se retiraron de la luz y refrigeraron a 4°C.

- Se llevó registro del tiempo de muestras y de la radiación emitida por el simulador solar. La lectura de radiación fue obtenida por un radiómetro conectado al aparato. La Tabla 3.2 muestra el registro experimental.

Tabla 3.2 Registro de Muestreo para Prueba de Inactivación Solar.

Muestra No.	Hora	Radiación (W/m ²)	Chequeo
0	08:49hrs.	1063	✓
1	12:49hrs.	1324	✓
2	16:49hrs.	1164	✓
3	20:49hrs.	1117	✓
4	00:49hrs.	1124	✓
5	08:49hrs.	1053	✓

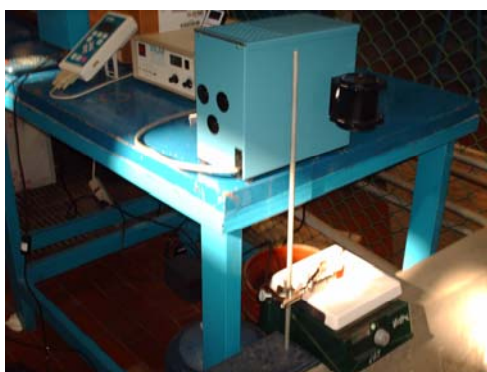


Figura 3.3 Simulador Solar en Uso.

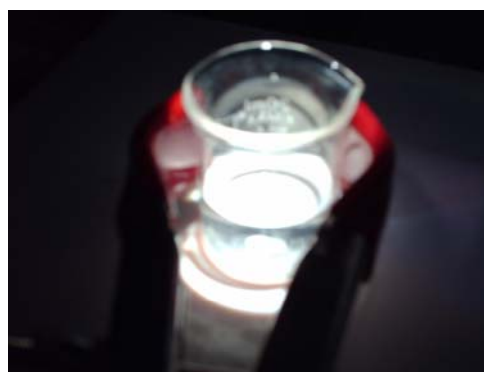


Figura 3.4 Vaso de Precipitado de 25 mL con Muestra de 10 mL Expuesto a Haz de Luz Colimado.

Se observa en la Figura 3.5 el comportamiento de la cinética de inactivación obtenida. A partir de las 4 horas de exposición aumentó la tasa de inactivación del microorganismo de manera lineal y con una pendiente elevada. Si se proyecta dicha línea de inactivación hacia el eje de las abscisas se constatará que el tiempo requerido para

inactivar 100% de esporas de *B. subtilis* con energía solar simple es de 13 horas aproximadamente.

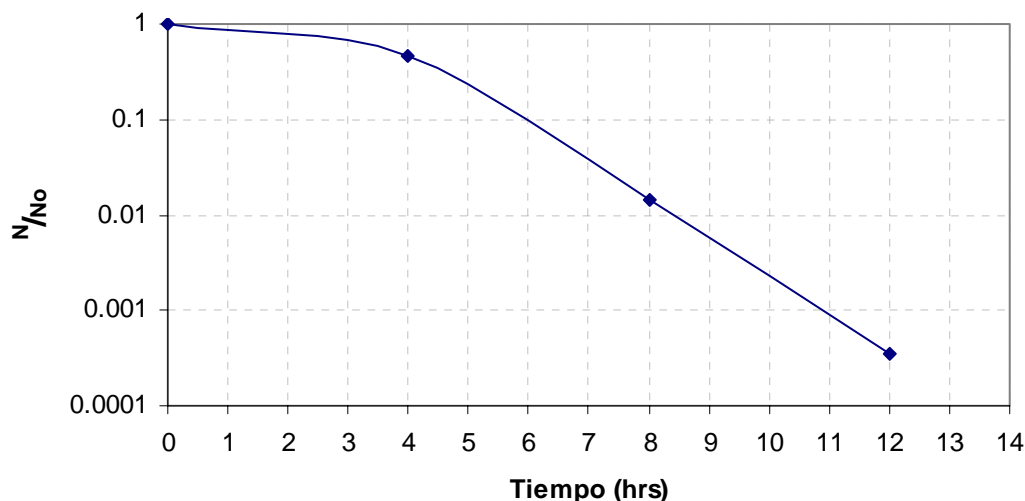


Figura 3.5 Inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* con radiación solar artificial (Simulador Solar) SIN catalizador de ningún tipo (20°C, agua destilada, $\sim 10^6$ ufc/mL @ t_0).

3.4 Efecto de la fotocatalisis solar como inactivador.

El anterior capítulo presentó los resultados para una prueba de inactivación de esporas de *B. subtilis* haciendo uso de la energía solar simple, sin catalizador y durante un tiempo de exposición de 24 horas. En este apartado se describirán las pruebas realizadas con fotocatalisis solar, en exposición natural y artificial, se presentarán los resultados de pruebas con diferentes concentraciones de catalizador, al igual que diferentes tiempos de inactivación.

3.4.1 Efecto de la fotocatalisis solar con exposición natural.

En condiciones de exposición natural se realizaron dos pruebas con fotocatalisis, – ambas con las mismas características de catalizador, pero diferentes concentraciones del mismo–, ambas también con volúmenes de muestra y medición de radiación solar similares.

Prueba 1.

El experimento se realizó en las instalaciones del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, ubicado en la Ciudad de Jiutepec, en el Edo. De Morelos. El aparato captador de la radiación solar utilizado fue el canal parabólico.

El procedimiento en campo se enumera a continuación:

- Preparación de los viales de muestreo.
 - Se expusieron a la radiación solar 6 viales: 1 para control de sombra (denominado como muestra inicial al tiempo cero), 3 para inactivación con fotocátalisis, 1 para inactivación con energía solar simple y el último para control de temperatura.



Figura 3.6 Detalle de concentrador parabólico empleado para elaboración de pruebas de desinfección a escala de banco (IMTA, 2006).

- El volumen total, tanto del control de sombra como de las muestras inactivadas con fotocátalisis, fue de 55mL donde se disolvieron las siguientes cantidades de catalizador y microorganismo:

550 μL de H_2O_2 1000mM + 550 μL de FeSO_4 25mM + 100 μL de Esporas de *B. subtilis*

* Se recomienda agregar al vial de manera última, y antes de su exposición, el H_2O_2 1000 mM evitando así que la reacción con el FeSO_4 25mM inicie.

- El volumen total para la muestra inactivada con radiación solar simple fue de 55mL donde se disolvió únicamente 100 μ L de Esporas de *B. subtilis*.
- El último vial, para control de temperatura, contuvo el mismo volumen total que las muestras anteriores.
- Se llevó registro del tiempo de muestras y de la radiación captada por el canal parabólico. La lectura de radiación fue obtenida por un radiómetro instalado paralelamente al sistema. La Tabla 3.3 muestra el concentrado de datos de la prueba.

Tabla 3.3 Registro de Muestreo para Prueba de Inactivación con Fotocatálisis Solar.

Hora	Radiación (W/m ²)	Temperatura °C	Toma de muestra
12:15	1039	27	
12:25	1047.1		
12:35	1060.5	34	
12:45	1053.3		Se almacenó 1 ^{er} tubo de 30'
12:55	1055.4	39	
13:05	1049.5		
13:15	1037.6	40	Se almacenó 2 ^o tubo de 60'
13:25	1027.2		
13:35	1023.2	41	
13:45	1017.8	41	Se almacenó 3er tubo de 90' junto con Control de Sol

- Las muestras fueron colocadas en una hielera para refrigeración y evitar su exposición con la radiación solar nuevamente.



Figura 3.7 Refrigeración de muestras.

- Posteriormente se realizó la inoculación para el análisis de viabilidad de las esporas.
- Finalmente se realizó el conteo de microorganismos y se registró en una memoria de cálculo.

Los resultados obtenidos para este experimento se observan en la Figura 3.8. Resalta la mayor eficiencia inactivadora por parte del proceso de fotocátalisis en comparación de la inactivación simple. La memoria de cálculo para esta prueba se anexa al final de este documento. El porcentaje de inactivación por fotocátalisis para este caso fue de **96.4%** en un tiempo de exposición de 90 minutos, mientras que el porcentaje de inactivación por radiación solar simple, en este mismo experimento, fue de **65%** en el mismo periodo de exposición.

En la misma Figura se observa el comportamiento de ambas pruebas. La cinética del control de sol se puede interpretar como lineal y descendente, mientras que para fotocátalisis la cinética se presenta lineal en los primeros 30' para después aumentar la tasa de inactivación durante los siguientes 30' y a partir del minuto 60 de exposición se observa una disminución en la cinética considerable.

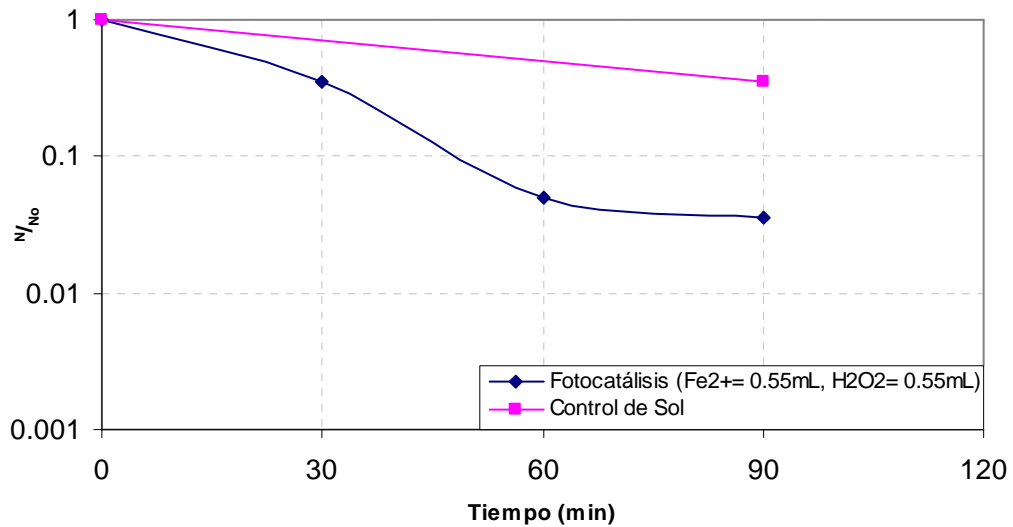


Figura 3.8 Inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* con fotocátalisis solar (♦) y con radiación solar natural solamente (■).

Prueba 2.

Esta experimentación consistió en reproducir la realizada en las instalaciones del IMTA, pero ahora en la Universidad de las Américas Puebla.

Se buscó aumentar la dosis de catalizador con la finalidad de disminuir el tiempo de exposición y aumentar la cinética de inactivación del microorganismo.

El procedimiento en campo se enumera a continuación:

- Preparación de los viales de muestreo.
 - Se expondrán a la radiación solar 6 viales: 1 para control de sombra (denominado como muestra inicial al tiempo cero), 3 para inactivación con fotocátalisis, 1 para inactivación con energía solar simple y el último para control de temperatura.

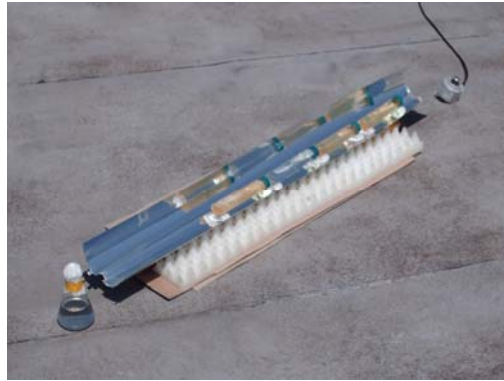


Figura 3.9 Arreglo Experimental Empleado en Experimentos de Desinfección con Fotocatálisis Solar en UDLA-P.

- El volumen total, tanto del control de sombra como de las muestras inactivadas con fotocatalisis, es de 55mL donde se disolverán las siguientes cantidades de catalizador y microorganismo:
1.1mL de H_2O_2 1000 mM + 1.1mL de FeSO_4 25 mM + 100 μL de Esporas de *B. subtilis*
 - * Se recomienda agregar al vial de manera última, y antes de su exposición, el H_2O_2 1000mM evitando así que la reacción con el FeSO_4 25 mM inicie.
- El volumen total para la muestra inactivada con radiación solar simple es de 55mL donde se disolverá únicamente 100 μL de Esporas de *B. subtilis*.
- El último vial, control de temperatura, contendrá el mismo volumen total que las muestras anteriores.
- Se llevó registro del tiempo de muestras y de la radiación captada por el canal parabólico. La lectura de radiación fue obtenida por un radiómetro instalado paralelamente al sistema.

Tabla 3.4 Registro de Muestreo para Prueba de Inactivación con Fotocatálisis Solar.

Hora	Tiempo (min)	T °C	Radiación (W/m ²)	Toma de Muestra
13:00	0	-	1015	
13:10	10	-	1000	
13:15	15	28	999	✓
13:20	20	29	1010	
13:30	30	-	1003	
13:40	40	33.5	1077	
13:45	45	34	1011	✓
13:50	50	-	1030	
14:00	60	35	1027	
14:10	70	-	964	
14:15	75	37	951	✓

- Las muestras son colocadas en una hielera para refrigeración y evitar su exposición con la radiación solar nuevamente.
- Posteriormente se realiza la inoculación para el análisis de viabilidad de las esporas.
- Finalmente se realiza el conteo de microorganismos y se registra en una memoria de cálculo.

Los resultados correspondientes a la Prueba No. 2 se muestran en la figura 3.10. En este caso el control de sol presenta una mayor inactivación de microorganismos al igual que la línea correspondiente a fotocatalisis. El porcentaje de inactivación por fotocatalisis para este caso fue de **98.56%** en un tiempo de exposición de 75 minutos, mientras que el porcentaje de inactivación por radiación solar simple, en este mismo experimento, fue de **95.12%** en el mismo periodo de exposición.

En comparación con la Prueba No. 1, para fotocatalisis, se obtuvo una mayor inactivación en un menor tiempo de exposición. En lo referente a la comparación de los controles de sol para ambas pruebas cabe resaltar la cinética de la Prueba No.2 donde el porcentaje de inactivación aumentó considerablemente, dicho incremento pudo presentarse por factores tales como la inactivación del microorganismo sin radiación UV/visible, la concentración del reactivo catalizador, la radiación recibida en la muestra, entre otros.

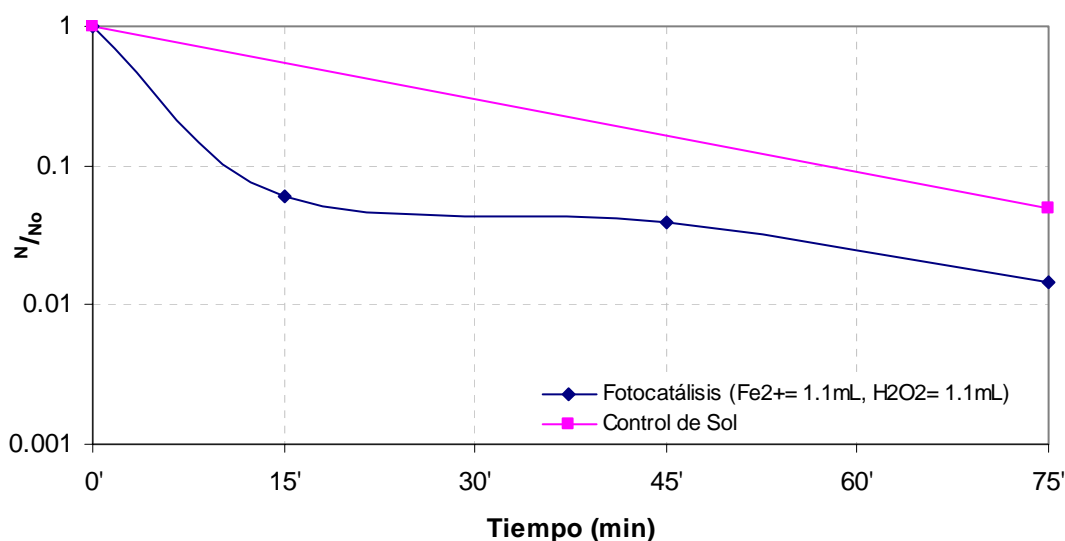


Figura 3.10 Inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* con fotocatalisis solar (♦) y con radiación solar natural solamente (■).

3.4.2 Efecto de la fotocatalisis solar con exposición artificial.

Se realizaron pruebas en diferentes condiciones de concentración de catalizador, concentración de microorganismo, soluciones búfer.

Prueba 1.

Haciendo uso del simulador solar, como fuente emisora de radiación solar, se realizó este experimento. Con los resultados obtenidos previamente en la inactivación por fotocatalisis solar, en condiciones naturales, ahora se busca obtener la misma eficiencia en

el proceso ahora realizando pruebas en un ambiente controlado como lo es dentro de un laboratorio.

El procedimiento en laboratorio se enumera a continuación:

- Preparación del vaso de precipitado de muestreo.
 - Se expondrá a la radiación solar 1 vaso de precipitados. En este caso no se realizará muestreo con un control de sol.
 - El volumen total es de 10mL, donde se disolvieron las siguientes cantidades de catalizador y microorganismo:

0.2mL de H₂O₂ 352 mM + 0.2mL de FeSO₄ 25 mM + 182 μL de esporas de *B. subtilis*

* Se recomienda agregar a la muestra de manera última, y antes de su exposición, el H₂O₂ 352 mM evitando así que la reacción con el FeSO₄ 25 mM inicie.

- Se llevó registro del tiempo de muestras y de la radiación captada por el canal parabólico. La lectura de radiación fue obtenida por un radiómetro instalado paralelamente al sistema.
- Las muestras son refrigeradas para detener la reacción del catalizador y también son almacenadas para evitar su exposición con la radiación solar nuevamente.
- Posteriormente se realiza la inoculación para el análisis de viabilidad de las esporas.
- Finalmente se realizó el conteo de microorganismos y se registró en una memoria de cálculo.

Con la memoria de cálculo se puede graficar la cinética de inactivación del microorganismo en estudio tal como se muestra en la Figura 3.11, se observa el comportamiento inicial lineal de la inactivación. A los 75 minutos de exposición, la muestra presenta menos del 1% de esporas vivas.

Observando las Figuras 3.10 y 3.11, las concentraciones de catalizador son las mismas, ajustadas a los volúmenes correspondientes de las muestras expuestas. El comportamiento de la cinética de cada experimento es diferente. El comportamiento lineal descendente y con una tasa de inactivación alta para la prueba realizada en condiciones *naturales* provoca que en 15 minutos de exposición el porcentaje de inactivación sea alto (**93.90%**) a comparación del experimento realizado en condiciones *artificiales* en el cual dicho porcentaje, al mismo tiempo de exposición, es de **24.13%**. continuando el análisis para ambos experimentos, al finalizar la exposición de las muestras, a los 75 minutos, se observa que finalmente la prueba realizada en el laboratorio tiene un mayor porcentaje de inactivación (**99.53%**) mientras que la prueba realizada en campo registra **98.56%** de inactivación de esporas de *B. subtilis*. La tasa de inactivación se invirtió en ambos casos, mientras que para fotocátalisis con radiación *artificial* aumentó significativamente, para fotocátalisis con radiación *natural* la cinética disminuyó pero se mantuvo de manera descendente.

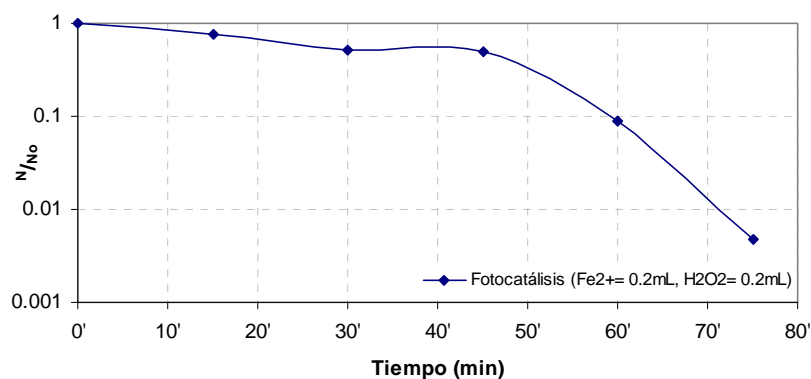


Figura 3.11 Inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* con fotocátalisis solar (♦).

Prueba 2.

El procedimiento para esta segunda prueba con simulador solar es el mismo al de la primera experimentación. La diferencia entre una y otra prueba es la concentración del catalizador y la cantidad de esporas de *B. subtilis*.

La muestra será la composición de los siguientes elementos y sus respectivas cantidades:

0.2mL de H₂O₂ 352 mM + 0.5mL de FeSO₄ 18 mM + 100 μL de Esporas de *B. subtilis*

Los tiempos de exposición variaron igualmente.

- Las muestras son refrigeradas para detener la reacción del catalizador y también son almacenadas para evitar su exposición con la radiación solar nuevamente.
- Posteriormente se realiza la inoculación para el análisis de viabilidad de las esporas.
- Finalmente se realiza el conteo de microorganismos y se registra en una memoria de cálculo.

Observando la Figura 3.12 se observa la inactivación total del microorganismo, a expensas del prolongado tiempo de exposición de la muestra. Aproximadamente a las 3 horas de exposición se logró el ~100% de inactivación de esporas.

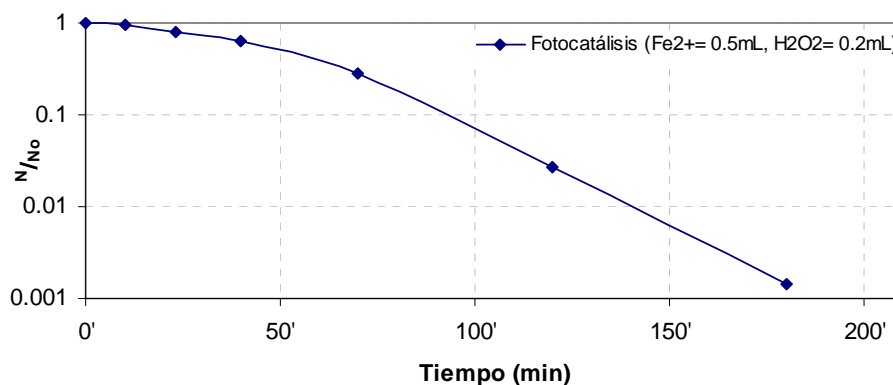


Figura 3.12 Inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* con fotocátalisis solar (♦).

3.5 Efecto del uso de cercosporín en fotocátalisis solar.

Esta toxina tiene la capacidad de eliminar células vegetales de manera rápida debido a que es un componente fotosensible, lo cual indica que en ausencia de radiación solar es inofensivo para las células. En presencia de energía solar el cercosporín genera oxígenos singletes (O^{\bullet}) e iones superóxidos durante la irradiación. Células vegetales y bacterias son rápidamente eliminados por el cercosporín en presencia de luz.

Por su capacidad de inactivación debida a la reacción con la energía solar se utilizó esta toxina en un experimento.

Los resultados de esta prueba muestran poca eficiencia en la inactivación del microorganismo, en 40 minutos de exposición se logró inactivar aproximadamente el **42%** del total de esporas. Como se observa en la Figura 3.13, el comportamiento cinético de la inactivación a partir del minuto 15 de exposición es prácticamente nulo o muy escaso.

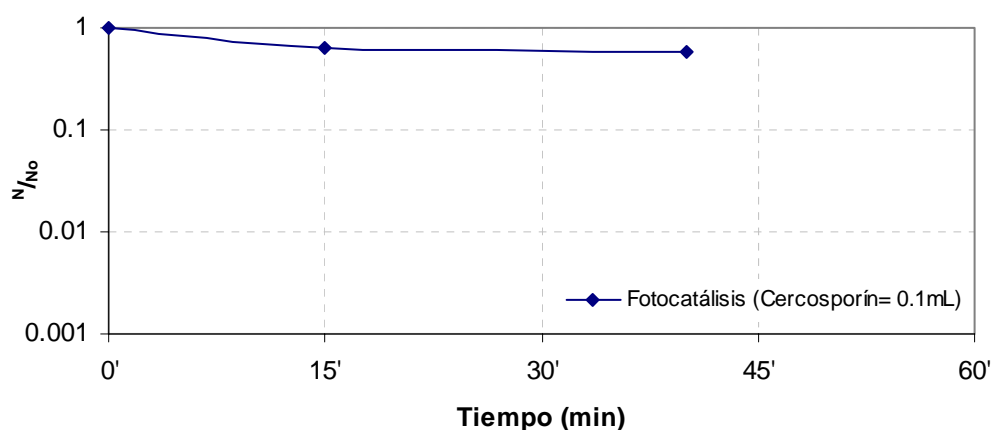


Figura 3.13 Inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* con fotocátalisis solar utilizando cercosporín (♦).

3.6 Efecto de la concentración del catalizador en fotocátalisis solar.

En los apartados anteriores se hizo referencia a experimentos realizados a partir de diferentes dosis de metal y de oxidante, e incluso, diferentes concentraciones de ambos.

En la Figura 3.14 se observan las líneas correspondientes a dos concentraciones de catalizador (metal-oxidante) diferentes, siendo Catalizador 1X la prueba realizada en las instalaciones del IMTA y Catalizador 2X el experimento realizado en la UDLA-P.

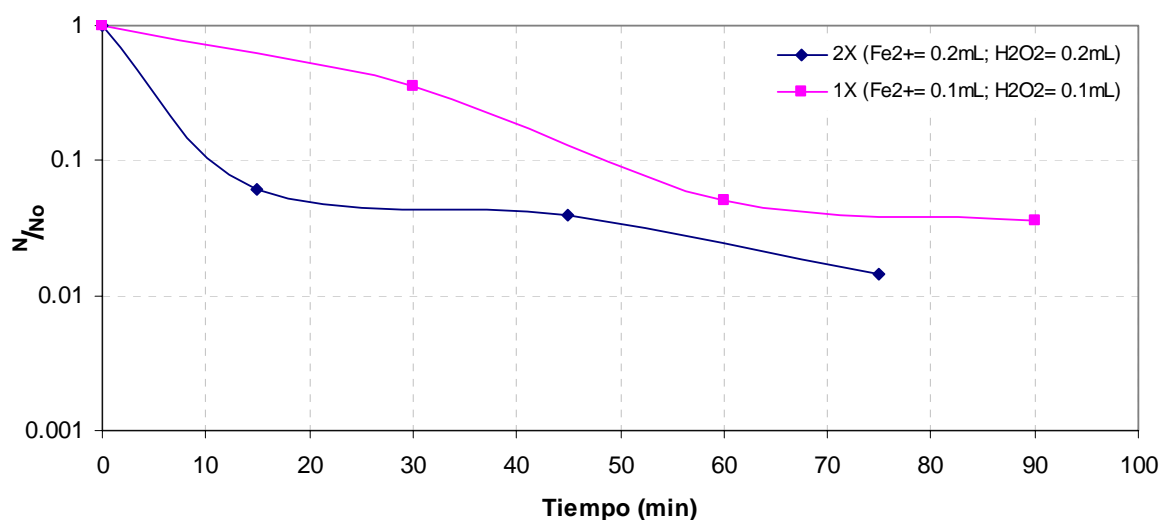


Figura 3.14 Efecto de la concentración de catalizador y oxidante en la inactivación de esporas de *B. subtilis* con fotocátalisis solar empleando radiación solar natural.

El Catalizador 2X requirió menor tiempo para llegar a un mayor porcentaje de inactivación (**98.56%**) de esporas de *B. subtilis*, por el contrario, el catalizador 1X tuvo mayor tiempo de exposición con la radiación solar y el porcentaje de viabilidad fue mayor al del otro catalizador (**3.6%**). A mayor cantidad de catalizador en el proceso de inactivación menor el tiempo de exposición y mayor el porcentaje de inactivación.

3.6.1 Efecto de la concentración del reactivo Fe^{2+} .

La concentración de uno de los componentes del catalizador usado en los experimentos, a excepción del cercosporín, influye directamente en la reacción metal-oxidante provocada por el contacto con la energía solar.

Dos de las pruebas realizadas con el simulador solar en trabajo de laboratorio tuvieron esta característica, hacer uso de diferentes concentraciones de sulfato ferroso (25mM y 18mM).

Tal condición genera la siguiente gráfica, Figura 3.15, en la cual se ejemplifica de manera clara el accionar de cada una de las reacciones correspondientes por cada tipo de concentración.

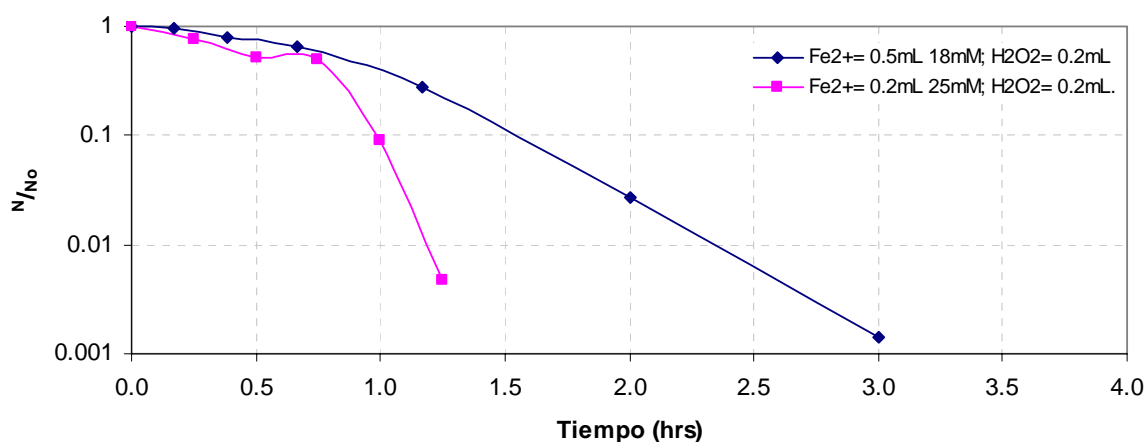


Figura 3.15 Efecto de la concentración de catalizador en la inactivación de esporas de *B. subtilis* con fotocátalisis solar empleando radiación solar artificial.

La solución de FeSO_4 25 mM trabaja en menor tiempo de exposición y al mismo grado de inactivación que la solución de FeSO_4 18 mM. Hay una diferencia de aproximadamente el doble en dichos tiempos para sulfato ferroso 25 mM se requirió un tiempo de 75 minutos para obtener un porcentaje de inactivación de **99.53%**, mientras que para sulfato ferroso 18 mM se requirieron 3 horas de exposición y obtener un porcentaje de

inactivación de **99.86%**. Ambas concentraciones provocan el 100% de inactivación de microorganismos para ambos experimentos, para FeSO_4 25 mM el tiempo de exposición es ~ 1.5 horas y para FeSO_4 18 mM un tiempo de ~ 3.5 horas.

3.6.2 Efecto de la concentración del reactivo H_2O_2 .

De igual manera que con el componente metálico, ahora se analiza el componente oxidante del catalizador utilizado en este proyecto. La finalidad es determinar si la concentración de H_2O_2 incluye directamente en el sistema de inactivación de esporas a través de fotocátalisis solar.

Comparando la Prueba 2 realizada en condiciones de exposición naturales y la Prueba 1 en condiciones de exposición artificiales se obtiene la siguiente gráfica:

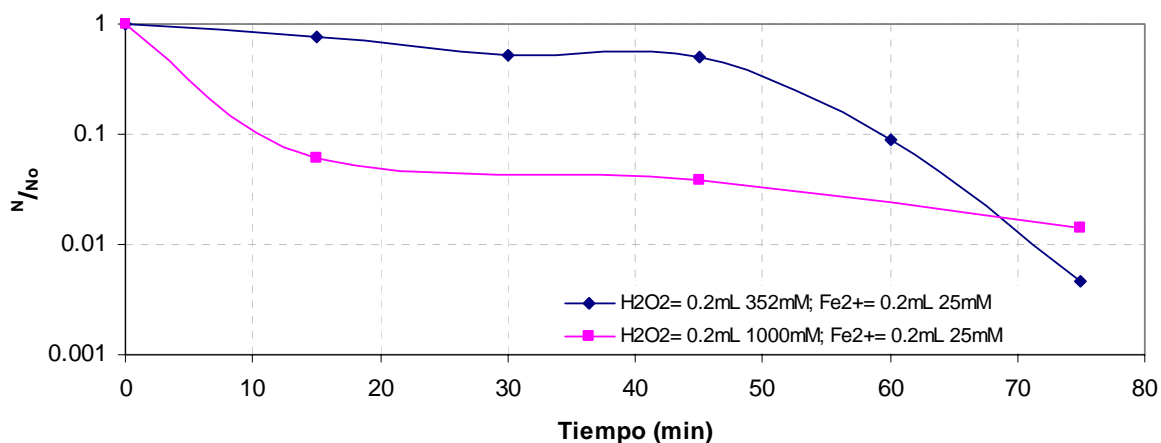


Figura 3.16 Efecto de la concentración de oxidante en la inactivación de esporas de *B. subtilis* con fotocátalisis solar.

El comportamiento de ambas líneas de inactivación se presenta inverso entre ambas. Mientras que para H_2O_2 352 mM la inactivación empieza de manera lineal y con una pendiente mínima, el H_2O_2 1000 mM inicia de manera abrupta hasta un punto en el que se empieza a estabilizar y, de manera contraria a esta, la otra línea de inactivación aumenta su

tasa de desinfección. Para el mismo tiempo de exposición, el catalizador con concentración H_2O_2 352 mM finaliza con un menor porcentaje de viabilidad del microorganismo.

3.7 Efecto de la concentración del microorganismo en fotocátalisis solar.

La cantidad de microorganismos disueltos en un cierto volumen también son factor para el proceso de fotocátalisis. Una gran cantidad de esporas disueltas en un volumen pequeño de muestra complica la reacción del catalizador y a la vez la entrada de la radiación emitida por el sistema, llevando así a la carencia de efectividad en la inactivación.

3.8 Efecto del pH en fotocátalisis solar.

Otro de los factores a analizar en este proyecto es el pH contenido en el agua utilizada para la desinfección por medio de energía solar fotocatalizada.

La mayoría de los experimentos realizados fueron realizados utilizando agua destilada, y otros con solución buffer fosfato 0.01 M, pH 6.0.

Haciendo uso de esta solución búfer se realizaron dos experimentos cuyas condiciones iniciales eran las siguientes:

Para Experimento 1:

- 1mL FeSO_4 18 mM.
- 0.4mL H_2O_2 1000 mM.
- 1mL de esporas de *B. subtilis*.
- Tiempo de exposición de 35 minutos.

Para Experimento 2:

- 0.5mL FeSO_4 18 mM.

- 0.2mL H₂O₂ 1000 mM.
- 1mL de esporas de *B. subtilis*.
- Tiempo de exposición de 70 minutos.

Para ambos experimentos se llevó registro de muestreo, así como de radiación emitida por el simulador solar.

Después de realizar la inoculación y el conteo para ambas pruebas se obtuvieron las siguientes gráficas:

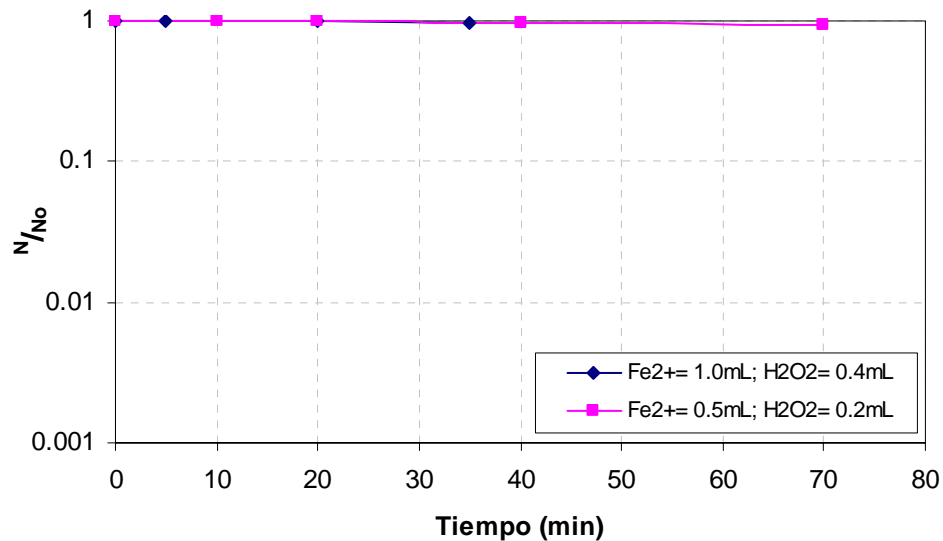


Figura 3.17 Inactivación de esporas de *B. subtilis* con fotocatalisis solar utilizando solución buffer pH = 6.0.

La inactivación para ambos ejemplos fue prácticamente nula. El buffer preparado a partir de fosfatos desprende estos evitando la reacción entre el metal y el oxidante, la muestra se enturbia y la eficiencia de la fotocatalisis solar se vuelve mínima.

El pH 6.0 es un valor alto para este tipo de experimentos, utilizando valores ácidos de pH, la reacción en el catalizador con la radiación sí es factible.

3.9 Inactivación Solar Simple y Fotocatálisis Solar

El uso de la energía solar como desinfectante de microorganismos presentes en el agua potable es factible y está avanzando terreno sobre otros métodos más costosos y que resultan más perjudiciales a la salud. El uso de un catalizador agregado a la radiación solar multiplica la eficiencia de la desinfección.

La siguiente gráfica, Figura 3.19, relaciona el experimento denominado Control de Sol (Inactivación con Energía Solar Simple) y la Fotocatálisis Solar en diferentes concentraciones de catalizador.

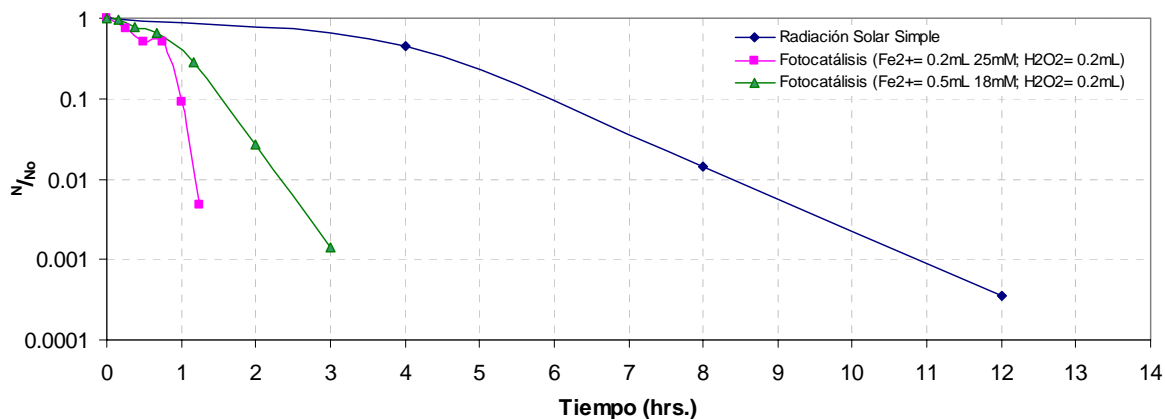


Figura 3.18 Inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* con radiación solar simple y fotocatalisis solar utilizando diferentes concentraciones de catalizador y oxidante.

La diferencia en tiempos de exposición requeridos para inactivar un porcentaje determinado de esporas entre Fotocatálisis y Energía Solar Simple es abrumadora. Se pueden lograr tiempos de inactivación en el rango de 1.5 horas a partir del uso de catalizador.