

CAPÍTULO 5

CONSTRUCCIÓN Y PROCEDIMIENTOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL REACTOR DE COLIMACIÓN.

5.1 Construcción del reactor.

Para la construcción del reactor se adquirieron lámparas con una potencia de 15 watts, una base metálica para las lámparas y el tubo colimador. Los pasos realizados para la construcción del equipo fueron los siguientes:

- 1) Se colocaron las lámparas en la base metálica.
- 2) Se pintó el tubo colimador de color negro y se adaptó su tamaño a la base metálica.

Como podemos observar con los pasos anteriormente descrito la construcción de un reactor de colimación es relativamente sencillo. La complicación radica en la estimación de la intensidad de las lámparas y la dosis biocida necesaria para inactivar microorganismos.

Para la caracterización del reactor de colimación fue necesario realizar pruebas de laboratorio. Las primeras pruebas realizadas fueron las de actinometría ya que era necesario conocer la intensidad de las lámparas UV. Posteriormente se realizaron pruebas de desinfección de agua, de las cuales se obtuvo las dosis necesarias de inactivación de microorganismos.

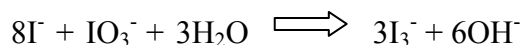
Los experimentos de inactivación se realizaron con dos tipos de microorganismos: *esporas de Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Ambos microorganismos fueron propagados y cultivados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Américas, Puebla. Las cepas originales también fueron proporcionadas por el mismo laboratorio. Se escogieron dichos microorganismos debido a que son los que presentan mayor resistencia a la radiación UV.

5.2 Caracterización del reactor.

5.2.1 Medición de la intensidad o fluence.

Para la preparación de la solución actinométrica de KI para determinar la radiación UV @ 254 nm se siguió el método propuesto por Rahn (1997).

La reacción base es:



1) *Solución: 50ml*

Yoduro (I^-): 0.6M = 4.98 g

Yodato (IO_3^-): 0.1 M = 1.07 g

0.01M buffer borato, pH9.25

Mediciones:

Triyoduro (I_3^-); absorbancia @ 352 nm

Yoduro (I^-); absorbancia @ 300 nm; $E=1.061M^{-1}cm^{-1}$

2) *Cálculo de la concentración de yoduro (I^-):*

Se usa la absorbancia de @ 300 nm para calcular la concentración inicial de

$$[I^-] = \text{Abs}_{300} \text{ cm}^{-1} / 1.061 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3) *Irradiación:*

Un volumen de muestra de 2 ml, se coloca en las celdas de cuarzo y se expone a la radiación UV (Figura 5.1) para medir su absorbancia a @ 300 y 352 nm.

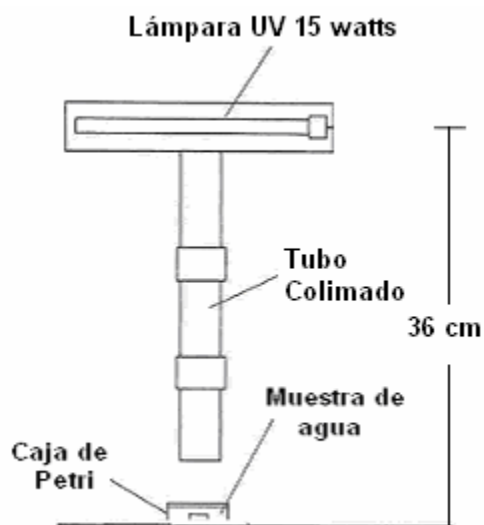


Figura 5.1 Reactor de colimación laboratorio de ingeniería civil UDLA.

$$a) \Phi = 0.75[1 + 0.002(T-20.7)][1 + 0.23(C-0.577)]$$

“el incremento en la Abs @ 352 nm se usa para calcular la concentración de triyoduro (I_3^-)”

$$b) [I_3^-] = \Delta \text{abs}_{352} / 26400 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

4) *Calcular el número total de MOLES formados de I_3^- :*

$$\text{Moles de } I_3^- = [I_3^-] \times (\text{volumen de la muestra})$$

5) *Cálculo de la energía recibida por la muestra (Einsteins):*

$$\text{Energía (einsteins)} = \text{moles de } I_3^- / \Phi = \text{No. incidente de fotones}$$

$$\text{Energía (Joules)} = (\text{No. de fotones}) \times (4.72 \times 10^5 / 1 \text{ einstein})$$

6) *Cálculo del tiempo de exposición:*

$$\text{Tiempo de exposición (watts)} = \text{energía(J)} / \text{tiempo de exposición}$$

$$\text{Intensidad o fluence} = \text{de exposición (watts)} / \text{area irradiada (cm}^2\text{)}$$

Los cálculos realizados para obtener la intensidad UV del equipo de colimación se encuentran en el Apéndice A.

A continuación se presentan los procedimientos para la preparación de los medios de cultivo, la propagación de los microorganismos y la inactivación de los mismos.

5.2.2 Preparación de esporas de *Bacillus subtilis*.

Para el cultivo de *Bacillus subtilis* se empleó Caldo Caso, también conocido como Caldo de Soya. Para ello se disolvieron 3.0 g de Soya por cada 100 ml de agua destilada (Figura 5.2), y la solución resultante fue introducida a una autoclave para su esterilización durante aproximadamente 2 hr.

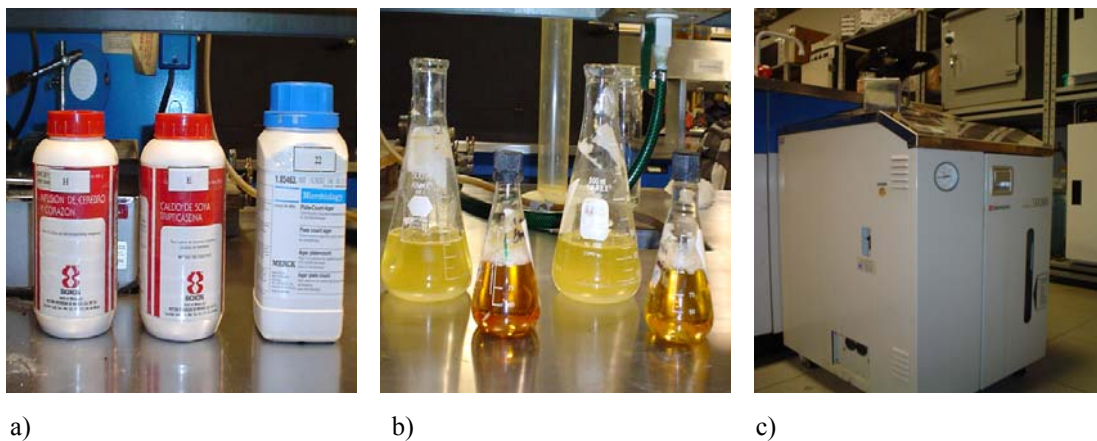


Figura 5.2 a) Caldo de Soya, Caldo BHI y Agar, b) Solución caldo-agua destilada y agar, c) Autoclave para esterilización.

Una vez que el caldo fue autoclavado y reposado por algunos minutos para permitir su enfriamiento, se procedió a inocularlo con dos “asadas” de cultivo original de *B. subtilis*. Posteriormente, el medio inoculado fue colocado a una temperatura de $\approx 35^{\circ}\text{C}$, por un lapso de 24 hr para permitir su incubación (ver Figura 5.3).



a) Esterilización de asa, b) Toma de microorganismos, c) Colocación de asadas de *Bacillus subtilis* en el caldo caso.

Es importante mencionar que el cultivo obtenido fue expuesto a un shock térmico para eliminar aquellas células vegetativas que hubieran quedado en el medio, seleccionando así únicamente a aquellos microorganismos que fueron capaces de esporular.

5.2.3 Preparación de *Staphylococcus aureus*.

El proceso de preparación de *S. aureus* fue muy similar al utilizado para *B. subtilis*, sólo que se empleó Caldo BHI (Infusión Cerebro-Corazón) como medio de cultivo. La preparación del medio requirió de 3.7 g de reactivo por cada 100ml de agua destilada (ver Figura 5.4). La temperatura y tiempo de incubación utilizados fueron los mismos que se emplearon para la preparación de las esporas.

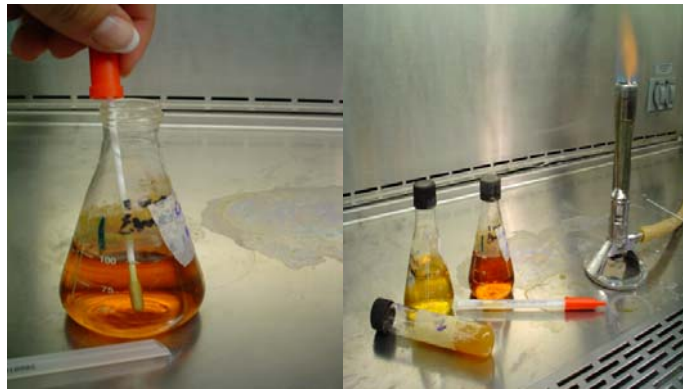


Figura 5.4 Inoculación de *S. aureus*.

5.2.4 Preparación de medio de cultivo (Agar).

El agar utilizado para estas pruebas fue Peptona de Extracto de Caseína y Glucosa de Levadura. Su preparación requirió la disolución de 22.5 g por cada litro de agua (ver Figura 5.5). Antes de introducir la solución en la autoclave fue necesario desmineralizarla y para ello se calentó en una parrilla (ver Figura 5.6). El agar se mantuvo en baño maría, a una temperatura de 45°C para evitar su solidificación antes de ser vertido a las cajas petri.



Figura 5.5 Agar nutritivo



Figura 5.6 Desmineralización del Agar

5.2.5 Preparación de los cultivos de estudio.

Los cultivos de estudio fueron preparados mediante la adición de 3 ml de una solución buffer fosfato (pH 7.0, 0.01M) a 1ml de caldo inoculado con el microorganismo correspondiente (Figuras 5.7 a y b).



Figura 5.7 a) Stock, b) Microorganismos diluidos en stock.

5.2.6 Procedimiento de Inactivación con radiación UV.

Para la inactivación de microorganismos se tomaron las cajas preparadas con los cultivos de estudio y fueron expuestas a diferentes dosis de radiación UV. Para cada prueba se obtuvo un conteo inicial del número de microorganismos vivos (N_o), el cual se ha tomado como base para determinar los porcentajes de inactivación conseguidos por cada dosis UV aplicada. Es importante mencionar que el N_o se determinó justo antes de iniciar cada prueba de desinfección. Una vez irradiadas las muestras, se procedió a agregarles agar y se les mantuvo a una temperatura de 35°C por 24 hr. Finalmente se realizó un conteo de colonias en las cajas incubadas de acuerdo al procedimiento descrito (ver Figura 5.8).

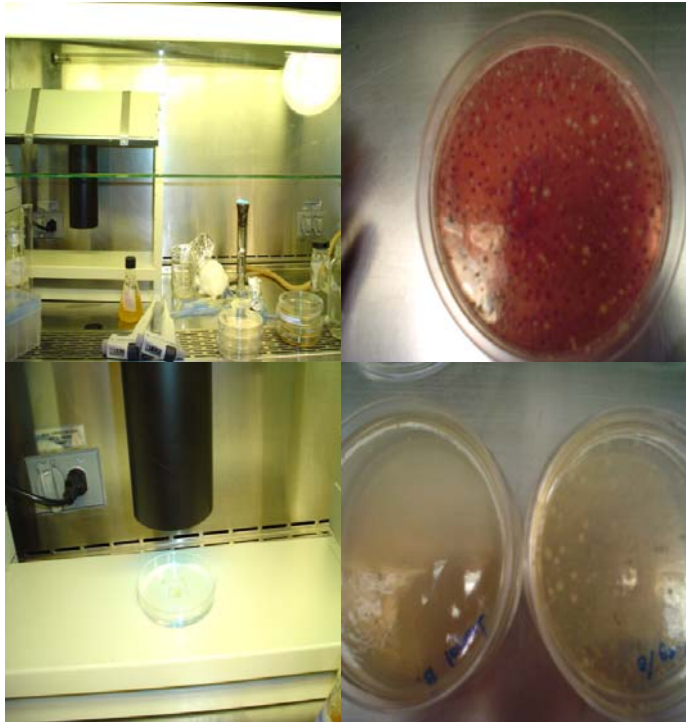


Figura 5.8 Exposición de microorganismos a la Radiación UV y platos petri con colonias después de incubación.

Una vez descritos los procedimientos necesarios para caracterizar del funcionamiento del reactor de colimación se presentan los resultados obtenidos con cada una de las pruebas.