

CAPITULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Este capítulo muestra los resultados obtenidos mediante actinometría para el cálculo de la intensidad de las lámparas UV y las dosis necesarias para la desinfección de agua arrojadas de las pruebas de inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

6.1 Resultados de las pruebas de actinometría.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante actinometría química la intensidad de la lámpara es de 1.95 mW/cm² en la Figura 6.1 se muestran la regresión calculada con los datos tomados en el laboratorio.

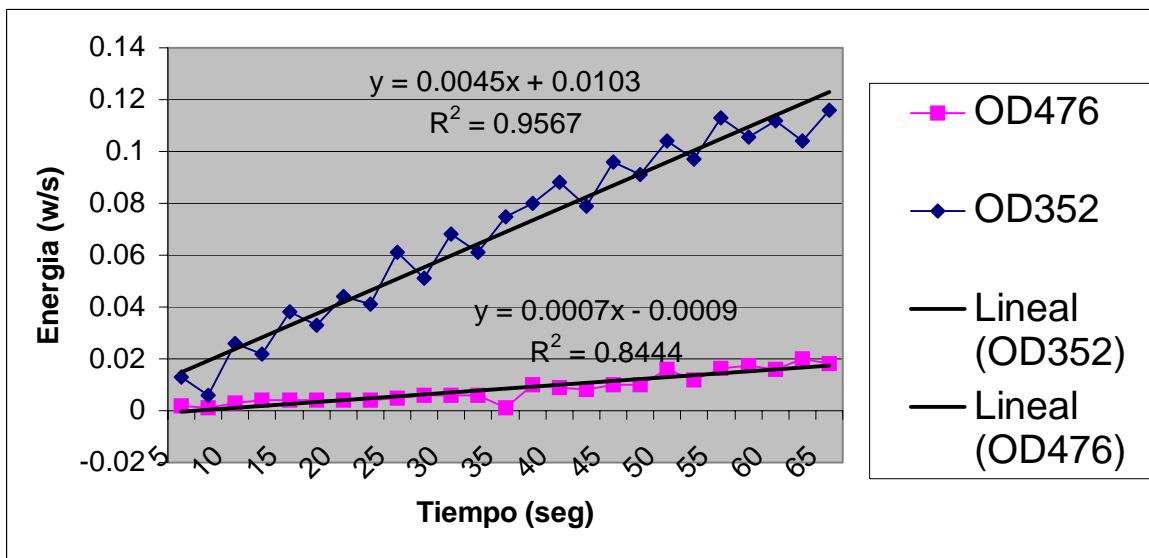


Figura 6.1 Resultados de la intensidad de la lámpara UV obtenidos mediante actinometría.

Los datos obtenidos de la actinometría para el cálculo de la intensidad graficados en la Figura 6.1 se muestran en el apéndice A (por cuestiones de formato).

6.2 Cinética de Inactivación de Esporas de *B. subtilis* y *S. aureus* con Radiación UV de Baja Presión.

El objetivo de estas pruebas es determinar la eficiencia germicida del reactor de colimación construido, esto mediante la inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* y *S. aureus*. Se decidió realizar una primera prueba exploratoria que sirviera como base para determinar si los tiempos de exposición deberían abrirse o cerrarse para caracterizar de manera adecuada la cinética de inactivación de los microorganismos de estudio. Los resultados de esta primera prueba fueron esenciales para el desarrollo de dos pruebas más que permitieran verificar las observaciones obtenidas.

A continuación se presentan los resultados de estas tres pruebas de inactivación de *B. subtilis* y *S. aureus* con radiación UV en el reactor de colimación construido.

Prueba No. 1. Se realizó una primera prueba de desinfección con los dos microorganismos de estudio. En las Tablas 6.1 y 6.2 se muestran los tiempos de exposición, las dosis UV utilizadas para cada caso y las fracciones vivas de microorganismos observadas después de la exposición.

Tabla 6.1 Tiempos de muestreo, dosis y fracción viva (N/N_0) después de exposición UV de esporas de *Bacillus subtilis*.

Tiempo (T)	Dosis (T*I)	Colonias	
(seg)	mJ/cm2	Muestra 1	N/No
Inicial	0	1500000	1
10	19.5	1000000	0.667
20	39	16000	0.011
30	58.5	10	6.667E-06
40	78	menos de 10	-
60	117	menos de 10	-

Tabla 6.2 Tiempos de muestreo y fracción viva después de exposición UV de *S. aureus*.

Tiempo (T)	Dosis (T*I)	Colonias	
(seg)	mJ/cm2	Muestra 1	N/No
Inicial	0	30000000	1
10	19.5	60000	0.002
20	39	30000	0.001
30	58.5	10	3.333E-08
40	78	menos de 10	-
60	117	menos de 10	-

Los datos contenidos en las Tablas 6.1 y 6.2 han sido graficados en la Figura 6.2 para permitir al lector una comparación visual entre las resistencias ofrecidas por los microorganismos de estudio a la desinfección UV.

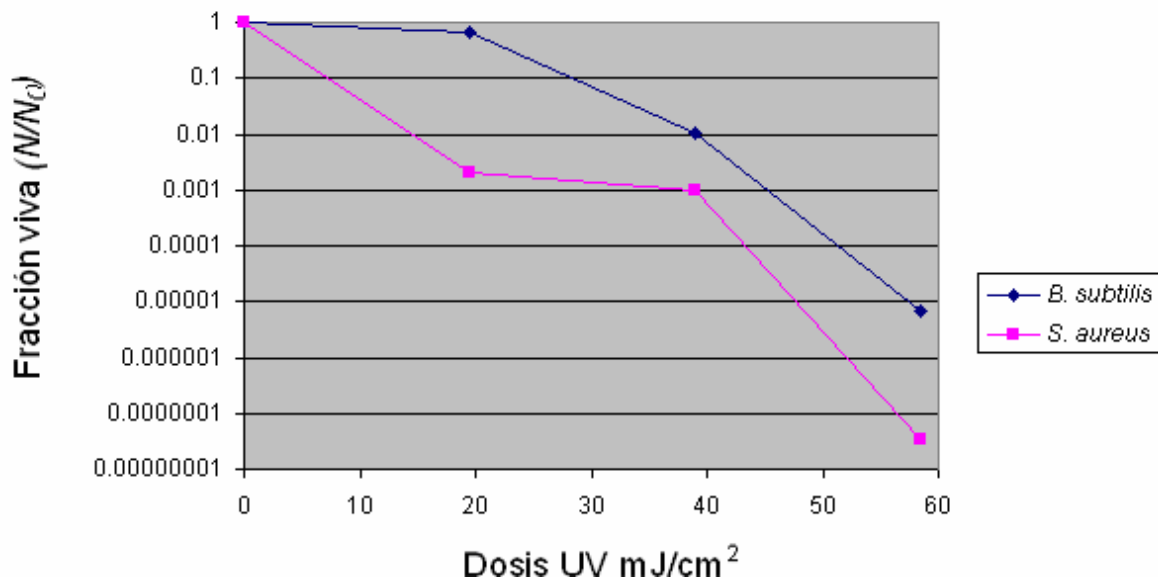


Figura 6.2 Resultados de la inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* con Radiación UV (prueba No1).

Las curvas de inactivación mostradas en la Figura 6.2 indican que las esporas de *B. subtilis* son ligeramente más resistentes a la desinfección UV que el *S. aureus*. No obstante, ambas cinéticas de inactivación son similares en cuanto a que la fracción de microorganismos (N/N_0) decrece cuando la dosis UV aumenta.

En esta prueba No.1 se empleó una concentración inicial de esporas de *B. subtilis* de 1.5×10^6 ufc/ml y de acuerdo a la Figura 6.2 se requiere una dosis arriba de 50 mJ/cm^2 para inactivar 4 fases logarítmicas (99.99 %) del microorganismo. Además, la Figura 6.2 indica que para dosis UV por arriba de los 20 mJ/cm^2 las esporas de *Bacillus subtilis* verán reducida su viabilidad en por lo menos un 50 %, y si esta dosis rebasa los 60 mJ/cm^2 entonces la fracción viva remanente será de prácticamente cero.

Con respecto a los datos de inactivación de *Staphylococcus aureus*, se puede observar que dosis de UV de $\approx 43 \text{ mJ/cm}^2$ permitirán inactivar 99.99% de este microorganismo. Cabe mencionar, que la concentración inicial de *S. aureus* empleada para esta prueba No.1 fue de $\approx 3 \times 10^8$ ufc/ml.

Prueba No.2. Tomando como referencia los resultados obtenidos en la prueba exploratoria se plantearon nuevos tiempos de exposición (y por lo tanto nuevas dosis UV) para caracterizar de mejor de manera la cinética de inactivación de ambos microorganismos. La Tabla 6.3 muestra un resumen de los tiempos de exposición y dosis UV aplicadas en la prueba de desinfección No.2.

Tabla 6.3 Tiempos de muestreo, dosis UV y fracción viva de *Bacillus subtilis* después de exposición UV.

Tiempo (T) (seg)	Dosis (T*I) mJ/cm ²	Colonias	
		Muestra 1	N/No
Inicial	0	55000000	1
5	9.75	120000	0.002
10	19.5	6700	1.218E-04
15	29.25	110	2.000E-06
20	39	80	1.455E-06
25	48.75	350000	0.006
40	78	470000	0.009
60	117	420000	0.008
90	175.5	570000	0.010
120	234	650000	0.012

Tabla 6.4 Tiempos de muestreo, dosis y fracción viva de *S. aureus* después de exposición UV.

Tiempo (T)	Dosis (T*I)	Colonias	
(seg)	mJ/cm2	<i>Muestra 1</i>	<i>N/No</i>
Inicial	0	150000000	1
5	9.75	20000	1.333E-04
10	19.5	1100	7.333E-06
15	29.25	880	5.867E-06
20	39	320	2.133E-06
25	48.75	240	1.600E-06
40	78	200000	0.001
60	117	630000	0.004
90	175.5	370000	0.002
120	234	110000	7.333E-04

Como puede observarse en las Tablas 6.3 y 6.4, la intención fue incrementar las dosis de UV –por lo menos al doble– para ambos microorganismos, y se busco cerrar los tiempos de muestreo para exposiciones cortas de manera que se obtuvieran más datos hacia el comienzo de las curvas de inactivación. Los resultados obtenidos en esta prueba No.2 se ilustran en la Figura 6.3.

En comparación con los resultados de la prueba No.1, se encontró que ambos microorganismos, *B. Subtilis* y *S. aureus*, pierden rápidamente su viabilidad al ser expuestos a dosis crecientes de radiación UV-C. No obstante, también es claro que la cinética de inactivación obtenida para estos microorganismos en la prueba No.2 contrasta con la obtenida en la prueba exploratoria.

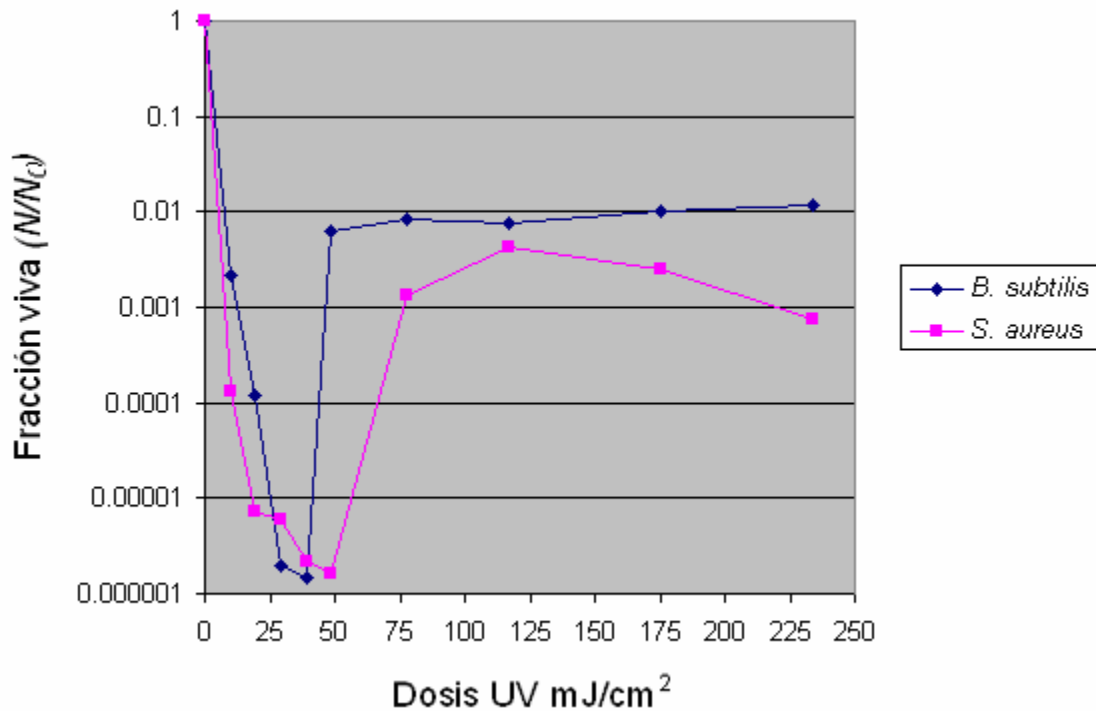


Figura 6.3 Resultados de la prueba No.2 de inactivación de esporas de *B. subtilis* y *S. aureus* con Radiación UV.

En esta segunda prueba se obtiene que dosis UV del orden de 50 mJ/cm² son suficientes para inactivar casi seis fases logarítmicas (99.9999 %) tanto de esporas de *B. Subtilis* como de *S. aureus* ello contrasta con las dosis de 50 mJ/cm² requeridas para inactivar cuatro fases logarítmicas (99.99 %) en la prueba No.1. A pesar de ello, la diferencia mayor entre los resultados de una y otra prueba se observa cuando las dosis UV rebasan los 125 mJ/cm². Cuando esto sucede ambos microorganismos parecen “reponerse” al decaimiento inicial y establecen una resistencia casi refractoria al desinfectante. Debido al fuerte contraste obtenido entre ambas pruebas se decidió realizar una tercera para confirmar los resultados de uno u otro caso.

Prueba No.3. Para la realización de esta tercer prueba se toman en consideración algunos factores que podrían afectar los niveles de exposición a que son sometidos los microorganismos durante las pruebas de desinfección.

Uno de los factores por considerar es el encendido/apagado de la lámpara ya que ésta podría estar emitiendo con mayor o menor intensidad durante los segundos siguientes al encendido. Para eliminar esta posible variable se decidió bloquear el tubo de colimación cada vez que se requiriera para tomar una muestra de microorganismo irradiado. La lámpara fue encendida 5 minutos antes del inicio de la prueba y se mantuvo encendida hasta que fue tomada la última muestra.

Los tiempos y dosis UV utilizados en esta prueba No.3 se presentan en las Tablas 6.5 y 6.6

Tabla 6.5 Tiempos de muestreo y fracción viva después de exposición UV de *Bacillus subtilis*

Tiempo (T) (seg)	Dosis (T)(I)	Colonias	
		Muestra 1	N/No
Inicial	0	5500000	1
5	9.75	28000	5.091E-04
10	19.5	5000	9.091E-05
15	29.25	19000	3.455E-04
20	39	40000	0.007
25	48.75	68000	0.012
40	78	70000	0.013
60	117	menos de 10	-

Tabla 6.6 Tiempos de muestreo y fracción viva después de exposición UV de *S. aureus*.

Tiempo (T) (seg)	Dosis (T)(I)	Colonias	
		Muestra 1	N/No
Inicial	0	150000000	1
5	9.75	120000	8.000E-04
10	19.5	520	3.467E-06
15	29.25	20	1.333E-07
20	39	menos de 10	-
25	48.75	menos de 10	-
40	78	menos de 10	-
60	117	menos de 10	-

Los resultados de la prueba No.3 parecen confirmar las observaciones de la prueba No.2: ambos microorganismos ven afectada su viabilidad cuando son expuestos a dosis de UV relativamente pequeñas, pero aquellos que logran sobrevivir esa primera etapa parecen desarrollar una resistencia al UV muy considerable (Figura 6.4).

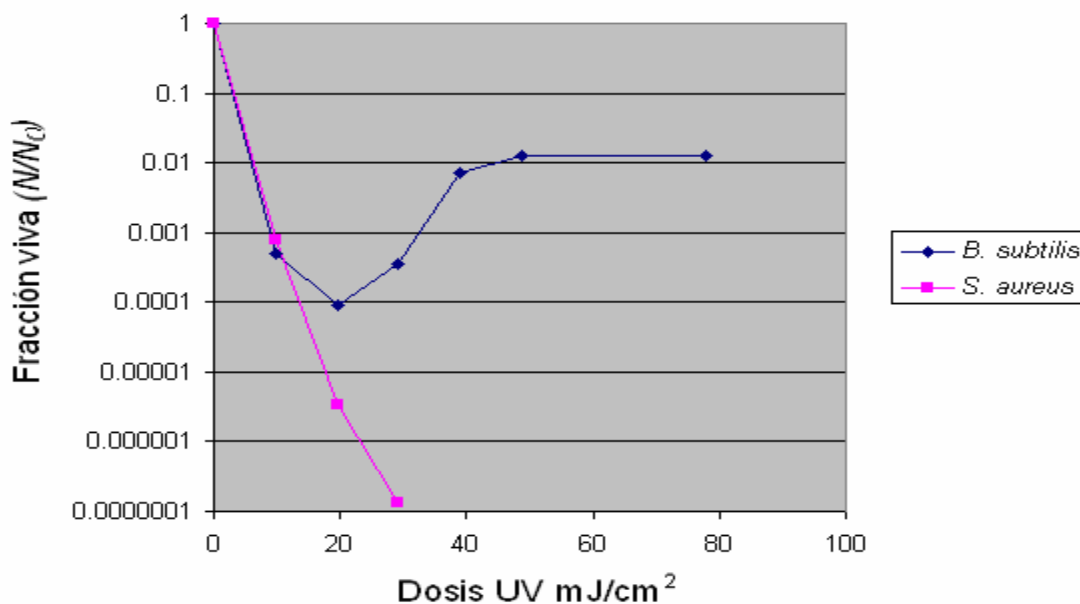


Figura 6.4 Resultados de la prueba No. 3 de inactivación de *Bacillus subtilis* y *S. aureus* con Radiación UV.

Algunos estudios han reportado la capacidad que tienen algunas bacterias para auto-repararse y revertir las alteraciones que la radiación ultravioleta induce en sus ácidos nucleicos. A este fenómeno de auto-reparación se le ha denominado “reactivación” y al parecer puede producirse con mayor auge en presencia de luz visible. Cuando esto sucede se le denomina “fotoreactivación”.

Existe la posibilidad de que los microorganismos de estudio puedan fotoreactivarse y que ello influya en los resultados obtenidos. No obstante, aunque la posibilidad de auto-reparación sea interesante se considera, que su estudio detallado es materia para otro proyecto de tesis o de investigación y que por lo tanto no es necesario caracterizarla en este proyecto de tesis.

Además de la posibilidad de autoreparación de los microorganismos existen otras posibles explicaciones para los resultados de las pruebas No.2 y No.3. Debido a las concentraciones tan elevadas de microorganismos que se usaron en los experimentos de desinfección es probable es probable que los mismos microorganismos contribuyeran a protegerse y a bloquear el paso de la radiación UV hacia láminas o “profundidades” de agua mayores. Aunque un agitado adecuado permitiría descartar tal posibilidad, varios estudios de desinfección con radiación UV o radiación solar han demostrado que la concentración de microorganismos si influye en la eficiencia germicida de la radiación.

Finalmente en la figura 6.5 se superponen los resultados de las pruebas No.2 y No.3 para ambos microorganismos. Se observa que el encendido/apagado de la lámpara no influye - o influye muy poco – en los resultados.

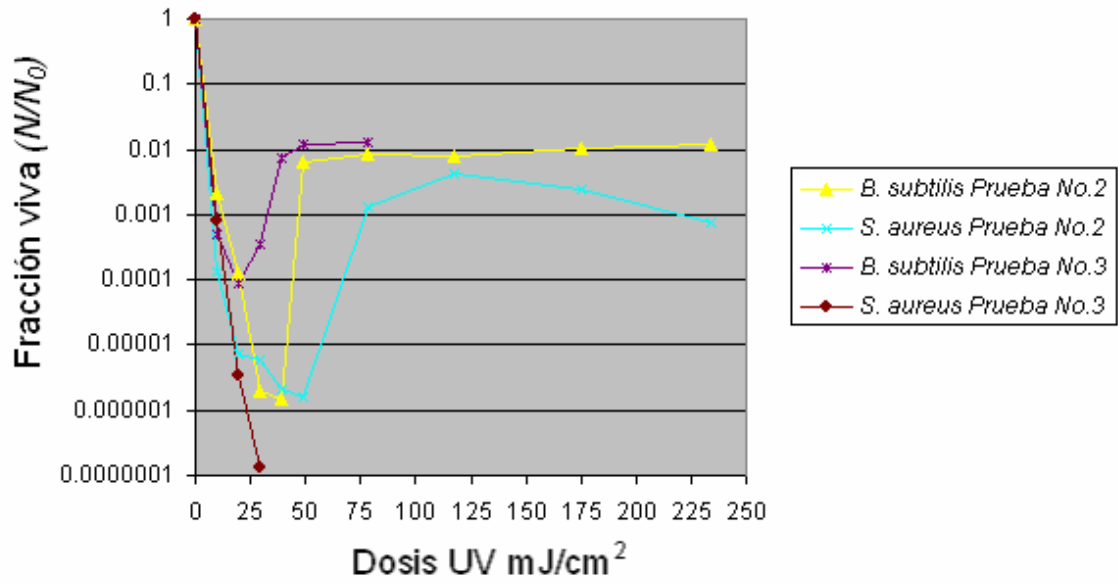


Figura 6.5 Comparación de resultados obtenidos en las pruebas No. 2 y No. 3 de *B. Subtilis* y *S. aureus*.