

Evaluación de la degradación de *E. coli* empleando un fotorreactor de discos rotatorios

Evaluating *E. coli* degradation using a rotatory disk photoreactor

Gina María Hincapié Mejía¹, Juan Miguel Marín S.², Luis Alberto Rios³ y Gloria Restrepo⁴

RESUMEN

Se realizó un estudio de la degradación de la bacteria *E. coli* empleando un fotorreactor de discos rotatorios fabricado en acero inoxidable para conocer el comportamiento de este sistema fotorreaccionante bajo diferentes condiciones de operación. El fotorreactor está dotado de 6 lámparas de luz negra (BLB) utilizadas como fuente de luz UV y provisto de 7 discos desmontables de vidrio común esmerilado impregnados con el fotocatalizador TiO_2 , los cuales se encuentran acoplados a un sistema de rotación. La impregnación del TiO_2 sobre los discos se realizó empleando el método sol-gel variando las relaciones molares de los precursores del gel, y se les realizaron pruebas de resistencia a la abrasión, adherencia a los discos y uniformidad en la superficie, para seleccionar la película que presentara las mejores características. Los estudios de fotodegradación de la bacteria se llevaron a cabo tomando como parámetros variables: la velocidad de rotación de los discos, la intensidad de radiación y el número de discos el cual está directamente relacionado con la concentración del fotocatalizador en el sistema. Se alcanzaron degradaciones de hasta 64.3% en 4 horas empleando 7 discos, intensidad baja y velocidad de rotación baja.

Palabras clave: fotodegradación, *E. coli*, sol-gel, TiO_2 , fotorreactor

ABSTRACT

Degradation of the bacterium *E. coli* was studied using a rotatory disk photoreactor manufactured in stainless steel to ascertain this photoreaction system's behaviour in different operating conditions. The photoreactor was equipped with 6 black light bulbs (BLB) used as a source of UV light and fitted with 7 removable disks made of common frosted glass impregnated with TiO_2 photocatalyzer which were coupled to a rotation system. TiO_2 was impregnated on the disks using the sol-gel method varying molar precursor gel ratios. Abrasion resistance, disk adhesion and surface uniformity tests were carried out for selecting the film presenting the best characteristics. Bacterial photodegradation studies were carried out using the following variable parameters: the disks' rotation speed, radiation intensity and the number of discs which were directly related to the concentration of photocatalyzer in the system. Up to 64.3% degradation was achieved in 4 hours using 7 disks, low intensity and low rotation speed.

Keywords: photodegradation, *E. coli*, sol-gel, TiO_2 , photoreactor

Recibido: julio 4 de 2007

Aceptado: octubre 31 de 2007

Introducción

A nivel mundial, el agua aparece como un recurso prácticamente ilimitado, sin embargo el 3% de la masa mundial de agua es dulce y sólo la mitad de ella es apta para beber y para los demás usos domésticos. Ésta debe ser cristalina, inodora, fresca y agradable, y además no poseer materia orgánica, gérmenes patógenos ni sustancias químicas (Red Interamericana de Recursos Hídricos, 2007).

Debido al aumento de las necesidades provenientes de la explosión demográfica y del desarrollo económico, es evidente un decrecimiento en la calidad de éste recurso; por tanto el hombre se ha encontrado con la necesidad de generar procesos de descontaminación y desinfección que hagan posible cumplir con los niveles de calidad requeridos.

¹ Ingeniera química. M.Sc., en Ingeniería, Universidad de Antioquia, Colombia. ginah@udea.edu.co

² Ingeniero químico. M.Sc, Ingeniería Ambiental. Dr., Ciencias Químicas. Profesor asistente, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Colombia. jmmarin@udea.edu.co

³ Ingeniero químico. M.Sc., Ciencias químicas. Dr., Ciencias Naturales. Profesor asociado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Colombia. larios@udea.edu.co

⁴ Ingeniera química. M.Sc., Ingeniería Química. Dr., Ciencias Químicas. Profesora asociada, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Colombia. gloma@udea.edu.co

Desde hace un siglo se viene utilizando la determinación de *Escherichia Coli* como el mejor indicador de contaminación de aguas con materia fecal, siendo 0 UFC/100mL de agua el valor guía dado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). (Cepis,2007).

La *E. Coli* que habita normalmente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, es una bacteria Gram negativa típica de la familia Enterobacteriaceae, de respiración anaerobia facultativa en el interior del intestino y aerobia en el exterior (Huang, 2000). Se puede eliminar por un proceso de oxidación química y este proceso puede realizarse por medio de cualquier oxidante químico: cloro, productos clorados, ozono, etc., sin embargo el gran problema de la utilización de cloro para la desinfección de aguas residuales es la formación de compuestos organoclorados que pueden ser cancerígenos o mutagénicos como los triclorometanos generados como subproductos de reacciones en presencia de materia orgánica (Sanabria, 2002), y los procesos llevados a cabo con ozono, aunque no generan subproductos, suelen tener costos muy elevados.

La fotocatalisis heterogénea (FH) con TiO_2 representa una tecnología alternativa prometedora para la degradación de diversas sustancias, bacterias, endotoxinas (Coleman *et al.*, 2005; Rincón y Pulgarin, 2006) y para la inactivación de microorganismos presentes en el agua, como es el caso de la bacteria *E. Coli*, en los cuales produce cambios morfológicos y fisiológicos en su ADN impidiendo su normal reproducción (Huang, 2000; Ogino *et al.*, 2006; Red CYTEC, 2004; Cirelli y Mortier, 2005; Torres, *et al.*, 2007). La FH se basa en la utilización de un material semiconductor tal como el TiO_2 , en suspensión o soportado, el cual es irradiado con luz UV para la generación de radicales hidroxilo con alto poder oxidante, que desencadenan una serie de reacciones capaces de destruir compuestos orgánicos y organismos resistentes al ambiente.

La implementación de la FH para el tratamiento de aguas, requiere el desarrollo de fotorreactores apropiados que hagan viable y económica la técnica y aplicación de este tipo de tecnologías. En este sentido se diseñó y construyó un fotorreactor tipo discos rotatorios, el cual puede ser considerado como un sistema fotorreaccionante novedoso y particularmente conveniente para aplicaciones a gran escala, y constituye un buen ejemplo de un sistema que emplea el fotocatalizador inmovilizado.

Se presenta aquí el estudio de la degradación de la bacteria *E. Coli* empleando un fotorreactor de discos rotatorios para determinar su mejor comportamiento al variar parámetros como velocidad de rotación de los discos, la intensidad de radiación y el número de discos.

Experimental

Materiales y equipos

Balanza analítica (Sartorius Basic), Agitador con control de temperatura y rpm (Ikamag RCT), Autoclave (All American

modelo 25X-1), Incubadora (Kyoven Dies), Agar EMB (Sigma Aldrich), Agua destilada, Cepa de *E. Coli*, Espectrofotómetro (Helios α), cuenta colonias (Fisher modelo 133-8002), filtros (Advantec MFS, inc), equipo de filtración al vacío, almohadillas absorbentes, tetra etil orto silicato (TEOS, Merck), isopropanol (Merck), ácido sulfúrico 3N (H_2SO_4 , Merk), ácido Clorhídrico 3N (HCl Merck), dióxido de titanio (TiO_2 Hombikat UV 100).

Microorganismo

La cepa de *Escherichia Coli* utilizada en la investigación fue donada por el departamento de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Para el mantenimiento y viabilidad de la Cepa se hicieron replicas periódicas, en el medio de cultivo Eosina y azul de metileno (Agar EMB) y fueron conservadas en nevera a 4°C.

Para estudiar la cinética de crecimiento de la bacteria en el caldo de cultivo, se realizó un estudio experimental para determinar el tiempo en que la biomasa se encontraba en su fase logarítmica o exponencial utilizando como medio de cuantificación o conteo la técnica de absorbancia y conteo de unidades formadoras de colonia UFC en placa sobre agar EMB.

Fotorreactor de Discos Rotatorios

El sistema fotorreaccionante tipo discos rotatorios se construyó como un tanque semicilíndrico en acero inoxidable con capacidad de 10 litros, provisto de una tapa del mismo material que cierra herméticamente para evitar contaminaciones y garantizar que la bacteria *E. Coli* fuera la única especie presente en el sistema, en la tapa además se ubicaron seis lámparas de luz negra F6T5BLB cada una de 6 Watts de potencia. Se dispuso en el fondo del tanque un sistema de aireación conectado a un difusor para aumentar el rendimiento de la reacción y ayudar en la agitación y homogeneización del agua contaminada. Se dotó el sistema con siete discos fabricados en vidrio común esmerilado de 16cm de diámetro, los cuales fueron impregnados con TiO_2 por medio del método sol-gel. Los discos se sujetaron a un eje desmontable elaborado en acero inoxidable, que a su vez se acopló a un motor de corriente alterna, para suministrar una variación en la velocidad de rotación. Las Figuras 1 y 2 muestran el diseño del fotorreactor propuesto y el fotorreactor construido.

Impregnación de los discos

El método sol-gel para inmovilizar el TiO_2 sobre el vidrio, consistió en la mezcla de los precursores del gel, tetra etil ortosilicato (TEOS) y agua, con isopropanol en medio ácido con posterior reposo por 24 horas, luego de las cuales se dispersó el TiO_2 en el sol a una velocidad de 1000 rpm. Los discos, previamente lavados en solución de H_2SO_4 , fueron impregnados con esta solución por la técnica de Flow Coating y llevados a un tratamiento térmico a 100°C durante 4 horas y sumergidos en HCl durante 24 horas para obtener una buena fijación de la película.

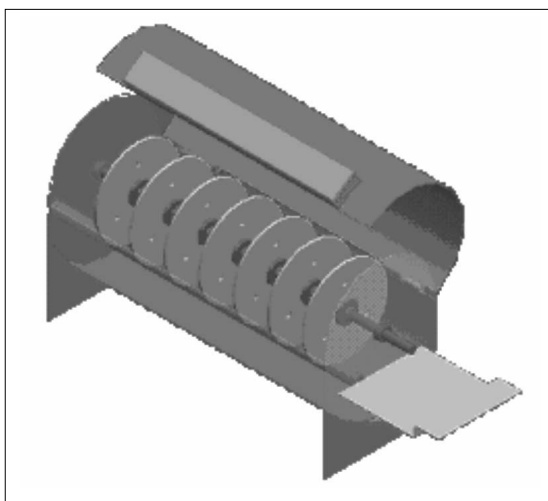


Figura 1. Prototipo del Fotorreactor de Discos Rotatorios

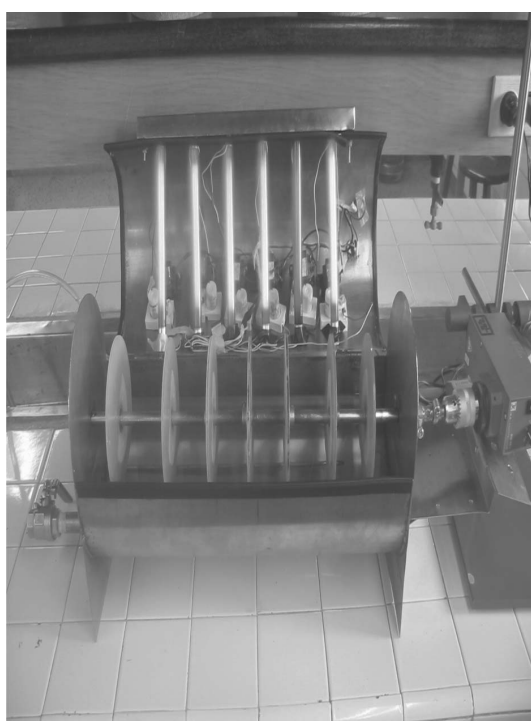


Figura 2. Fotorreactor de Discos Rotatorios Construido

Caracterización de los discos

Se realizaron estudios para determinar la calidad y el espesor de las películas obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) considerando factores como uniformidad en el tamaño de grano de TiO_2 y buena dispersión; se efectuaron además pruebas de abrasión y estabilidad para evaluar la adherencia de las películas al vidrio.

Evaluación de la fotodegradación

Se empleó un volumen de 10L de agua contaminada con *E. Coli* con una concentración de 220 UFC/100mL. El sistema fue irradiado durante cuatro horas, tomando muestras cada 30 minutos las cuales fueron sometidas a un conteo de UFC/100ml por medio de la técnica filtro de membrana (MF) y un equipo cuenta-colonias.

Los ensayos fueron realizados por duplicado, variando parámetros como velocidad de rotación de los discos, intensidad de la luz y número de discos, tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental

Experimento	No. Discos	Intensidad de Radiación	Velocidad de Rotación (rpm)
1	5	Alta	Baja
2	5	Alta	Alta
3	5	Baja	Baja
4	5	Baja	Alta
5	7	Alta	Baja
6	7	Alta	Alta
7	5	Baja	Baja
8	5	Baja	Alta
Blanco	---	Alta	---
Blanco	7	---	Alta

Resultados y discusión

Curvas de crecimiento de la *E. Coli*

La cinética del crecimiento de la *E. Coli* se llevo a cabo en caldo nutritivo, tomando muestras a intervalos de 1 hora. Las Figuras 3 y 4 muestran que en las 2 primeras horas la bacteria se encuentra en la fase de adaptación, de 2 a 4 horas se presenta la fase de aceleración y la fase exponencial transcurre de 4 a 9 horas. La inoculación del sistema a degradar se hace entonces cuando la bacteria está en esta fase exponencial, para garantizar que ella está en pleno crecimiento, y que si hay degradación y muerte es a causa de la acción fotocatalítica y no a que la bacteria estaba en su fase estacionaria o de muerte.

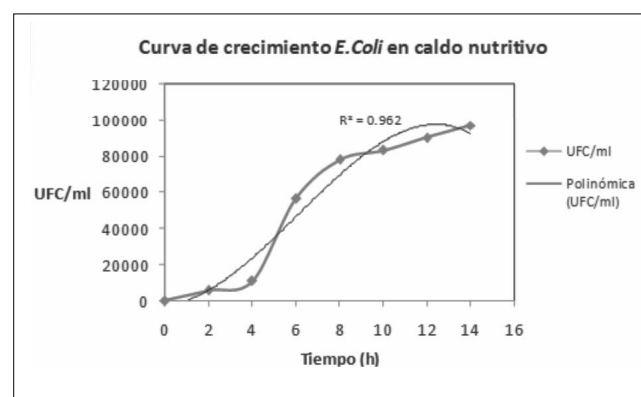


Figura 3. Curva de crecimiento de la *E. Coli* (UFC/mL vs. Tiempo)

Caracterización de los discos

Las pruebas físicas consistieron en frotar las impregnaciones con materiales no abrasivos como lana y algodón; resistencia al paso de fluidos sobre su superficie para garantizar que no se erosionaran durante los experimentos y resistencia a agentes químicos como ácidos inorgánicos y solventes orgánicos para estudiar su resistencia química.

La caracterización por SEM muestra una buena dispersión y uniformidad de la película delgada de dióxido de titanio sobre toda la superficie del disco, Figura 5.

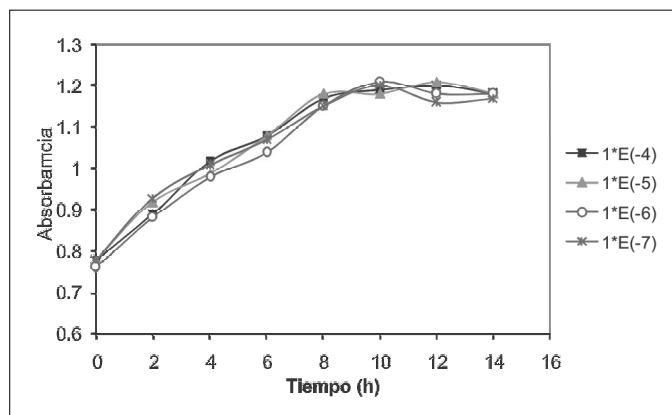
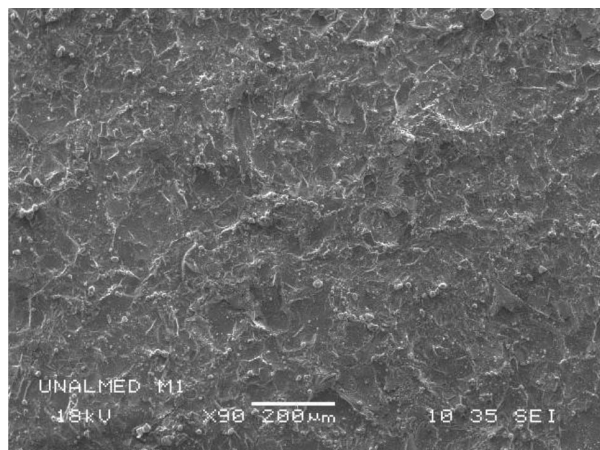


Figura 4. Curva de crecimiento de la E. Coli (absorbancia vs. Tiempo)



Figuras 5. Imagen SEM de la superficie del disco

Para determinar el espesor de la película de TiO₂ se hizo un corte fino a cada muestra con una cuchilla de diamante y se inmovilizó la pieza obtenida en resina acrílica para su análisis. La Figura 6 muestra el espesor de la película impregnada de 13.36µm en promedio, comprobando que se trata de una superficie regular, uniforme y plana.

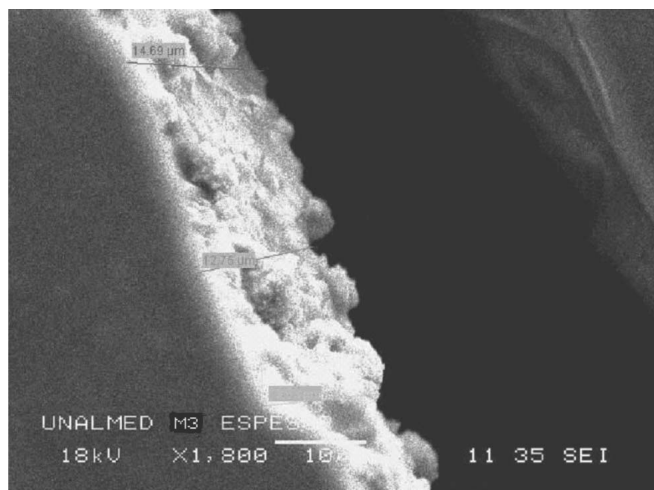


Figura 6. Imagen SEM de un corte de película.

Evaluación de la fotodegradación de E.Coli

Las Figuras 7 y 8 muestran los blancos realizados en ausencia de luz y de TiO₂ respectivamente, donde se aprecia una etapa de adaptación de la bacteria al nuevo medio y la evidencia de que el TiO₂ no ejerce poder bactericida sin la presencia de luz.

En la Figura 8 puede observarse que la luz ultravioleta con una longitud de onda aproximada de 385 nm, propia de la luz negra, no actúa sobre la bacteria y ésta continúa en su etapa de crecimiento.

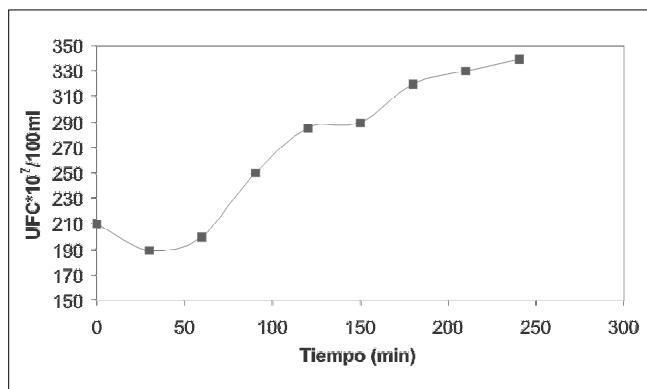


Figura 7. E. Coli en ausencia de luz y en ausencia de TiO₂

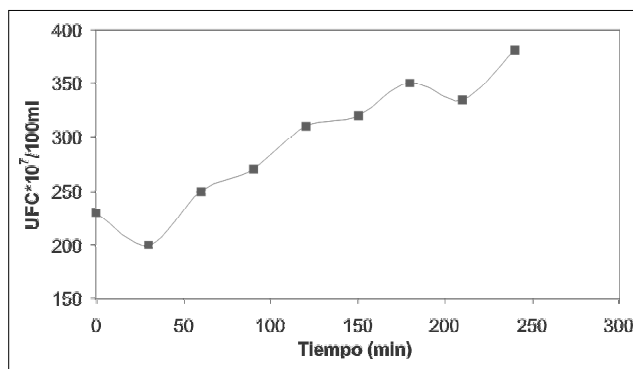


Figura 8. E. Coli en ausencia de TiO₂

En los experimentos realizados variando la intensidad de la luz, velocidad de rotación de los discos y el número de discos, se observó que el número de UFC disminuyó en los primeros 30 minutos debido a la fase de adaptación al medio, pero debido a su alta capacidad de adaptación estas pueden reiniciar su duplicación después de un corto periodo de tiempo (Torres, *et al.*, 2007). Luego se presenta una etapa de muerte bacteriana debido al efecto de la fotocatalisis sobre las bacterias, ya que se presenta un proceso de oxidación de la pared celular que afecta progresivamente su permeabilidad, permitiendo que los agentes oxidantes accedan al interior de la célula alterando el ADN y produciendo finalmente su muerte (Rincón y Pulgarin, 2004; Sunada *et al.*, 2003).

La Figura 9 muestra que la mayor degradación alcanzada fue del 64.3% al emplear 7 discos, intensidad baja y velocidad de rotación baja. Un mayor número de discos se traduce en mayor cantidad de TiO₂ en el sistema. La turbulencia generada por los discos es adecuada para lograr un buen tiempo de

contacto entre la bacteria y el fotocatalizador. Con respecto a la luz se observa cómo esta variable tiene su mayor efecto en la degradación de la bacteria cuando es utilizada con una menor intensidad, ya que presentó el mayor porcentaje de degradación en los experimentos realizados independientemente de los cambios realizados en el número de discos; es muy factible que la misma luz que ocasiona la destrucción de la bacteria, también sea utilizada por ésta para lograr una reactivación vía fotoquímica (www.epa.gov, 2007).

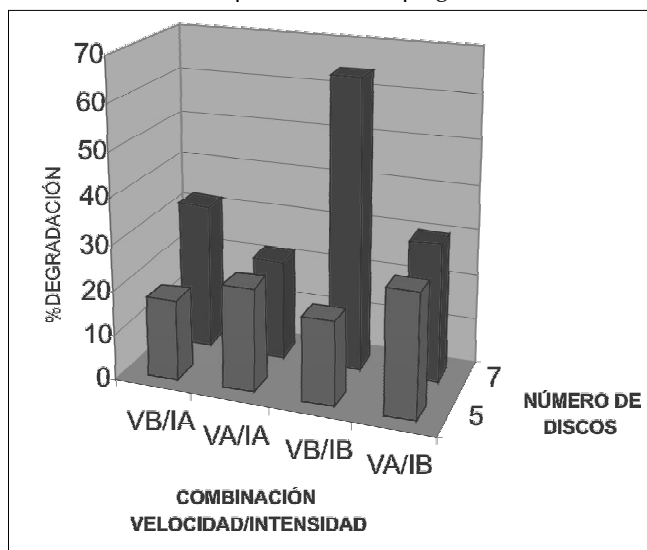


Figura 9. Degradación de E-Coli

Conclusiones

La presencia de TiO_2 en el reactor es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de fotocatalisis; el efecto aislado de la luz no es suficiente para producir la degradación de la bacteria.

El método de impregnación utilizado en los discos fue adecuado, ya que las películas obtenidas presentaron muy buenas características de uniformidad, buena adherencia a la superficie del disco y alta resistencia a la abrasión producida por el agua; las películas mantuvieron sus características durante el tiempo de la experimentación.

La configuración del sistema fotorreaccionante de discos rotatorios fue adecuada para que se diera una buena transferencia de masa, un contacto eficiente entre el medio a tratar y el fotocatalizador, y una exposición apropiada del fotocatalizador a la luz.

Se evidenció que no necesariamente una intensidad alta de luz coadyuva al proceso de foto-muerte. Una serie de mecanismos de defensa son activados por las células bacterianas al ser atacadas por agentes externos, tales como la luz, y es por ello que puede lograrse una mayor degradación empleando una menor intensidad de luz.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la fotocatalisis heterogénea es una tecnología viable, que no obstante encontrarse aún en etapa de investigación y presentar limitaciones en su aplicación, puede ser consi-

derada como una alternativa para el tratamiento de aguas. Investigaciones futuras deberán conducir a comprender los mecanismos de foto-reactivación de la bacteria *E-Coli* y el rol que juegan en su fotodegradación.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia por la financiación y apoyo para el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

Ogino, C., Dadjourb, M. F., Takakic, K., Shimizu, N., Enhancement of sonocatalytic cell lysis of *Escherichia coli* in the presence of TiO_2 , *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 32, No.2, Nov., 2006, pp. 100-105.

Cirelli, A. F., Mortier, C. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua: Evaluación de la condición del agua para consumo humano en Latinoamérica. *Solar Safe Water*, Escuela de Posgrado UNSAM, San Martín, 2005, pp. 11-26.

Coleman, H.M., Marquisb, C.P., Scotta, J.A., China, S.-S., Amala, R., Bactericidal effects of titanium dioxide-based photocatalysts., *Chemical Engineering Journal*, Vol. 113, No.1. Oct., 2005, pp. 55-63.

Kayano Sunada, Toshiya Watanabe and Kazuhito Hashimoto, Studies on photokilling of bacteria on TiO_2 thin film., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 156, No.1-3, Mar., 2003, pp. 227-233.

Red CYTED VIII-G., Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea, M.A. Blesa y B. Sánchez (Editores), Texto colectivo elaborado por la CIEMAT, Madrid, 2004, pp. 51-76.

Red Interamericana de Recursos Hídricos-Nodo ConoSur., http://conosur.rirh.net/noticia_vista.php?id=617, (Consulta: Marzo de 2007)

Rincón, A., Pulgarin, C., Comparative evaluation of Fe^{3+} and TiO_2 photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water., *Applied Catalysis B: Environmental*, Vol. 63, No.3-4, Mar., 2006, pp. 222-231.

Rincón, A., Pulgarin, C., Bactericidal action of illuminated TiO_2 on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time., *Applied Catalysis B: Environmental*, Vol. 49, No.2, May., 2004, pp. 99-112.

Torresa, A. G., Milflores-Floresc, L., García-Gallegosa, J. G., Patela, S. D., Bestd, A., La Ragioned, R. M., Martínez-Lagunac, Y., Woodward, M. J., Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* $O_{157}:H_{7}$., *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 297, No.3, Jun., 2007, pp. 177-185.

Wist, J., Sanabria, J., Dierolf, C., Torres, W., Pulgarin C., Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 147, No.3, Abr., 2002, pp. 241-246.

Huang, Z., Maness, P.-C., Blake, S. M., Wolfrum, E. J., Smolinski, S. L., Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 130, No.2-3, Ene., 2000, pp.163-170.

www.cepis.ops-oms.org/bvsacg/e/normas.html, [Consulta: Abril de 2007]

www.epa.gov/owm/mtb/cs-99-064.pdf, [Consulta Mayo 2007]