
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del
Litoral, para la obtención del Grado Académico de:

DOCTOR EN TECNOLOGÍA QUÍMICA

Título de la Tesis:

**INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE
MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL AIRE,
EMPLEANDO DIÓXIDO DE TITANIO SOPORTADO Y
RADIACIÓN UV**

Institución donde se realizó:

**Instituto el Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, Santa Fe), y
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL, Santa Fe).**

Nombre y apellido del autor **Lic. Silvia Mercedes Zacarías**

Nombre y apellido del director **Dr. Orlando Mario Alfano**

Nombre y apellido del co-director **Dra. María Lucila Satuf**

Nombre y apellido de los miembros del Jurado **Dra. Teresita Francisca Garetto
Dr. Roberto Jorge Candal
Dr. Fernando Sebastián García Einschlag**

Año de presentación
2013

A Juan Manuel y Siro

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral se ha logrado gracias al esfuerzo y sostén que me han brindado numerosas personas a lo largo de estos cinco años. Me gustaría por tanto, expresar de algún modo mi gratitud no sólo a aquellos con los que he trabajado directamente, sino también a los que me brindaron su ayuda en diferentes momentos del desarrollo de la Tesis.

En primer lugar quiero dar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, el Dr. Orlando Mario Alfano y la Dra. María Lucila Satuf, por transmitirme sus conocimientos y experiencia, por guiarme de forma inteligente a través de este período de formación, y por su enorme calidez humana.

En segundo lugar, agradecer al Dr. Gustavo Imoberdorf, por sus valiosas contribuciones. Y a la Bioqca. María Celia Vaccari y al Sr. Antonio Negro, por su permanente colaboración en la realización del trabajo de laboratorio, y sus valiosos consejos.

También quiero dar las gracias a todos los integrantes del grupo de Ingeniería de los Fotorreactores, que de alguna manera colaboraron con el trabajo de Tesis. Y a todos aquellos que, aunque no forman parte del grupo, han contribuido con sus conocimientos, colaboración y respaldo en esta investigación, en diversos períodos de la misma.

A la jefa de cátedra del laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Dra. María Cristina Lurá, por poner a mi

disposición las instalaciones necesarias para la satisfactoria ejecución de los ensayos microbiológicos que se presentan en esta Tesis Doctoral.

A mis compañeras y amigas del doctorado, por colaborar incondicionalmente conmigo y transmitirme sus conocimientos en forma desinteresada.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por su colaboración en la realización de tareas de laboratorio.

A los miembros del Jurado, por su interés y disposición para participar en la evaluación de la presente Tesis.

También, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por el sustento financiero recibido.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, por acompañarme siempre y valorar cada uno de mis logros. En especial a Juan Manuel, por su paciencia, su compañía y continua preocupación. Por ser un sostén. Por el amor que me brinda.

DIFUSIÓN

Los resultados de la presente Tesis Doctoral fueron difundidos a través de los siguientes trabajos:

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS INTERNACIONALES

- Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Irazoqui, H. A.; Imoberdorf, G. E.; Alfano, O. M. Effect of the radiation flux on the photocatalytic inactivation of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Photochem. Photobiol., A* **2010**, 214, 171.
- Zacarías, S. M.; Satuf, M. L.; Vaccari, M. C.; Alfano, O. M. Efficiency evaluation of different TiO₂ coatings on the photocatalytic inactivation of airborne bacterial spores. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, 51, 13599.

CAPÍTULO DE LIBRO

- Zacarías, S. M.; Satuf, M. L.; Vaccari, M. C.; Alfano, O. M. Photocatalytic inactivation of airborne microorganisms. Performance of different TiO₂ coatings. En: *Advanced Oxidation Processes, Serie: Sustainable Energy Developments*, Series editor: J. Bundschuh, publicado por CRC Press/Balkema, aceptado para publicación (2012).
-

CONGRESOS INTERNACIONALES

- Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Irazoqui, H. A.; Imoberdorf, G. E.; Alfano, O. M. Estudio cinético de la inactivación fotocatalítica de esporos de *Bacillus subtilis*. *V Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental, Sociedad Iberoamericana de Física y Química Ambiental (SiFyQA)*, **2008**, Mar del Plata, Buenos Aires. Premio a la mejor ponencia oral.
 - Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Irazoqui, H. A.; Imoberdorf, G. E.; Alfano, O. M. Inactivation of spores of *Bacillus subtilis* on UV-irradiated TiO₂ thin films. *Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications (SPEA6)*, **2010**, Praga, República Checa.
 - Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Satuf, M. L.; Alfano, O. M. Evaluation of different TiO₂ coatings on the photocatalytic inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *VI Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados (EPOAVI)*, **2011**, Rio de Janeiro, Brasil.
 - Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Satuf, M. L.; Alfano, O. M. Estudio de Diferentes Catalizadores de Dióxido de Titanio para la Inactivación Fotocatalítica de Esporos de *Bacillus subtilis*. *Argentina y Ambiente 2012, I Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental*, **2012**, Mar del Plata, Buenos Aires.
 - Alfano, O. M.; Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Satuf, M. L. Inactivation of Airborne Bacterial Spores Using Different Titanium Dioxide Coatings. *7th European Meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications (SPEA7)*, **2012**, Oporto, Portugal. Presentación oral.
-

- Zacarías, S. M.; Satuf, M. L.; Vaccari, M. C.; Alfano, O. M. Aplicación de Fotocatalizadores de TiO₂ Dopados con Plata para la Inactivación de Esporos de *Bacillus subtilis*. *XXIII Congreso Iberoamericano de Catálisis, Federación Iberoamericana de Sociedades de Catálisis (FISOCAT) y Sociedad Argentina de Catálisis (SACat)*, **2012**, Santa Fe, Argentina.
- Satuf, M. L.; Vaccari, M. C.; Alfano, O. M.; Zacarías, S. M. Inactivación fotocatalítica de microorganismos presentes en el aire empleando TiO₂ dopado con Ag. *VII Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados (EPOAVII)*, **2013**, Recife, Brasil. Enviado para su evaluación.

CONGRESOS NACIONALES

- Zacarías, S. M.; Alfano, O. M.; Imoberdorf, G. E.; Irazoqui, H. A.; Vaccari, M. C. Efecto del flujo de radiación sobre la inactivación fotocatalítica de esporos de *Bacillus subtilis*. *XIII Jornadas Argentinas de Microbiología (AAM)*, **2008**, Rosario, Santa Fe.
 - Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Irazoqui, H. A.; Imoberdorf, G. E.; Alfano, O. M. Velocidad de inactivación fotocatalítica de esporos de *Bacillus subtilis*. Dependencia con el flujo de radiación incidente. *III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC)*, **2010**, Santa Fe.
-

JURADOS

Los jurados titulares designados para evaluar esta tesis Doctoral son:

- **Dra. Teresita Francisca Garetto**

Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica (INCAPE), UNL.

- **Dr. Roberto Jorge Candal**

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física (DQIAyQF),
Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía
(INQUIMAE), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas (FCEyN), UBA.

- **Dr. Fernando Sebastián García Einschlag**

Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Dpto.
de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se centra en la aplicación de la fotocatalisis heterogénea para la eliminación de microorganismos presentes en el aire. Específicamente, se estudió el empleo de radiación UV y dióxido de titanio soportado sobre placas de vidrio para inactivar esporos de *Bacillus subtilis*, siendo estas estructuras biológicas las más resistentes para su eliminación.

En primer lugar, se diseñó y construyó un dispositivo experimental para irradiar esporos depositados sobre superficies. El mismo proporciona una zona de iluminación uniforme para la inactivación fotocatalítica, posee un compartimento que aísla las muestras de la potencial contaminación ambiental, y mantiene constantes la temperatura y la humedad relativa.

Para modelar la cinética de inactivación fotocatalítica de *B. subtilis*, se propuso un esquema simplificado, del cual se derivó una expresión cinética. Dado que la inactivación depende de la radiación UV absorbida por las películas de TiO_2 , el campo de radiación se modeló mediante un software CFD (fluidodinámica computacional, por sus siglas en inglés). Los parámetros cinéticos del modelo se obtuvieron a partir de datos experimentales.

Además, se caracterizaron y compararon diferentes recubrimientos de TiO_2 , utilizando catalizadores sintetizados en el laboratorio, y catalizadores comerciales. Para comparar objetivamente el desempeño de los recubrimientos, se calcularon dos tipos de eficiencia: la eficiencia fotónica y la eficiencia cuántica de inactivación. Dichos parámetros tienen en cuenta la radiación incidente y la radiación absorbida

sobre la superficie del catalizador, respectivamente. El cálculo de los parámetros de eficiencia representa una valiosa herramienta para comparar diferentes sistemas catalíticos. Por otro lado, la eficiencia cuántica permite dilucidar algunos aspectos del mecanismo fotocatalítico, porque muestra cuán eficientemente la radiación absorbida es empleada para inactivar microorganismos. También, puede ayudar a diseñar mejores recubrimientos, ya que los resultados pueden evidenciar problemas con el contacto con las bacterias, o la absorción de la radiación, por ejemplo.

Con el objeto de aumentar la eficiencia de la inactivación de esporos, se estudió la utilización de fotocatalizadores dopados con plata, la cual posee una reconocida actividad antibacteriana. Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos previamente, donde el recubrimiento con mayor eficiencia resultó ser el TiO_2 Degussa P-25 con 2 capas. Por tanto, a este recubrimiento se le depositaron diferentes concentraciones de Ag y se ensayó su actividad para inactivar esporos.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1:	1
INTRODUCCIÓN	
1.1 MICROORGANISMOS Y MEDIO AMBIENTE	3
1.1.1 MICROORGANISMOS EN EL AIRE Y FORMACIÓN DE BIOAEROSOLES	3
1.1.2 MICROORGANISMOS PRESENTES, TIEMPO DE PERMANENCIA EN EL AIRE Y SUPERVIVENCIA	4
1.1.3 BACTERIAS FORMADORAS DE ESPOROS	7
1.1.4 FORMACIÓN Y ESTRUCTURA DEL ENDOSPORO BACTERIANO	9
1.1.5 RESISTENCIA A DIFERENTES FACTORES ADVERSOS	15
1.1.6 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	17
1.1.7 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR EL AIRE	20
1.2 DESCONTAMINACIÓN DE AIRE	21
1.2.1 FILTROS DE AIRE	22
1.2.2 FILTROS DE AIRE CON CARBÓN ACTIVADO	22
1.2.3 IONIZADORES DE AIRE	23
1.2.4 ESTERILIZADORES UV	23
1.2.5 GENERADORES DE OZONO	24
1.2.6 TECNOLOGÍAS ACOPLADAS	24
1.3 FOTOCATÁLISIS	26
1.3.1 CONSIDERACIONES GENERALES	26
1.3.2 FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA	28
1.3.3 PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA FOTOCÁTALISIS	31
1.3.4 MATERIALES SOPORTADOS	33
1.4 FOTOCATÁLISIS Y MICROORGANISMOS	35
1.4.1 INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS POR FOTOCATÁLISIS	35
1.4.2 MODELADO DE LA INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE MICROORGANISMOS	37

1.4.3	ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA PLATA	38
1.4.4	INTERPRETACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA RESISTENCIA FOTOQUÍMICA Y LA VULNERABILIDAD FOTOCATALÍTICA DE LOS ESPOROS	41
1.4.5	PRINCIPAL AGENTE OXIDANTE	44
1.5	OBJETIVOS DE LA TESIS	45
CAPÍTULO 2:		
	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	47
2.1	DISPOSITIVO EXPERIMENTAL	49
2.2	ACONDICIONAMIENTO DE LAS PLACAS FOTOCATALÍTICAS	54
2.3	OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS DE TiO ₂	54
2.4	ESPOROS DE <i>Bacillus subtilis</i>	58
2.4.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE	58
2.4.2	COSECHA DE ESPOROS	60
2.4.3	IRRADIACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESPOROS	63
2.4.4	RECuento DE LOS ESPOROS VIABLES	64
CAPÍTULO 3:		
	ESTUDIO CINÉTICO	66
3.1.	SÍNTESIS DEL CATALIZADOR DE TiO ₂	68
3.2.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	70
3.3.	ESQUEMA SIMPLIFICADO DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA	73
3.4.	DERIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN CINÉTICA PARA LA INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE ESPOROS	76
3.5.	MODELO DEL CAMPO DE RADIACIÓN	79
3.6.	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS	85

CAPÍTULO 4:		
EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES RECUBRIMIENTOS DE TiO₂		90
4.1. MODIFICACIÓN DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL		92
4.2. PREPARACIÓN DE LOS CATALIZADORES		93
4.3. OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS DE TiO₂		94
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLACAS FOTOCATALÍTICAS		95
4.4.1. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE CATALIZADOR INMOVILIZADO SOBRE LAS PLACAS DE VIDRIO		95
4.4.2. MEDICIONES DE TRANSMITANCIA Y REFLECTANCIA		96
4.4.3. CÁLCULO DE LA RADIACIÓN ABSORBIDA		98
4.5. IRRADIACIÓN DE LAS MUESTRAS Y MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS ESPOROS		101
4.6. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA FOTOCATALÍTICA		101
4.7. RESULTADOS		103
4.7.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLACAS FOTOCATALÍTICAS		103
4.7.1.1 Determinación espectrofotométrica de la cantidad de catalizador sobre las placas		103
4.7.1.2 Caracterización óptica		103
4.7.2. RESULTADOS DE INACTIVACIÓN DE ESPOROS		108
4.7.3. EVALUACIÓN DE EFICIENCIAS FOTOCATALÍTICAS		111
4.8. DISCUSIÓN		112
CAPÍTULO 5:		
EFICIENCIAS DE FOTOCATALIZADORES DE TiO₂ DOPADOS CON PLATA		117
5.1. EXPERIMENTAL		119
5.1.1. PREPARACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS DOPADOS CON Ag		119
5.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS CON Ag		120

5.1.3. IRRADIACIÓN DE LAS MUESTRAS Y RECUENTO DE LOS ESPOROS VIABLES	121
5.2 RESULTADOS	121
5.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL RECUBRIMIENTO	121
5.2.2 RESULTADOS DE INACTIVACIÓN DE ESPOROS	125
5.2.3 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOCATALÍTICA	128
5.3 DISCUSIÓN	129
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	133
NOMENCLATURA	138
BIBLIOGRAFÍA	142

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Eventos que dan lugar a la formación del esporo (Prescott y col., 2002)	11
Figura 1.2. Sección del esporo de <i>B. subtilis</i> (Nicholson y col., 2000)	14
Figura 1.3. a) Purificador de Aire, b) Principio de funcionamiento	25
Figura 1.4. Esquema de la excitación del semiconductor por la absorción de fotones acopladas con reacciones de óxido-reducción	29
Figura 1.5. Posibles mecanismos para la actividad antibacteriana de la plata: (1) alteración de la estructura y funcionamiento de la membrana, (2) daños en el ADN y las enzimas respiratorias, (3) generación de ERO (adaptado de Marambio-Jones y Hoek, 2010)	40

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Diagrama del dispositivo experimental	49
Figura 2.2. Fotografía de la vista superior del dispositivo experimental	50
Figura 2.3. Emisión espectral de las lámparas (—) y transmitancia de los filtros neutros (- - -), de las placas de vidrio de borosilicato (.....), y de las placas de vidrio de borosilicato recubiertas con TiO ₂ (· · · - - - · · ·)	53
Figura 2.4. Estructura cristalina de anatasa (a), rutilo (b) y brookita (c)	55
Figura 2.5. Esquema del equipo construido para realizar los recubrimientos por “dip-coating”	56
Figura 2.6. Etapas asociadas a la técnica de “dip-coating”	57
Figura 2.7. Botella Roux	61
Figura 2.8. Recuento en placa por vertido (Madigan y col., 2006)	63
Figura 2.9. Esquema del procedimiento para el recuento de los esporos viables luego de la irradiación	65

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Procedimiento empleado para la preparación del TiO ₂	69
Figura 3.2. Representación esquemática del procedimiento experimental para el recuento de esporos viables.	70
Figura 3.3. Curvas de inactivación para diferentes tiempos de irradiación de esporos irradiados con 2,44 mW cm ⁻² de radiación incidente. (○,◇): Valores experimentales, (—, ----): líneas de tendencia.	71
Figura 3.4. Efectos físicos considerados en el modelo de radiación: (1) emisión de radiación UV de las lámparas, (2) atenuación parcial de la radiación en el vidrio de borosilicato, (3) absorción de radiación en la película de TiO ₂ , (4) radiación transmitida a través de la película de TiO ₂ .	79
Figura 3.5. Malla usada para describir el compartimento de irradiación y el sistema de emisión de radiación UV.	81
Figura 3.6. Flujo de energía radiante en una sección transversal del compartimento de irradiación presentado por una graduación de grises. El rectángulo punteado en el centro representa el tamaño del soporte para las muestras.	84
Figura 3.7. Diagrama esquemático del algoritmo genético empleado para obtener los parámetros del modelo cinético.	87
Figura 3.8. Curvas de inactivación de esporos para diferentes valores de flujo de radiación incidente: a) 2,44, b) 0,90, c) 0,63, d) 0,29 mW cm ⁻² , (◇) valores experimentales, (—) valores predichos por el modelo.	88
Figura 3.9. Comparación entre las predicciones del modelo y los valores experimentales de la concentración de esporos viables, obtenidos para diferentes tiempos de irradiación.	89

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. (a) Esquema general del espectrofotómetro Optronic OL serie 750. (b)-(e) Configuraciones de la esfera de integración: (b) y (c) , mediciones de transmitancia; (d) y (e) , mediciones de reflectancia	97
Figura 4.2. Método de seguimiento de rayos para múltiples placas paralelas transmisoras	100
Figura 4.3. Emisión espectral relativa de las lámparas (— · —), y transmitancia (—) y reflectancia difusa (- - -) del vidrio de borosilicato.	104

Figura 4.4. Valores experimentales de transmitancia y reflectancia difusa (T_{fg} , R_{fg}).	105
Figura 4.5. Imágenes “SEM” de las superficies de los recubrimientos de TiO_2 con dos capas: (a) Sol-Gel, (b) Degussa P-25, (c,d) Sol-Gel/Degussa P-25. La barra blanca representa (a-c) 1 μm y (d) 10 μm .	107
Figura 4.6. Curvas de inactivación de esporos para las tres técnicas de recubrimiento estudiadas. Valores experimentales: \diamond , Degussa P-25; \square , Sol-Gel/Degussa P-25; \circ , Sol-Gel. Ajuste (—, ---, \cdots).	109
Figura 4.7. Imágenes “SEM” de la inactivación fotocatalítica de esporos sobre dos capas del catalizador Degussa P-25. (a) Sin irradiar, (b) 4 h de irradiación, (c) 8 h de irradiación.	110

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Valores experimentales de transmitancia (a) y reflectancia (b) difusa (T_{fg} , R_{fg}).	122
Figura 5.2. Imagen “SEM” de la superficie del recubrimiento de TiO_2 con dos capas con 1,09% p/p de Ag. La barra blanca representa 1 μm .	124
Figura 5.3. Curvas de inactivación de esporos para las diferentes concentraciones de Ag depositadas. Valores experimentales: \diamond , \square , \circ . Ajuste (—, ---, - - -).	126
Figura 5.4. Comparación de la inactivación con y sin Ag. Valores experimentales: \diamond , \circ . Ajuste: —, ---.	127

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1. Temperatura y humedad dentro del compartimento de irradiación.	52
Tabla 2.2. Pruebas bioquímicas de identificación.	60

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Inactivación de esporos esparcidos sobre películas de TiO ₂ empleando diferentes niveles de radiación incidente	73
Tabla 3.2. Esquema de reacción	75
Tabla 3.3. Parámetros cinéticos	86

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Cantidad de TiO ₂ depositado en las placas de vidrio	103
Tabla 4.2. Valores calculados de T_f , R_f , y α_f para 350 nm	106
Tabla 4.3. Parámetros estimados de la ecuación 4.8	111
Tabla 4.4. Velocidad inicial de inactivación y energía absorbida por cada recubrimiento	111
Tabla 4.5. Eficiencias de inactivación fotocatalítica	112

CAPÍTULO 5

Tabla 5.1. Valores calculados de T_f , R_f , y α_f para 350 nm	123
Tabla 5.2. Parámetros estimados de la ecuación 4.8	127
Tabla 5.3. Velocidad inicial de inactivación y energía absorbida por cada recubrimiento	128
Tabla 5.4. Eficiencias de inactivación fotocatalítica	129

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta un marco general referente a los microorganismos presentes en el aire, la formación de bioaerosoles y sus características principales. Se consideran algunos aspectos relacionados con la presencia de bacterias esporuladas en el ambiente, y su resistencia a diferentes factores adversos.

También se consideran características importantes asociadas con la descontaminación del aire, y se detallan algunas de las tecnologías disponibles comercialmente en la actualidad para la eliminación de los microorganismos contaminantes.

Se presentan además algunas consideraciones generales acerca de la fotocatalisis heterogénea, y la utilización de esta tecnología para la inactivación de microorganismos presentes en el aire.

Finalmente se enuncian los objetivos de esta Tesis.

1.1 MICROORGANISMOS Y MEDIO AMBIENTE

1.1.1 MICROORGANISMOS EN EL AIRE Y FORMACIÓN DE BIOAEROSOLES

Los microorganismos que se encuentran dispersos en el aire poseen una considerable importancia biológica y económica. Numerosas enfermedades del hombre, los animales y plantas, tanto víricas como bacterianas o fúngicas, se transmiten por la atmósfera y a menudo se producen brotes epidémicos. Los microorganismos presentes en el aire también pueden contaminar los alimentos y materiales orgánicos (cuero, textiles, papel) produciendo su alteración.

La atmósfera no tiene una microbiota autóctona, pero es un medio para la dispersión rápida y global de muchos tipos de microorganismos. Estos microorganismos pueden ser transportados rápidamente, en forma de bioaerosoles, a través de grandes distancias con el movimiento del aire, el cual representa el mejor camino de dispersión. Algunos microorganismos han creado adaptaciones especializadas que favorecen su supervivencia y su dispersión en la atmósfera. El transporte se realiza sobre partículas de polvo, fragmentos de hojas secas, piel, fibras de la ropa, en gotas de agua o en gotas de saliva eliminadas al toser, estornudar o hablar.

A menudo, tanto los esporos como los microorganismos vegetativos entran en la atmósfera como bioaerosoles, que pueden formarse por muchas causas: lluvia, movimiento del agua en los ríos y mar, tratamiento de aguas residuales, aspersores de riego, aire acondicionado o secreciones respiratorias del hombre y de los animales. Esta última es muy importante en la dispersión de bacterias patógenas y virus

animales. Los microorganismos también pueden encontrarse en el aire sobre partículas de polvo o en el suelo.

1.1.2 MICROORGANISMOS PRESENTES, TIEMPO DE PERMANENCIA EN EL AIRE Y SUPERVIVENCIA

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de la supervivencia del microorganismo.

Algunos microorganismos se encuentran en forma de células vegetativas, pero lo más frecuente son las formas esporuladas, ya que los esporos son metabólicamente menos activos y sobreviven mejor en la atmósfera porque soportan la desecación. Estas formas esporuladas las producen bacterias, hongos, algas, líquenes y algunos protozoos. En el aire se aíslan frecuentemente bacterias esporuladas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* principalmente (Underwood, 1992).

El tiempo que permanecen los microorganismos en el aire depende de la forma y tamaño del microorganismo, y de la existencia y potencia de las corrientes aéreas que los sostengan y los eleven. Son factores adversos los obstáculos, que al oponerse a los vientos, disminuyen su velocidad y su potencia de arrastre, y las precipitaciones, que arrastran al suelo las partículas suspendidas.

La sedimentación de los microorganismos por gravedad sólo es importante en el aire en calma. Generalmente, hay demasiadas turbulencias para que esto suceda, excepto en zonas de vegetación densa, donde la velocidad del viento disminuye, o en condiciones estables durante la noche, cuando la capa laminar limitante alcanza varios metros de altura.

Las condiciones físico-químicas de la atmósfera no favorecen el crecimiento ni la supervivencia de los microorganismos por lo que la mayoría solo pueden sobrevivir en ella durante un breve período de tiempo.

La supervivencia de las bacterias es variable, debido a su diversidad estructural y metabólica. En general, las bacterias Gram positivas son más resistentes que las Gram negativas ya que su pared celular es más gruesa. Por ejemplo, en aire seco algunas especies de *Bacillus* y *Clostridium* son capaces de sobrevivir más de 200 años, *Mycobacterium* un mes y *Salmonella* sólo diez minutos (Potts, 1994).

Los esporos son las formas de vida con mayor supervivencia y tienen varias propiedades que contribuyen a su capacidad para sobrevivir en la atmósfera, principalmente su bajo metabolismo, por lo que no requieren nutrientes externos ni agua para mantenerse durante largos períodos de tiempo. Además poseen otras adaptaciones que aumentan su capacidad de sobrevivir en este ambiente.

Los principales factores que intervienen en la supervivencia de los microorganismos son: humedad relativa, temperatura, oxígeno, materia orgánica y radiaciones. Sus efectos se detallan a continuación:

HUMEDAD RELATIVA: Es el factor más importante. Cuando la humedad relativa del aire decrece, disminuye el agua disponible para los microorganismos, lo que causa deshidratación y por tanto la inactivación de muchos de ellos.

TEMPERATURA: Está muy relacionada con la humedad relativa, por lo que es difícil separar los efectos que producen ambas. La temperatura en la troposfera varía de 40° C cerca de la superficie, a -80° C en las capas altas, alcanzándose temperaturas de congelación entre 3-5 Km. La congelación no destruye los microorganismos pero no pueden multiplicarse.

OXÍGENO: Se ha observado una correlación negativa entre la concentración de oxígeno y la viabilidad, que aumenta con la deshidratación y el tiempo de exposición. La causa de la inactivación podría ser la presencia de los radicales libres de oxígeno.

MATERIA ORGÁNICA: La atmósfera contiene muy poca concentración de materia orgánica y, en la mayoría de los casos, es insuficiente para permitir el crecimiento heterotrófico. El agua disponible es escasa, por lo que incluso el crecimiento de microorganismos autótrofos está limitado.

RADIACIONES: La inactivación que producen en los microorganismos depende de la longitud de onda e intensidad de la radiación. Las radiaciones de longitud de onda corta (rayos X, rayos γ) contienen más energía, son ionizantes y alteran o destruyen el ADN de los microorganismos. Otros factores, como la humedad relativa, concentración de oxígeno y la presencia de otros gases, influyen en el efecto que producen las radiaciones sobre los microorganismos. La forma de

interacción es poco conocida, pero la desecación y congelación pueden proteger a los organismos de las radiaciones.

La exposición a radiaciones de corta longitud de onda, como la luz ultravioleta, es la principal causa de pérdida de viabilidad de los microorganismos que entran en la atmósfera. Las radiaciones ultravioletas aumentan con la altura, debido a una menor absorción por el ozono de las mismas, lo que causa mutaciones y la muerte de los microorganismos. Algunos se protegen de los efectos letales de la radiación por los pigmentos que producen, así como por el polvo y las gotas de saliva y moco, debido al escaso poder de penetración de la luz ultravioleta.

En la estratosfera hay una capa con una gran concentración de ozono que mata a los microorganismos, pero al mismo tiempo, actúa absorbiendo la radiación ultravioleta. Por todas estas razones, la estratosfera constituye una barrera para los microorganismos vivos procedentes de la troposfera (Atlas y Bartha, 2002).

1.1.3 BACTERIAS FORMADORAS DE ESPOROS

Una serie de bacterias gram-positivas son capaces de formar una estructura especial inactiva muy resistente llamada endosporo. Los endosporos se desarrollan dentro de las células bacterianas vegetativas de varios géneros: *Bacillus* y *Clostridium* (bacilos), *Sporosarcina* (cocos), y otros. Estas estructuras son criptobióticas, refractivas, más complejas que la célula vegetativa, no contienen ni producen ATP, extraordinariamente resistentes a las tensiones ambientales tales como calor,

radiación ultravioleta, radiación gamma, los desinfectantes químicos, y la desecación (Logan y De Vos, 2009).

Debido a su resistencia y el hecho de que varias especies de bacterias formadoras de endosporos son patógenos peligrosos, los endosporos presentan gran importancia práctica en alimentos, industria, y la microbiología médica. Para eliminar los endosporos se debe utilizar la esterilización por autoclaves, para así obtener estériles muchos materiales.

Los endosporos presentan también considerable interés teórico. Dado que las bacterias fabrican estas complicadas estructuras de una manera muy organizada en un período de unas pocas horas, la formación de esporos es muy adecuado para la investigación sobre la construcción de complejas estructuras biológicas. En el medio ambiente, los endosporos ayudan en la supervivencia cuando la humedad y los nutrientes son escasos.

Los endosporos pueden ser examinados con microscopio tanto óptico como electrónico. Debido a que los esporos son impermeables a la mayoría de los colorantes, a menudo son vistos como áreas sin color en bacterias tratadas con azul de metileno y otros colorantes simples; son empleadas tinciones especiales de esporos para hacerlos claramente visible. La posición de los esporos en la célula madre o esporangio con frecuencia difiere entre especies, por lo que es de valor considerable en la identificación. Los esporos pueden estar ubicados en el centro, cerca de un extremo (subterminal), o en un extremo (terminal) (Prescott y col., 2002).

1.1.4 FORMACIÓN Y ESTRUCTURA DEL ENDOSPORO BACTERIANO

La esporulación consiste en la producción del endosporo, una estructura quiescente, extremadamente resistente y en estado latente. Dicha estructura, bajo condiciones favorables, puede germinar y transformarse nuevamente en una célula vegetativa. Existen diferencias estructurales importantes entre el esporo y la célula vegetativa que le da origen, por lo cual este proceso implica una serie compleja de eventos de diferenciación celular.

La esporulación se produce cuando finaliza la fase de crecimiento exponencial de la célula, como consecuencia de la presencia de un ambiente adverso para el crecimiento, como puede ser la limitación de uno o más nutrientes esenciales. Durante este proceso, cesa la síntesis de algunas proteínas implicadas en las funciones vegetativas de la célula, y al mismo tiempo se activa la síntesis de proteínas específicas del esporo.

La formación de esporos es un proceso complejo y puede ser dividido en siete etapas, esquematizadas en la **Figura 1.1** (Prescott y col., 2002).

El proceso comienza con la condensación de un cromosoma recién duplicado, formando un filamento axial de ADN que se localiza en la región central de la célula (**etapa I**).

Este filamento comienza a desplazarse hacia un polo de la célula, donde se da lugar a la formación de un septo transversal, y se produce la división celular asimétrica entre la célula madre y la célula más pequeña destinada a convertirse en

esporo. Se produce así un plegado hacia el interior de la membrana celular para encerrar una parte del ADN y producir el tabique del *preesporo* (**etapa II**).

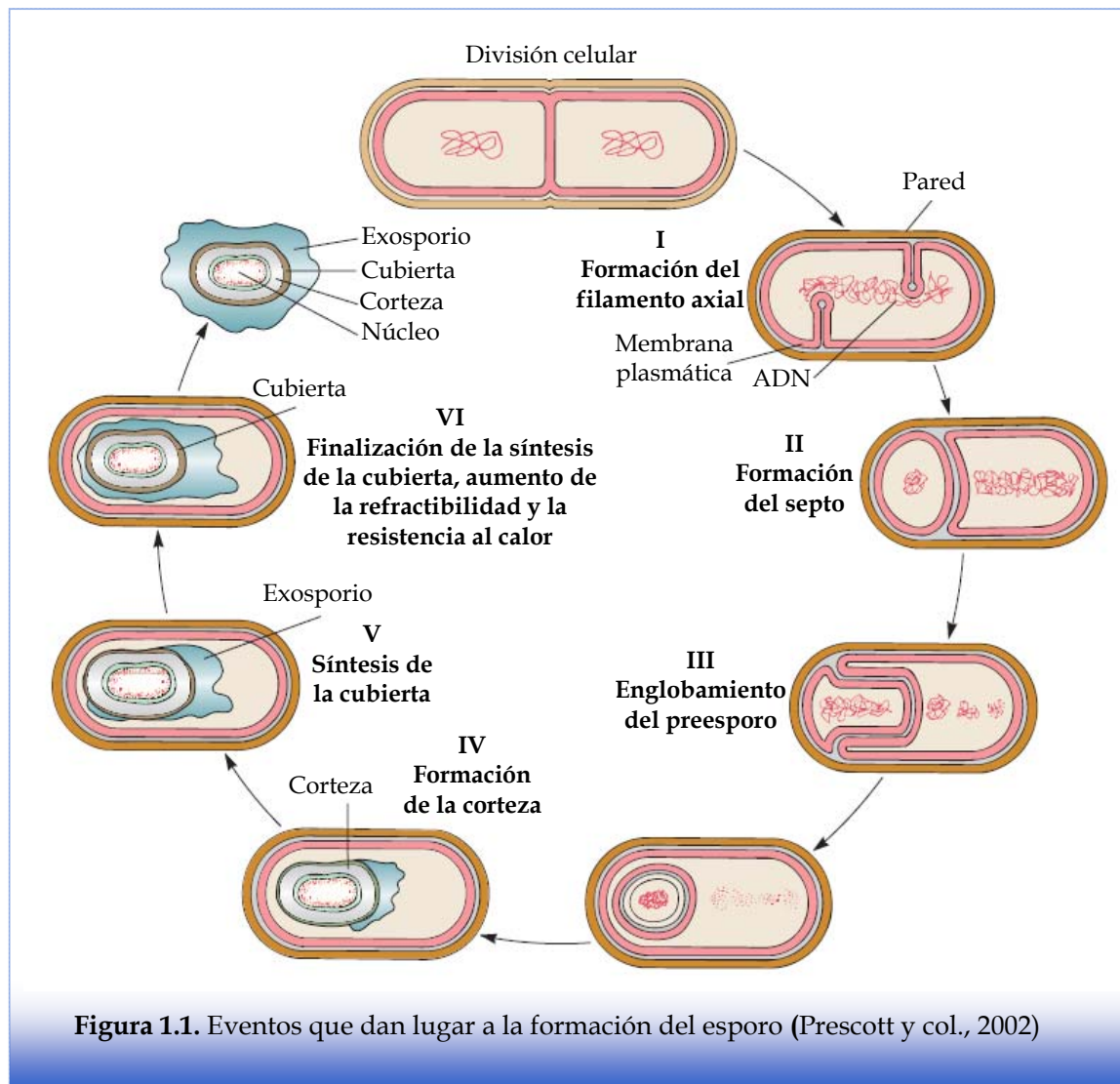
A continuación, la membrana celular de la célula madre engloba completamente a la célula más pequeña, dando lugar a un cuerpo rodeado por dos membranas concéntricas, que queda incluido en el citoplasma de la célula que le dio origen. La formación de este cuerpo, denominado *preesporo*, marca el punto donde la diferenciación se vuelve irreversible. Además, se frena la maquinaria de síntesis de la célula (ADN, ARN y proteínas) para activar la producción de moléculas importantes para las siguientes fases del proceso (**etapa III**).

Posteriormente, comienza la formación de las estructuras constituyentes del esporo. Así, se produce una rápida deposición de péptidoglicano entre las membranas internas y externas del esporo, lo que posteriormente constituirá la **corteza**, junto con la acumulación de Ca^{2+} y ácido dipicolínico en el núcleo. También comienza la síntesis de las proteínas de la **cubierta** del esporo, se conforma el exosporio y continúa la acumulación de Ca^{2+} y de ácido dipicolínico. En estas fases, el esporo adquiere refringencia y resistencia frente a agentes químicos y frente a las radiaciones (**etapas IV y V**).

A continuación se completa la estructura de la **cubierta** concluyendo la formación del esporo maduro. Es en este paso donde el esporo adquiere la resistencia al calor (**etapa VI**).

Finalmente, el esporo maduro, altamente deshidratado e inactivo metabólicamente, es liberado de la célula primordial ya que las enzimas líticas

destruyen el esporangio por autólisis, y permanecerá en ese estado hasta que se produzca un cambio en las condiciones ambientales, de modo que se promueva su germinación (**etapa VII**). La esporulación sólo requiere aproximadamente 10 horas en *Bacillus megaterium* (Prescott y col., 2002).



Los endosporos bacterianos poseen una estructura compleja constituida por varias capas (**Fig. 1.2**), las cuales se describen a continuación:

EXOSPORIO: Es la capa más externa; su naturaleza es principalmente proteica, aunque también posee cantidades importantes de lípidos y carbohidratos. El exosporio no está presente en todas las especies (Shehata y Collins, 1972; Buchanan y col., 1994).

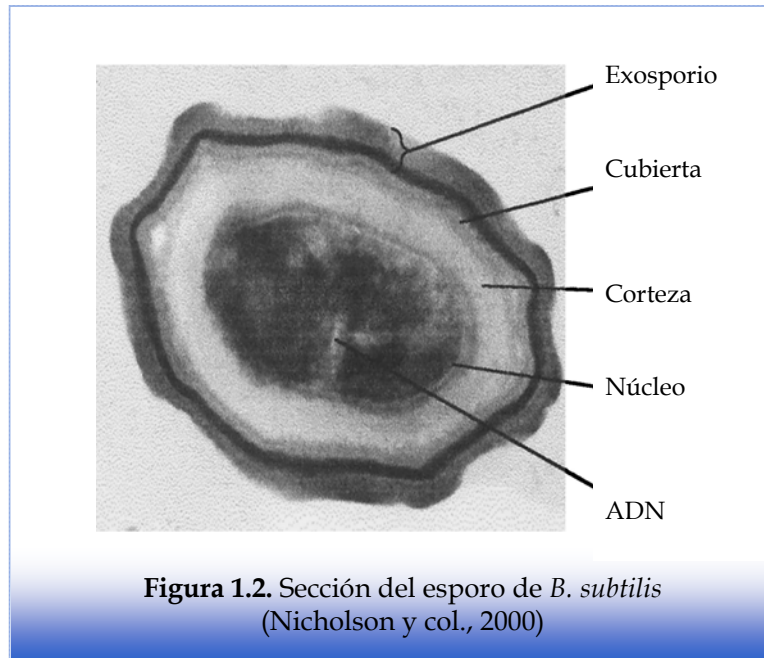
CUBIERTA: Es una estructura proteica de múltiples capas que encierra al esporo, se encuentra debajo del exosporio, y está compuesta por al menos 25 especies de polipéptidos (Driks, 1999). Esta estructura posee grupos disulfuro, y constituye el 50-80% del contenido proteico total. Las proteínas constituyentes son insolubles, salvo que se reduzcan los grupos S-S; estas capas son impermeables y con alto grado de entrecruzamiento. Esta compleja estructura lo protege al esporo de agentes nocivos; interviene en la resistencia química y enzimática, principalmente como barrera de permeabilidad de dichos compuestos (Driks, 1999; McDonnell y Russell, 1999; Riesenman y Nicholson, 2000; Russell, 1990).

CORTEZA: Es una capa del esporo que posee estructura y características únicas que están, en general, conservadas en un gran número de bacterias formadoras de esporos (Atrih y Foster, 2001; Meador-Parton y Popham, 2000). Dicha estructura es una gruesa capa de peptidoglicano, ubicada por debajo de la cubierta del esporo, que representa alrededor del 10% del peso seco total del esporo. La cubierta de peptidoglicanos consiste en dos capas, la *pared celular primordial interna* y la *corteza exterior* (Atrih y col., 1996, 1998). La pared primordial interna difiere de la corteza exterior en cuanto a que dicha pared retiene la estructura de la pared celular de la célula vegetativa, presenta mayor grado de entrecruzamiento y resiste más durante la germinación. La corteza está comprometida en el mantenimiento de la resistencia

al calor (Ellar, 1978; Atrih y col., 1996).

NÚCLEO O PROTOPLASTO: Es una estructura donde la célula vegetativa contiene todos los componentes metabólicos necesarios para su crecimiento, reproducción y mantenimiento, pero es metabólicamente inactivo. Posee todo el material genético y pequeñas cantidades de cada elemento de la maquinaria encargada de la síntesis proteica: ribosomas, ARNt, factores proteicos y enzimas complementarias, nucleosidos monofosfatos y difosfatos (no ARNm ni nucleosidos trifosfatos por ser inestables). No contiene prácticamente aminoácidos ni las enzimas encargadas de su biosíntesis.

En el esporo durmiente, el núcleo está deshidratado, lo cual sería un factor importante en la resistencia al calor (Gerhardt y Marquis, 1989; Marquis y col., 1994). El núcleo además contiene una alta concentración de minerales, principalmente calcio (Ca^{2+}), manganeso (Mn^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}), los cuales están unidos a un componente específico del esporo, el ácido dipicolínico. También, dentro del núcleo hay una alta concentración de pequeñas proteínas ácido-solubles (SASPs). Estas proteínas se forman durante el proceso de esporulación y tienen la función, entre otras, de unirse estrechamente al ADN del núcleo y protegerlo del daño potencial de la radiación ultravioleta, la desecación y el calor seco; por otro lado, también sirven como fuente de carbono y energía para el desarrollo de una nueva célula vegetativa, ya que se degradan durante la germinación. Estas proteínas comprenden aproximadamente el 5% de las proteínas totales del esporo maduro (Setlow, 1994).



Un esporo es capaz de permanecer en estado de latencia durante muchos años, hasta encontrar las condiciones óptimas para su reactivación. Sin embargo, una vez iniciada la activación, la conversión a célula vegetativa es relativamente rápida. La **germinación** implica una serie de reacciones químicas y degradativas que concluyen con la interrupción del estado durmiente y la pérdida de las propiedades características del esporo.

La transformación de esporos inactivos en células vegetativas activas se produce en tres etapas: (1) la activación, (2) la germinación, y (3) el crecimiento. A menudo un endosporo no germinará con éxito, incluso en un medio rico en nutrientes, a menos que haya sido activado.

La **activación** es un proceso reversible que prepara a los esporos para la germinación y por lo general resulta de tratamientos como el calentamiento. Le sigue

la **germinación**, la ruptura del estado latente de la espora. Este proceso se caracteriza por la hinchazón del espora, la ruptura o la absorción de la cubierta del espora, la pérdida de resistencia al calor y otros factores de estrés, pérdida de refractibilidad, liberación de los componentes del espora, y aumento de la actividad metabólica. Muchos metabolitos normales o nutrientes (por ejemplo, aminoácidos y azúcares) pueden provocar la germinación después de la activación. La germinación es seguida por la tercera etapa, el **crecimiento**. El protoplasto sintetiza nuevos componentes, se desprende de los restos de la cubierta del espora, y se desarrolla de nuevo en una bacteria activa.

1.1.5 RESISTENCIA A DIFERENTES FACTORES ADVERSOS

Como se mencionó anteriormente, los endosporos bacterianos son resistentes a una gran variedad de factores medioambientales. En especial, los esporos de *B. subtilis* son resistentes a factores como la presencia de agentes químicos tóxicos, la desecación, la baja y alta presión, las temperaturas extremas y el alto nivel de radiación ionizante y radiación UV (Nicholson y col., 2000).

Estos factores de resistencia de los endosporos de *B. subtilis* son temas muy estudiados en la actualidad, ya que son las causas por las que estas especies generan, entre otros, los problemas socioeconómicos mencionados previamente.

Por un lado, la resistencia al calor es uno de los factores más estudiados y de mayor importancia, ya que esta resistencia es el parámetro de control en la mayoría

de los procesos de esterilización. Esta resistencia depende de variados factores, como ciertas estructuras y características del espora, que son fundamentales en dicha resistencia. Además, influyen mucho las características del núcleo (Driks y Setlow, 1999) y de la corteza (Imae y Strominger, 1976). También, el contenido de minerales (Atrih y Foster, 2001; Bender y Marquis, 1985; Marquis y Bender, 1985; Slepecky y Foster, 1959) y ácido dipicolínico (Nicholson y col., 2000; Paidhungat y col., 2000) afectan dicha resistencia.

Asimismo, la resistencia a la radiación UV, es una característica en estudio actualmente, que se detalla a continuación.

RESISTENCIA A LA RADIACIÓN UV

En general, los endosporos de *B. subtilis* son entre 5 y 50 veces más resistentes a la radiación UV que sus correspondientes células vegetativas (Setlow, 2001). Esta alta resistencia ha sido atribuida a diversas propiedades estructurales específicas de los esporos, tales como:

- La estructura modificada del ADN, causada por la presencia de las SASPs (pequeñas proteínas ácido-solubles) unidas al ADN (Setlow, 2001). Estas proteínas saturan el cromosoma del espora al unirse alrededor de la doble hélice, principalmente por interacción con la medula del ADN. De esta manera cambia la conformación del ADN y se vuelve más resistente a la acción de nucleasas.
- La reparación del ADN por una vía alterna específica (Munakata y Rupert, 1972).

○ La acumulación de ácido dipicolínico y de Ca^{2+} quelado en el núcleo del esporo durmiente, formando aproximadamente el 10% del peso total seco del esporo (Slieman y Nicholson, 2001).

Además, el endosporo muestra un amplio espectro de pigmentación (Barnett y col., 1983; Hoti y Balaraman, 1993; Liu y col., 1993; Mitchell y col., 1986). Los resultados sugieren que el desarrollo de pigmentos endógenos constituye una ventaja evolutiva que protegen a los esporos contra la nociva radiación UV-A ambiental (Moeller y col., 2005).

1.1.6 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

El estudio de los microorganismos del aire depende de las técnicas desarrolladas para la toma de muestras. Actualmente, existen una gran cantidad de métodos e instrumentos para detectar los microbios del aire, de los que se citan los más útiles y usuales.

Las técnicas utilizadas son diversas, de las cuales, la sedimentación, filtración, el impacto sobre distintas superficies sólidas y el burbujeo en medios líquidos, son las más importantes (Buttner y col., 1997).

TÉCNICA DE SEDIMENTACIÓN POR GRAVEDAD: El método de sedimentación en placa Petri ha sido el más ampliamente utilizado. Las placas con medio de cultivo estéril permanecen abiertas durante determinados períodos de tiempo, permitiendo la sedimentación de los microorganismos. Este método es

sencillo y económico. Tiene la ventaja de que se pueden identificar de los cultivos los microorganismos viables, pero su interpretación es difícil porque no pueden relacionarse con el volumen de aire muestreado. La deposición varía con el tamaño y forma de los microorganismos, la velocidad y la turbulencia del aire. El método no es cualitativa ni cuantitativamente exacto y detecta principalmente los microorganismos que más persisten en el aire, no detectándose, sin embargo, los microorganismos más pequeños.

FILTRACIÓN: La filtración se realiza a través de un material poroso. Los filtros recogen los microorganismos por sedimentación, impacto, difusión o atracción electrostática, dependiendo del tipo. Los filtros de membrana más utilizados son los de diámetro de poro desde 0,01 a 10 μm , según la naturaleza de los bioaerosoles.

Para realizar la filtración se han diseñado aparatos portátiles con una bomba de vacío y un flujo de aire de 1 a 50 litros por minuto (Millipore). Entre los problemas que se destacan, encontramos la pérdida de viabilidad de las células vegetativas debido a la desecación durante el muestreo. En las muestras obtenidas en los filtros de membrana se pueden estudiar los microorganismos por microscopía o por cultivo, colocando los filtros en medios de cultivo sólidos, para determinar el número de colonias.

IMPACTO SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS: Esta técnica es la más usada en la actualidad. Los microorganismos se separan de la corriente de aire utilizando la inercia para forzar su sedimentación sobre las superficies sólidas. El proceso de impacto depende de las propiedades de inercia de la partícula (tamaño, densidad y

velocidad) y de las propiedades físicas del aparato, tales como las dimensiones de la boquilla y el recorrido del flujo de aire.

Se han diseñado una gran variedad de aparatos que difieren por el número de boquillas o impactores, y por el tamaño, así como el número de pasos o etapas por las que pasa el aire. En la mayoría de ellos, los microorganismos quedan retenidos sobre un medio de cultivo sólido contenido en placas de Petri, en tiras de plástico y en placas de contacto. Después de la incubación, podemos hacer el recuento e identificación de los microorganismos. Basados en estas técnicas, actualmente existen en el mercado aparatos fácilmente transportables que se alimentan con pilas para tomar muestras de campo. El flujo de aire varía en los distintos aparatos.

BURBUJEO EN LÍQUIDOS: El fundamento es similar al impacto sobre medios sólidos y la fuerza de inercia es esencial para separar los microorganismos contenidos en el aire y que se depositen en el medio líquido. El flujo de aire puede ser de 12,5 ó 20 litros por minuto. Este método también requiere una bomba de vacío. Estos dispositivos, también llamados de “trampa líquida”, hacen pasar el aire mediante un aspirador, a través de líquidos (generalmente soluciones tampón diluidas) que retienen los microorganismos. Este líquido puede sembrarse en placa para determinar el número de microorganismos, examinarse microscópicamente (May y Harper, 1957) o analizarlo con ensayos bioquímicos para determinar endotoxinas (LAL), sondas genéticas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), inmunoensayo y por citometría de flujo (Buttner y col., 1997).

No existe un método de muestreo de aire ideal para todas las necesidades, por lo que para elegir uno deberemos considerar qué queremos investigar y qué información necesitamos; es decir, deberemos determinar previamente si nos interesa saber el número total de microorganismos o sólo el de viables, si deseamos identificarlos y cultivarlos o sólo observar su morfología microscópicamente, si queremos detectar todos los presentes o sólo los patógenos, etc.

1.1.7 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR EL AIRE

Gran número de infecciones humanas y animales se transmiten por el aire y causan enfermedad, principalmente, en el aparato respiratorio. Las enfermedades respiratorias tienen una gran importancia socio-económica ya que se transmiten fácilmente a través de las actividades normales del hombre, son las más frecuentes en la comunidad y el motivo más importante de absentismo laboral y escolar. No hay que olvidar que una persona, a lo largo de su vida, respira varios millones de m³ de aire, gran parte del cual contiene microorganismos.

Se calcula que se inhalan al día una media de diez mil microorganismos, pero el hombre posee eficaces mecanismos de defensa para evitar que invadan el aparato respiratorio. Sin embargo, el control de estas enfermedades es difícil porque los individuos que las padecen suelen seguir realizando sus actividades cotidianas y además, en algunas de ellas, no se dispone de agentes terapéuticos ni vacunas eficaces. Se caracterizan por su tendencia a causar epidemias, siendo más frecuentes durante el otoño y el invierno, cuando las personas se reúnen en recintos cerrados.

Los microorganismos causales se transmiten por las secreciones de la nariz y la garganta y son diseminados por la tos, los estornudos y la conversación pudiendo alcanzar una velocidad de 300 km/h (de la Rosa y col., 2002).

Una persona puede expulsar una media de 500 partículas en la tos y de 1.800 a 20.000 en un estornudo, de los cuales la mitad son menores de 10 μm . El tamaño de las partículas tiene una gran importancia, las más pequeñas penetran mejor y las más grandes tienen mayor supervivencia. La mayoría de los virus y muchas bacterias que causan infecciones respiratorias se encuentran en gotas grandes de 20 μm ya que si son pequeñas se evaporan y se inactivan por desecación.

Conviene recordar que la transmisión aérea de enfermedades no es exclusiva de microorganismos que salen de las vías respiratorias. En algunos casos se forman bioaerosoles procedentes de animales y sus productos que se resuspenden en el aire y pueden ser inhaladas (de la Rosa y col., 2002).

1.2 DESCONTAMINACIÓN DE AIRE

Debido a los inconvenientes ocasionados por la presencia de bioaerosoles, es evidente la necesidad de eliminar los microorganismos presentes en el aire de las áreas de trabajo y los ámbitos de la vida cotidiana de los seres vivos. Se describen a continuación algunas de las tecnologías disponibles comercialmente en la actualidad para la eliminación de dichos microorganismos.

1.2.1 FILTROS DE AIRE

Se emplean en general para remover del aire partículas de polvo, polen, esporos fúngicos, ácaros del polvo y otros alérgenos. También permiten remover gran cantidad de bacterias. En estos procesos se utiliza un filtro como medio de separación, en el cual las partículas sólidas quedan retenidas y no son liberadas al aire nuevamente. No obstante, las partículas retenidas en el filtro no son degradadas, quedando inmovilizadas en dicho medio, que luego necesita un tratamiento posterior para hacer efectiva la eliminación del microorganismo.

1.2.2 FILTROS DE AIRE CON CARBÓN ACTIVADO

Estos filtros se utilizan para capturar vapores químicos, gases, humo de cigarrillo, y olores en general. Estos equipos constan de filtros que poseen sistemas de poros con tamaño molecular. Estos poros son altamente adsorbentes debido a que forman una fuerte unión química con los contaminantes mencionados.

Estos sistemas resultan muy eficientes para capturar los compuestos químicos mencionados, los cuales son muy molestos y tóxicos para los seres vivos. Sin embargo, no resultan suficientemente efectivos para retener muchos de los microorganismos presentes en el aire.

1.2.3 IONIZADORES DE AIRE

Mediante el uso de esta tecnología se pueden remover, en general, las partículas presentes en el aire, incluyendo partículas ultra finas, con un tamaño menor a 0,01 μm . También permiten retener virus y bacterias, y neutralizar humo de cigarrillo y vapores químicos.

En los equipos ionizadores de aire se generan iones que polarizan las partículas de polvo presentes en el aire, creando una atracción magnética entre ellas. Como resultado, dichas partículas colapsan, formando agregados que resultan muy grandes para mantenerse en el aire, por lo que sedimentan.

Esta tecnología permite capturar una amplia variedad de partículas. Sin embargo, al igual que los filtros de aire, no permite inactivar los microorganismos retenidos.

1.2.4 ESTERILIZADORES UV

Estos procesos permiten la destrucción efectiva de diversos microorganismos, incluyendo gérmenes, virus, bacterias y fungis (incluyendo mohos).

Los esterilizadores UV poseen lámparas germicidas que emiten radiación UV-C, en los cuales se produce la degradación de los contaminantes al ser irradiados.

Esta tecnología es muy eficiente, ya que tiene un amplio rango de acción sobre los microorganismos y permite inactivarlos. Sin embargo, los esterilizadores UV no

son eficientes para la inactivación de esporos. Además, la radiación empleada en esos equipos resulta muy nociva para el hombre si incide sobre la piel.

1.2.5 GENERADORES DE OZONO

Estos equipos permiten la destrucción de ciertos compuestos y microorganismos, incluyendo bacterias y los agentes químicos causantes de olores, tales como los compuestos que resultan del humo del cigarrillo.

Mediante esta tecnología se genera un ambiente con un elevado contenido del gas ozono, el cual es un fuerte oxidante, lo que permite la descomposición de los contaminantes mencionados.

Una de las desventajas que presentan estos equipos reside en los efectos adversos que produce en el hombre cuando el ozono es inhalado.

1.2.6 TECNOLOGÍAS ACOPLADAS

Existen en el mercado dispositivos que acoplan diferentes tecnologías, para obtener una mayor eficiencia en la eliminación de microorganismos del aire. Se detalla a continuación, y a modo de ejemplo, el “Purificador de Aire AP-307” (**Fig. 1.3-a**), marca VITAION® (<http://www.vitaion.com/purificadores-de-aire/ap-307.html>). El fabricante anuncia que destruye los agentes causantes de alergias, tales

como bacterias, hongos, virus, polen, ácaros, polvo y compuestos orgánicos volátiles. Y dispone en su interior de las tecnologías detalladas en la **Figura 1.3-b**.

Si bien estas tecnologías resultan eficientes en ciertas condiciones y, además, se pueden complementar unas con otras para efectivizar la eliminación de los microorganismos o compuestos químicos, como se observa en el último ejemplo, no resultan efectivas en todas las situaciones donde es necesaria la eliminación de contaminantes. O, como se detalló previamente, algunas de estas metodologías sólo permiten retener los contaminantes, no los destruyen, por lo cual requieren un mantenimiento, o recambio de filtros y otros elementos del dispositivo.

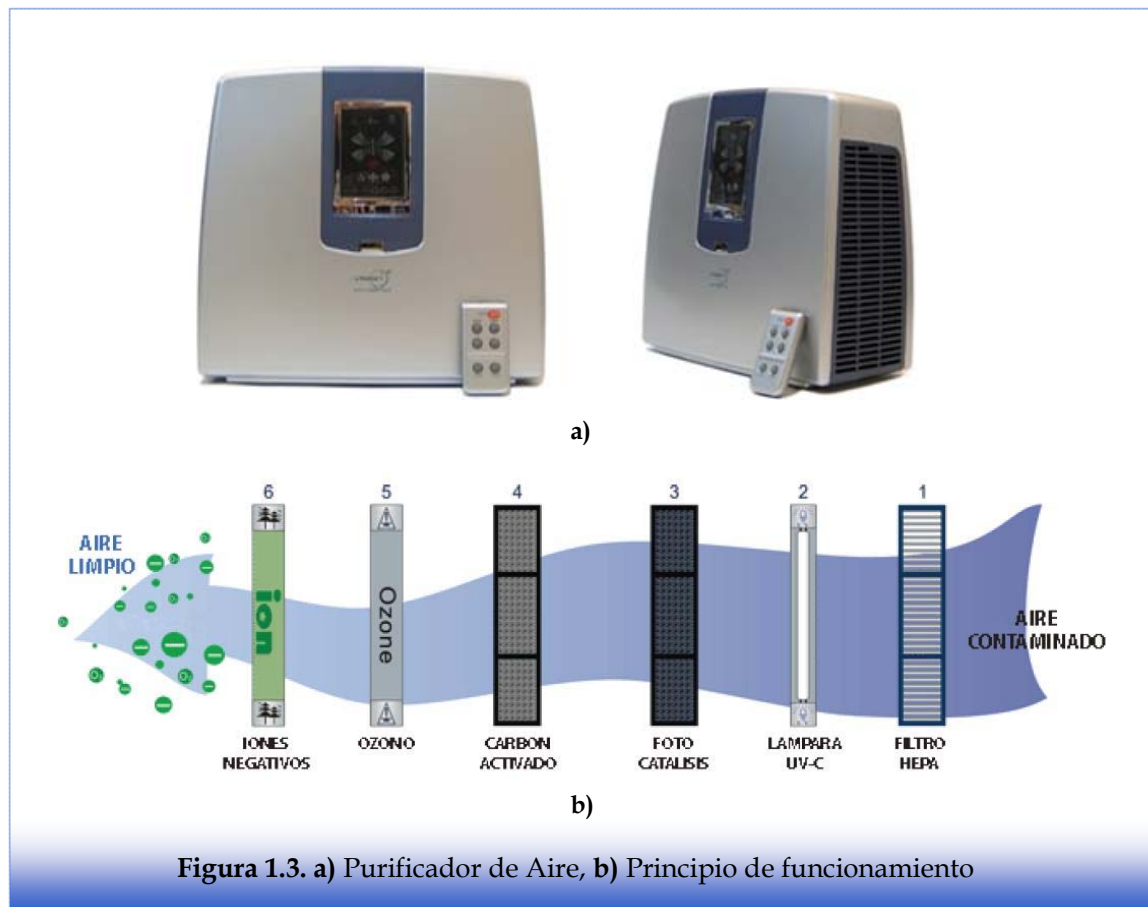


Figura 1.3. a) Purificador de Aire, b) Principio de funcionamiento

Además, la variedad de microorganismos sobre los que actúan en algunas ocasiones no es muy diversa, y no siempre contemplan a los esporos como estructura posible de eliminar.

Por tanto, muchas de las situaciones críticas donde es necesaria la eliminación de contaminantes no pueden ser resueltas mediante el uso de las tecnologías disponibles, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos procesos para la eliminación de los bioaerosoles.

1.3 FOTOCATÁLISIS

1.3.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Las tecnologías o procesos avanzados de oxidación se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios fundamentales en la estructura química de los contaminantes. Estos procesos generalmente involucran la generación de especies de alto poder oxidante, principalmente el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica. Dentro de esta clasificación encontramos los procesos no fotoquímicos y procesos fotoquímicos. En esta última sub-clasificación se hallan los siguientes procesos: oxidación de agua sub-crítica y super-crítica, procesos fotoquímicos, fotólisis del agua con radiación ultravioleta de vacío (UVV), UV/H₂O₂, UV/O₃, foto-fenton y relacionadas, y fotocatalisis heterogénea.

En particular, los procesos fotocatalíticos se aplican para eliminar contaminantes presentes tanto en medio acuoso como en medio gaseoso. Las ventajas del uso de estas nuevas tecnologías sobre los métodos convencionales se detallan a continuación:

- Permiten degradar químicamente un gran número de contaminantes, y en algunos casos permiten la mineralización completa de los mismos. Los contaminantes son destruidos, no solo cambian de fase como en el caso de los procesos de filtración o adsorción con carbón activado.
- No se generan subproductos a partir de los contaminantes degradados, que luego necesiten un tratamiento extra; notar que el mismo proceso fotocatalítico puede degradar los subproductos generados.
- Eliminan compuestos aún en muy bajas concentraciones.
- En el caso de tratamiento de aguas, mejoran las propiedades organolépticas del agua tratada.
- Eliminan efectos sobre la salud de desinfectantes y oxidantes residuales, como el cloro.
- Admiten la utilización de fotocatalizadores económicos, inocuos y de gran disponibilidad, tal como el óxido de titanio (TiO_2).
- Permiten una fácil adaptación a diferentes condiciones operativas.

- Se emplean para el tratamiento de mezclas complejas de contaminantes peligrosos, ya que se aprovecha la característica de escasa o nula selectividad
- Se utilizan para eliminar contaminantes no-biodegradables y/o biocidas, para los cuales los tratamientos biológicos resultan ineficientes.

Los procesos involucrados permiten obtener una elevada velocidad de reacción, principalmente por la gran producción de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el cual es un agente fuertemente oxidante. Este radical puede degradar prácticamente a todos los compuestos orgánicos, con una velocidad mucho más elevada que otros oxidantes, como el O_3 (Domènech y col., 2004).

1.3.2 FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

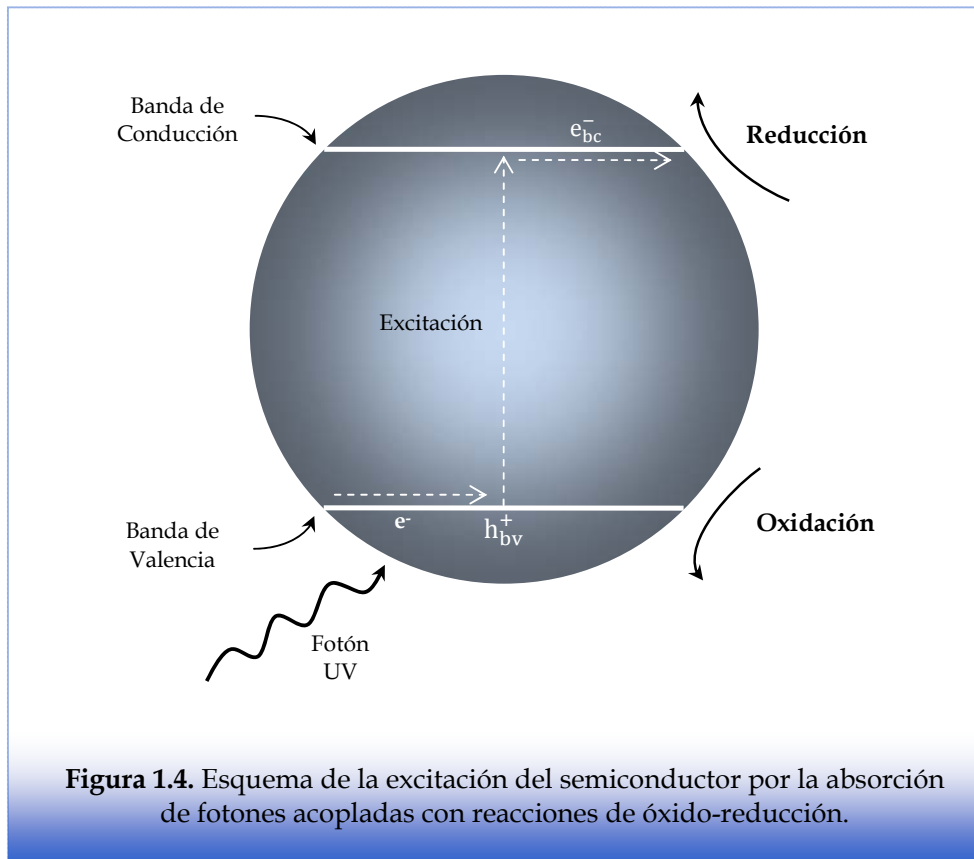
La fotocatalisis heterogénea es un proceso en el cual un semiconductor absorbe energía radiante en forma de luz UV. La absorción de fotones (**Fig. 1.4**) promueve los electrones de la banda de valencia (de menor energía) a la banda de conducción (de mayor energía). Por cada electrón (e_{bc}^-) movido se produce un hueco (h_{bv}^+) en la banda de valencia. Los pares h_{bv}^+/e_{bc}^- fotogenerados son portadores libres con cargas opuestas, que pueden migrar a la superficie del semiconductor y reaccionar con las especies adsorbidas o, en ausencia de un campo eléctrico, recombinarse rápidamente (en tiempos del orden de los 30 nanosegundos) liberando el exceso de energía principalmente como calor, y en algunos casos con emisión de fotones.

El evento de recombinación puede ocurrir tanto en la superficie del

semiconductor como en el seno del mismo. En presencia de un campo eléctrico, o de aceptores de electrones, como el ozono o el oxígeno, la recombinación puede ser parcialmente suprimida.

Los aceptores de carga atrapados en estados superficiales pueden sobrevivir tiempos suficientemente largos como para reaccionar con moléculas de agua u otras sustancias cercanas a la superficie del semiconductor. Sobre esta base se sustentan los procesos de uso práctico como la fotocatalisis heterogénea.

Los h_{bv}^+ son altamente oxidantes y los e_{bc}^- son moderadamente reductores. Entonces, en presencia de especies adsorbidas en la superficie del semiconductor y bajo iluminación, ocurren simultáneamente reacciones de oxidación y reducción.



Los h_{bv}^+ generados pueden reaccionar con las especies adsorbidas, aunque habitualmente son capturados por moléculas de agua (H_2O) o grupos OH^- superficiales, formando radicales $\cdot OH$:



Los radicales $\cdot OH$ son altamente reactivos, y permiten degradar muchos compuestos inorgánicos y la mayoría de los compuestos orgánicos. Con respecto a esto último, a través de reacciones de captura de iones hidrógeno o de adición a dobles ligaduras o a anillos aromáticos, causan la oxidación de sustratos con la formación de radicales libres. A su vez, estos radicales reaccionan rápidamente con el oxígeno disuelto, fragmentándose hasta alcanzar la mineralización completa. Se ha demostrado ampliamente la efectividad de los procesos fotocatalíticos para degradar gran variedad de compuestos orgánicos.

Por otro lado, los e_{bc}^- reducen al O_2 adsorbido o disuelto para formar radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) disminuyendo de esta forma la probabilidad de recombinación del par $h_{bv}^+ - e_{bc}^-$:

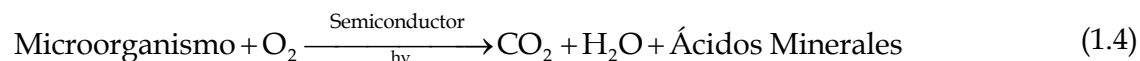


Además este radical puede reaccionar con diversas especies. Al mismo tiempo, los e_{bc}^- pueden reaccionar con otras especies oxidantes presentes en el sistema.

Los procesos reductivos están vinculados con la disponibilidad de e_{bc}^- en la superficie del semiconductor. En medios aeróbicos, tal como ocurre en procesos fotocatalíticos medioambientales, el O_2 adsorbido es la principal especie aceptora.

Los primeros pasos en la degradación de compuestos orgánicos implican su oxidación mediante h_{bv}^+ o a través de su reacción con radicales $\cdot OH$, formados en general en la reacción catódica.

Finalmente, lo que se obtiene es la catálisis de la reacción entre un oxidante, como puede ser el O_2 o el H_2O , y la materia orgánica, como pueden ser los componentes de un microorganismo, como se observa en la siguiente reacción:



1.3.3 PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA FOTOCÁTALISIS

Los factores que se detallan a continuación afectan la eficiencia global de los procesos fotocatalíticos en forma cualitativa o cuantitativa, por lo que son determinantes en el diseño de reactores.

pH: Es un parámetro determinante para las reacciones fotocatalíticas que se producen en medio acuoso, ya que modifica el estado superficial de las moléculas adsorbidas dependiendo si el pH es ácido o básico.

CATALIZADOR: Los materiales que se pueden utilizar como fotocatalizadores son semiconductores tales como TiO_2 , ZnO , CdS , óxidos de hierro, WO_3 , ZnS , etc.

Estos óxidos son, en general, económicos, y de gran disponibilidad. Además, los óxidos metálicos son los fotocatalizadores más estudiados. Particularmente, el TiO_2 es el más utilizado, ya que posee una gran estabilidad química, y permite trabajar en un amplio rango de pH cuando se trabaja con soluciones acuosas. Finalmente, la anatasa, una de las formas cristalinas del TiO_2 , permite obtener las mejores actividades fotocatalíticas.

TEMPERATURA: La velocidad de las reacciones fotocatalíticas no se modifica apreciablemente con la variación de la temperatura del sistema.

HUMEDAD: La disponibilidad de moléculas de agua en fase gas en la superficie del fotocatalizador influye fuertemente sobre la velocidad de reacción, ya que las moléculas de H_2O adsorbidas serán lasceptoras de h_{bv}^+ generados, que formarán posteriormente los radicales $\cdot\text{OH}$, encargados de la oxidación de los compuestos orgánicos (ver reacciones 1.1 y 1.4).

INTENSIDAD DE LA RADIACIÓN: Debido a que los fotones actúan como “reactivos” en las reacciones fotocatalíticas, la eficiencia de dichos procesos depende de forma directa del nivel de irradiación del catalizador; es decir, hasta un cierto nivel de irradiación, cuanto mayor sea la intensidad de radiación, mayor será la absorción de fotones, y mayor la actividad fotocatalítica.

DISEÑO DEL REACTOR: Los parámetros derivados del diseño y del tipo de reactor juegan un papel importante en la eficiencia final del proceso. La geometría del reactor debe garantizar un contacto íntimo entre el fotocatalizador y los reactivos, expuestos a un nivel de radiación apropiado para que se produzcan las reacciones

fotocatalíticas.

NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DEL CONTAMINANTE: La velocidad de las reacciones fotocatalíticas depende de la naturaleza del compuesto a eliminar. Por ejemplo, los compuestos clorados reaccionan rápidamente, mientras que los compuestos más complejos, como los pesticidas, reaccionan más lentamente. Más aun, cuando se quiere eliminar microorganismos, la velocidad de reacción de los compuestos que forman las capas externas de los mismos resulta mucho menor.

1.3.4 MATERIALES SOPORTADOS

La disposición del fotocatalizador influye de manera sustancial en la eficiencia del proceso, ya que resulta indispensable que la superficie del catalizador se encuentre adecuadamente irradiada. Para reactores fotocatalíticos en fase gas es posible utilizar catalizadores como TiO_2 soportados sobre sustratos fijos. Si bien este proceso trae aparejado algunos problemas, sus ventajas son evidentes en el tratamiento de gases. Deben considerarse los siguientes aspectos:

- La adherencia del TiO_2 al soporte debe ser muy buena.
- La interacción del soporte con el catalizador debe producir una disminución mínima de la actividad del catalizador.
- La interacción del soporte con el catalizador debe asegurar la estabilidad de la microestructura y estructura cristalina del TiO_2 .

Se puede agrupar a los distintos materiales soportados en dos grandes grupos: fotocatalizadores dispersos en una matriz que le sirve de soporte y fotocatalizadores en forma de recubrimientos, capas o películas.

FOTOCATALIZADORES EN FORMA DE PELÍCULAS: Para el tratamiento de gases y aguas, y para reacciones de fotoelectrocatalisis, se emplean películas de TiO_2 sobre sustratos inertes. Dependiendo de la aplicación y del tipo de sustrato, se utilizan distintos métodos para preparar dichas películas.

SOPORTES: Los soportes más estudiados se basan en derivados del SiO_2 , tanto vidrios de distinta clase como sílice fundida o cuarzo. El uso de estos sustratos se debe a su bajo costo y a su elevada transparencia a la luz UV. El vidrio de borosilicato es transparente a la radiación UV-A, por lo que puede usarse como soporte del fotocatalizador y para las ventanas de los reactores fotocatalíticos.

Otros tipos de soportes que también se han usado son metales (acero inoxidable, aluminio, titanio), cerámicos (principalmente azulejos y baldosas), zeolitas y plásticos.

El éxito de estos recubrimientos fijados a soportes de vidrio de borosilicato se basa en la gran adherencia entre el TiO_2 y el vidrio. Esta adherencia se atribuye a reacciones de sinterizado entre las partículas del catalizador y el vidrio durante el tratamiento térmico. Otro factor de éxito de estos soportes está relacionado con la ausencia de iones sodio (Na^+) en la estructura del vidrio, ya que la presencia de este ion inhibe las reacciones fotocatalíticas.

1.4 FOTOCATÁLISIS Y MICROORGANISMOS

1.4.1 INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS POR FOTOCATÁLISIS

La inactivación fotocatalítica de microorganismos en medio acuoso fue demostrada inicialmente por Matsunaga y col. (1985). En relación a la desinfección fotocatalítica en fase gas, las primeras publicaciones existentes son más recientes. Goswami y col. (1995) reportaron por primera vez el desarrollo de un reactor basado en procesos fotocatalíticos para inactivar completamente contaminantes biológicos del aire como *Serratia marcescens*. Desde entonces, la inactivación fotocatalítica de bioaerosoles ha sido objeto de estudio de numerosas publicaciones (Goswami y col., 1997; Jacoby y col., 1998; Goswami y col., 1999; Masaki y col., 1999; Greist y col., 2002; Sato y col., 2003; Kühn y col., 2003; Kim y col., 2003; Vohra y col., 2006; Erkan y col., 2006; Grinshpun y col., 2007; Pal y col., 2008; Paschoalino y col., 2008; Yao y col., 2011; Guo y col., 2012; Sánchez y col., 2012). Más aún, se han desarrollado catalizadores dopados con diferentes metales que aumentan considerablemente la velocidad de inactivación de los microorganismos en estudio (Le y col., 2011; Srisitthiratkul y col., 2011).

El uso de procesos fotocatalíticos para degradar esporos inmovilizados sobre superficies recubiertas con TiO_2 fue reportado primero por Wolfrum y col. (2002). Los autores reportaron que la completa mineralización de bacterias, y esporos bacterianos y fúngicos se puede obtener sobre superficies recubiertas con TiO_2 Degussa P-25 e irradiados con luz UV-A. Posteriormente, se han publicado varios estudios sobre la aplicación de la fotocatalisis para inactivar las bacterias que forman

esporos sobre superficies recubiertas de TiO₂ (Lin y Li, 2003; Pal y col., 2005; Vohra y col., 2005; Zhao y col., 2009; Chuaybamroong y col., 2010; Kozlova y col., 2010; Prasad y col., 2011).

Para el diseño y optimización de reactores fotocatalíticos destinados a la eliminación de microorganismos, resulta indispensable el conocimiento de las expresiones cinéticas que describan la velocidad de inactivación de los mismos.

A pesar de los numerosos artículos científicos dedicados a los mecanismos y modelado del proceso de fotocatalisis para propósitos de desinfección, recientemente compilados en trabajos científicos de revisión (Dalrymple y col., 2010; Chong y col., 2010; Foster y col., 2011), sólo un pequeño número de ellos presentan modelos cinéticos que describen la inactivación fotocatalítica de microorganismos inmovilizados y los relacionan con las variables de operación pertinentes, tales como la concentración de microorganismos, flujo de radiación en la superficie catalítica y el tiempo de exposición y de residencia.

Como parte de los estudios de la cinética de inactivación de microorganismos en fase gaseosa, es posible nombrar al trabajo de Pal y col. (2005), concerniente a la eliminación de *E. coli*, *B. subtilis*, y *Microbacterium sp.* Además, Sato y col. (2003) desarrollaron un modelo que describe la cinética de inactivación fotocatalítica de *E. coli* inmovilizada sobre placas de cuarzo recubiertas con TiO₂.

Además, pocos estudios se han dedicado a evaluar el desempeño de los sistemas catalíticos mediante parámetros de eficiencia (de Lasa y col., 2005; Marugán y col., 2008; Briggiler Marcó y col., 2011). La evaluación precisa de la actividad de

inactivación de diferentes soportes es esencial para seleccionar el mejor catalizador y mejorar el diseño de sistemas de desinfección. Los parámetros de eficiencia relacionan la velocidad de inactivación de microorganismos con la energía que llega a la superficie del catalizador (eficiencia fotónica) o la energía absorbida por el catalizador (eficiencia cuántica), permitiendo la comparación de los resultados obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales. Utilizando un enfoque ligeramente diferente, Faure y col. (2011) estudiaron la inactivación de *E. coli* sobre diferentes soportes de TiO₂ y compararon su actividad calculando la proporción de fotones efectivamente absorbidos por el catalizador mediante una simulación de Monte Carlo.

1.4.2 MODELADO DE LA INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE MICROORGANISMOS

El desarrollo de herramientas matemáticas y modelos cinéticos relacionados con la inactivación de los microorganismos presentes en el aire es un campo de interés, ya que este tipo de desarrollos permiten el modelado y simulación de fotobiorreactores orientados a la descontaminación de aire, y posibilitan los cambios de escala de reactores de laboratorio para diseñar reactores comerciales de mayor escala.

Para la obtención de la cinética de inactivación fotocatalítica de un microorganismo, es posible recurrir a una metodología simplificada que simule los procesos que tendrían lugar en los reactores fotocatalíticos continuos, los cuales resultan muy complejos debido a la cantidad de variables involucradas en tales

condiciones. Por este motivo, en la mayoría de los trabajos se estudia la inactivación fotocatalítica immobilizando las bacterias en estudio sobre placas recubiertas con el fotocatalizador que luego son irradiadas, en lugar de estudiar la cinética de inactivación en geometrías más complejas, tal como un reactor fotocatalítico continuo.

1.4.3 ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA PLATA

Los mecanismos que subyacen a la actividad antibacteriana de la plata no están aún completamente dilucidados. Un trabajo de revisión reciente (Marambio-Jones y Hoek, 2010) describe en detalle las características antibacterianas de los iones plata y de las nanopartículas de plata. Los principales mecanismos de toxicidad propuestos (**Fig. 1.5**) son los siguientes:

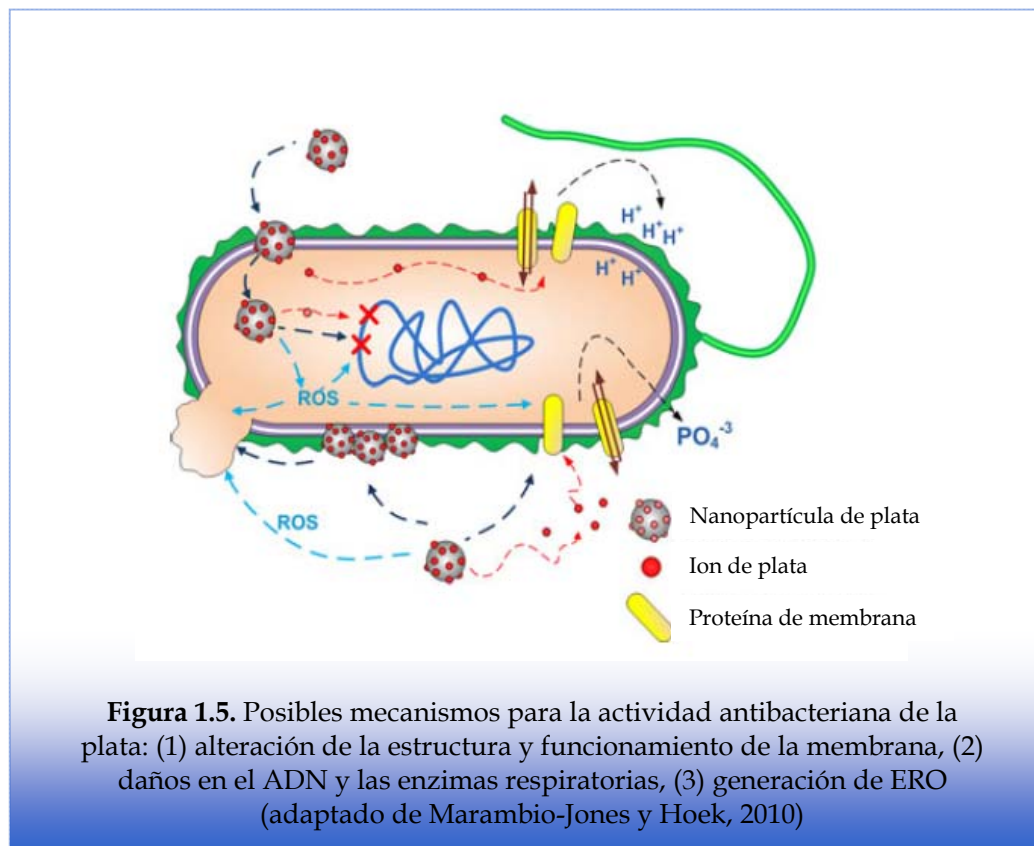
- Daño directo sobre la membrana celular: Las nanopartículas de Ag pueden unirse a la membrana celular de la bacteria, causando cambios estructurales o daños funcionales. La membrana incluye muchas proteínas que contienen azufre, que podrían ser los sitios preferenciales para la unión de las partículas de Ag debido a la afinidad de la Ag con el azufre. Los iones plata también se unen a las proteínas de transporte, provocando la fuga de protones, e induciendo el colapso de la fuerza motriz de protones (Dibrov y col., 2002; Holt y Bard, 2005; Lok y col., 2006). Asimismo, la plata inhibe la absorción de fosfato y causa la salida del fosfato intracelular (Schreurs y Rosenberg, 1982).

- Daños en el ADN y en la respiración celular. La Ag es un aglutinante fuerte de ácidos nucleicos, y puede formar complejos con el ADN y ARN. Tal formación de complejos puede conducir a la condensación del ADN y pérdida de la capacidad de replicación. Además, se ha reportado que Ag^+ aumenta las frecuencias de mutación del ADN durante la reacción en cadena de la polimerasa (Yang y col., 2009). La actividad de enzimas respiratorias también puede inactivarse debido a la unión de la Ag con los grupos tiol en dichas proteínas, causando el desacoplamiento de la respiración de la síntesis de ATP.
- Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO): La plata puede catalizar reacciones con el oxígeno que conducen a un exceso de producción de radicales libres, en particular, las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Cui y col., 2013).

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son subproductos naturales del metabolismo de los organismos que respiran. Los niveles pequeños pueden ser controlados por las defensas antioxidantes de las células tales como la proporción glutatión/glutatión disulfuro (GSH/GSSG). Sin embargo, el exceso de producción de ERO puede producir estrés oxidativo (Nel y col., 2006). La generación adicional de radicales libres puede atacar a los lípidos de membrana y conducir a una ruptura de la membrana, alterar la función mitocondrial o causar daños en el ADN (Mendis y col., 2005).

Estudios realizados en células eucariotas sugieren que las nanopartículas de plata inhiben la defensa antioxidante mediante la interacción directa con GSH, uniéndose a GSH reductasa u otra enzima de mantenimiento de GSH (Carlson y col.,

2008). Esto podría disminuir la relación GSH/GSSG y, posteriormente, aumentar ERO en la célula. Los iones de plata pueden ser responsables de la generación de ERO por servir como aceptores de electrones. En las células bacterianas, los iones de plata inducirían la generación de ERO al alterar las enzimas de la cadena respiratoria a través de interacciones directas con los grupos tiol de estas enzimas o de las enzimas eliminadoras de radicales superóxido tales como las superóxido dismutasas (Park y col., 2009). La generación de ERO a partir de iones plata y nanopartículas de plata también puede ser inducida fotocatalíticamente, sin embargo, no se han reportado correlaciones entre toxicidad bacteriana y concentración de ERO fotocatalíticas (Choi y Hu, 2008).



1.4.4 INTERPRETACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA RESISTENCIA FOTOQUÍMICA Y LA VULNERABILIDAD FOTOCATALÍTICA DE LOS ESPOROS

Los endosporos bacterianos generalmente son resistentes a la radiación UV, incluso a longitudes de onda corta de alta energía, tales como la radiación UV-B y UV-C (Moeller y col., 2005). La extremadamente alta resistencia de esporos a la inactivación fotoquímica puramente por UV-A ha sido explicada considerando varias de sus características distintivas, estrechamente relacionadas con su composición química, morfología y estructura (Atrih y Foster, 2002).

Por otro lado, la vulnerabilidad de esporos al ataque fotocatalítico puede explicarse teniendo en cuenta las características del proceso fotocatalítico junto con la estructura del espora. En términos generales, los procesos fotocatalíticos se basan en la acción de compuestos intermediarios altamente oxidantes, de corta duración, que se generan cuando un semiconductor (por ejemplo, TiO_2) es activado por la radiación ultravioleta. En particular, radicales $\cdot\text{OH}$ son altamente reactivos ya que son capaces de capturar electrones fácilmente provenientes de compuestos orgánicos, provocando su oxidación. Desde esta perspectiva, la pérdida de viabilidad de esporos por la fotocatálisis podría explicarse por un complejo mecanismo que comienza cuando se degrada su cubierta (coat) protectora externa, principalmente por el ataque oxidativo combinado de radicales $\cdot\text{OH}$ y "huecos" positivos (h^+) cerca la superficie del catalizador. Aunque la degradación de la cubierta exterior del espora no es necesariamente mortal, ya que todavía mantiene su capacidad de germinar, una vez que se elimina la cubierta protectora, en la medida de dejar que

los radicales libres alcancen el protoplasto y su membrana, entonces es muy probable que ocurran eventos letales (Fujishima y col., 2000). Lin y Li (2003) informaron que el tiempo para inactivar el 90% de *B. subtilis* sobre TiO₂ irradiada con 0,74 mW cm⁻² fue 2,15 h. Zhao y col. (2009) indicaron también que la inactivación de esporos a baja radiación UV-A (3 mW cm⁻²) fue debido principalmente a la fotocátalisis, y el coeficiente de inactivación con TiO₂ bajo irradiación UV-A fue tres veces la tasa de UV-A solo. Encontró que la tasa de inactivación fotocatalítica fue no lineal con respecto a la radiación UV-A, exhibiendo un máximo de 3 mW cm⁻².

Por otro lado, una forma eficaz de mejorar la cinética de la fotocátalisis es la adición de metales de transición al TiO₂. La introducción de los iones metálicos en especial plata (Ag) en la red cristalina de TiO₂ ha mostrado una mejora significativa en la actividad fotocatalítica de TiO₂ para la degradación de diferentes microorganismos (Marambio-Jones y Hoek, 2010).

Aunque existe una amplia bibliografía sobre el uso de TiO₂ dopado con Ag para la degradación fotocatalítica de microorganismos en fase acuosa (Guin y col., 2007; Skorb y col., 2008; Akhavan, 2009; van Grieken y col., 2009; Lin y col., 2010; Shanga y col., 2010; Wu y col., 2010; Ashkarran y col., 2011; Sontakke y col., 2011; Hou y col., 2012; Bokarea y col., 2013), su aplicación para la desinfección fotocatalítica en fase gaseosa no se ha estudiado extensamente (Vohra y col., 2005; Yoon y col., 2008; Zhao y col., 2010).

Los iones Ag⁺ dopados actúan como una trampa de electrones en el proceso de fotocátalisis. Esto reduce la recombinación entre electrones y huecos, y por lo tanto

resulta en un aumento de la disponibilidad de los huecos. El efecto sinérgico de los iones Ag^+ dopados, y radicales altamente oxidantes generados por el proceso de fotocatalisis de TiO_2 , puede dar lugar a una velocidad mejorada de la destrucción microbiana (Vohra y col., 2005). En este sentido, Vohra y col. (2005) informaron que el 99% de los esporos de *B. cereus* expuestos a 50 mW cm^{-2} de UV-A sobre TiO_2 durante 24 h fue inactivado, y 100% de los esporos de *B. cereus* expuestos a 50 mW cm^{-2} de UV-A dopado con Ag fue inactivado durante 4 h. Asimismo, Yoon y col. (2008) estudiaron el efecto antimicrobiano de las partículas de Ag depositadas sobre un filtro de fibra de cabón activado (FCA). La inhibición de *B. subtilis* se llevó a cabo en aproximadamente 10 min. Comparativamente, *E. coli* fue completamente inhibida después de 60 minutos. Le y col. (2011) estudiaron la eliminación fotocatalítica de *Bacillus atrophaeus* bajo diferentes temperaturas de calcinación, diferentes velocidades de revestimiento por inmersión, y proporciones de TiO_2 , SiO_2 , y Ag para identificar las condiciones óptimas para la desinfección de superficies. Se encontró que las condiciones óptimas para las muestras de un TiO_2/Ag son $250 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura de calcinación y una velocidad de recubrimiento por inmersión de $2,25 \text{ mm s}^{-1}$. Obtuvieron una disminución de 6 órdenes de magnitud en 30 minutos para el microorganismo en estudio.

1.4.5 PRINCIPAL AGENTE OXIDANTE

Hay una amplia gama de hipótesis en la literatura sobre cuáles especies son responsables de la degradación de los microorganismos en los procesos fotocatalíticos, desarrollados para la desinfección en agua (Horie y col., 1998; Blake y col., 1999; Maness y col., 1999) y en aire (Pal y col., 2005; Vohra y col., 2005). Aunque todos los autores coinciden en que el principal oxidante es el radical $\cdot\text{OH}$, muy pocos identifican cuál es el responsable de la inactivación de los microorganismos. Tanto Sun y col. (2003) como Cho y col. (2005) trabajaron con *Escherichia coli* en desinfección de agua, y ellos destacan explícitamente las especie h^+ y $\cdot\text{OH}$ como los responsables de la inactivación de este microorganismo.

1.5 OBJETIVOS DE LA TESIS

La presente Tesis doctoral se centra en la aplicación de la fotocatalisis heterogénea para la eliminación de microorganismos presentes en el aire, los cuales causan diversas enfermedades y problemas socioeconómicos. Específicamente, se estudió la aplicación de radiación UV-A y dióxido de titanio soportado para inactivar esporos de *Bacillus subtilis*, siendo estas estructuras biológicas las más resistentes para su eliminación. A grandes rasgos, los aportes de la tesis tratan sobre los siguientes aspectos:

- **DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.** Se diseñó y construyó un dispositivo experimental que simula la situación real de irradiar esporos que se encuentran secos en la atmósfera, o depositados sobre alguna superficie. El mismo proporciona una zona de iluminación uniforme para la inactivación fotocatalítica, posee un compartimento que mantiene las muestras aisladas de la contaminación ambiental propia del lugar donde se realizan los ensayos experimentales, y mantiene constantes la temperatura y la humedad relativa, siendo esta última una variable esencial para una actividad fotocatalítica constante en el tiempo.

- **ESTUDIO CINÉTICO.** A partir de un modelo simplificado se obtuvo un esquema cinético de la inactivación fotocatalítica de esporos de *Bacillus subtilis*, empleando dióxido de titanio soportado sobre placas de vidrio, y validando dicho esquema con ensayos experimentales.

- **ESTUDIO DE EFICIENCIA DE DIFERENTES TÉCNICAS DE SÍNTESIS DE DIÓXIDO DE TITANIO.** Se estudiaron y compararon diferentes recubrimientos de TiO₂, utilizando catalizadores sintetizados en el laboratorio, y catalizadores comerciales. Se calcularon eficiencias fotocatalíticas que tienen en cuenta la radiación incidente y la radiación absorbida sobre la superficie del catalizador.

- **APLICACIÓN DE FOTOCATALIZADORES DOPADOS.** Para la obtención de una mayor velocidad de inactivación, se estudió la utilización de fotocatalizadores de TiO₂ dopados con plata, la cual posee una reconocida actividad antibacteriana.

CAPÍTULO 2

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

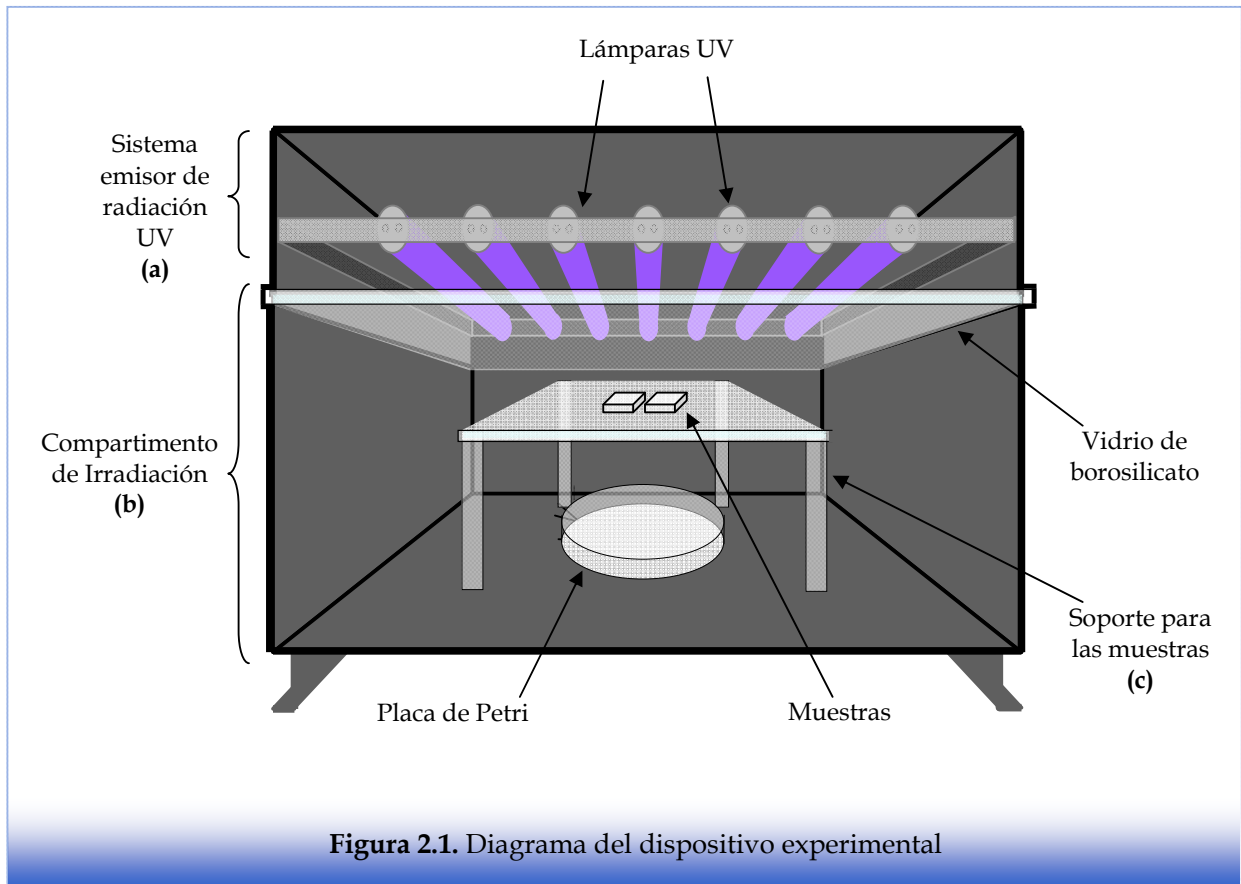
En este capítulo se describe el dispositivo experimental, diseñado y construido para estudiar la inactivación fotocatalítica de esporos secos de Bacillus subtilis dispersos sobre películas de TiO₂ e irradiados con diferentes niveles de radiación UV-A (2,44-0,29 mW cm⁻²). Dicho dispositivo simula la situación real de irradiar esporos que se encuentran secos en la atmósfera, o depositados sobre alguna superficie.

También se detalla la metodología para la inmovilización del catalizador sobre las placas de vidrio por la técnica de “dip-coating”.

Además, se describe la técnica utilizada para la obtención de la suspensión de esporos de Bacillus subtilis, el procedimiento empleado para irradiar las muestras de esporos, y la técnica de recuento de los esporos viables luego de haber sido irradiados.

2.1. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El reactor fotocatalítico empleado en esta Tesis se esquematiza en la **Figura 2.1**. Este se compone de un sistema de emisión de radiación UV, un compartimento de irradiación y un soporte para sostener placas de vidrio de borosilicato con las muestras de esporos mientras son irradiados. Además, se muestra una imagen de la vista superior de dicho dispositivo (**Fig. 2.2**).



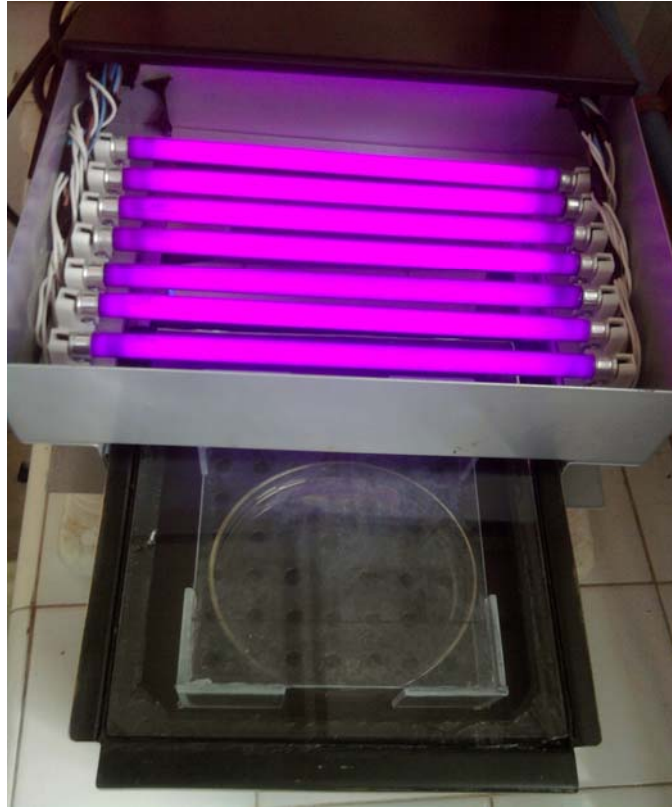


Figura 2.2. Fotografía de la vista superior del dispositivo experimental

Se detallan a continuación los elementos constitutivos más relevantes del dispositivo experimental:

SISTEMA DE EMISIÓN DE RADIACIÓN UV (Fig. 2.1 a): consiste en una estructura metálica que posee en la parte superior siete lámparas fluorescentes tubulares de vapor de mercurio a baja presión, tipo luz negra (Philips TL 4W/08 F4 T5/BLB), ubicadas en forma paralela y horizontal. El cuerpo de este tipo de lámparas está formado por un tubo de vidrio de color azul oscuro, permeable a la radiación UV de onda larga, pero opaco a la radiación visible. La energía proveniente de la

descarga eléctrica de los electrodos ubicados en los extremos de la lámpara es convertida en radiación UV en una capa de material fluorescente, la cual está inmovilizada sobre las paredes internas del tubo. La longitud de onda de emisión de esta clase de lámparas parte desde 300 nm y llega hasta 420 nm, presentando una emisión máxima a 350 nm. El espectro de emisión de las lámparas se muestra en la **Figura 2.3**. Cada lámpara está separada entre sí por una distancia de 1,2 cm y se encuentran a una distancia de 4,65 cm del soporte donde se colocan las muestras de esporos. Se construyó además un tablero eléctrico donde se colocaron las reactancias, los arrancadores y los interruptores de cada lámpara.

COMPARTIMENTO DE IRRADIACIÓN (Fig. 2.1 b): consiste en una caja rectangular metálica con una placa de vidrio de borosilicato extraíble deslizante. Para simplificar el modelo de radiación y minimizar la reflexión, las paredes internas de este compartimento fueron cubiertas con pintura negra opaca. La radiación UV generada por el sistema de emisión entra a éste compartimento a través de la cubierta de vidrio, que también impide la contaminación de las muestras de esporos durante la irradiación. A fin de asegurar una atmósfera con alta humedad relativa, necesaria para obtener una actividad fotocatalítica de TiO_2 sostenible en el tiempo, se incluyó una placa de Petri conteniendo agua destilada estéril en el compartimento de irradiación. Durante todas las corridas experimentales, la temperatura y la humedad relativa dentro del compartimento de irradiación se midieron con un termohigrómetro (Mannix PTH8708 termo higrómetro TH Pen). Aunque el reactor fotocatalítico diseñado no tiene un control automático de humedad y temperatura, ambas condiciones permanecieron aproximadamente constantes durante los ensayos

experimentales (Tabla 2.1). Este compartimento, previo a cada ensayo de inactivación, se esterilizó en estufa durante 2 horas a 160 °C.

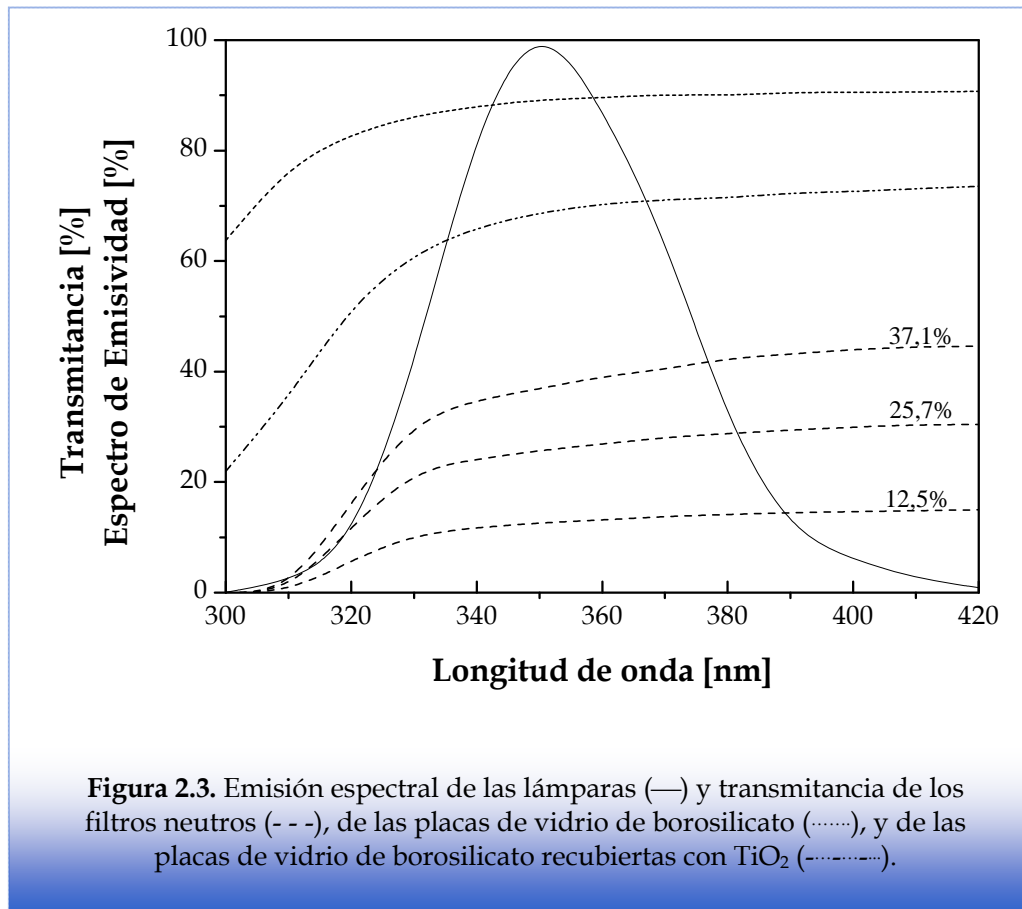
Tabla 2.1. Temperatura y humedad dentro del compartimento de irradiación.

Tiempo [h]	Esporos irradiados sin TiO ₂ (2,44 mW cm ⁻²)		Esporos irradiados con TiO ₂ (2,44 mW cm ⁻²)	
	Temperatura [°C]	Humedad [%]	Temperatura [°C]	Humedad [%]
	6	29,7	78,7	32,5
12	30,8	72,3	34,2	78,9
24	29,8	70,1	31,3	82,7
36	33,7	77,5	32,4	78,8
48	31,5	78,6	33,6	81,0

SOPORTE PARA LAS MUESTRAS (Fig. 2.1 c): las placas fotocatalíticas con las muestras de esporos se ubicaron horizontalmente en la zona central del compartimento de irradiación, donde el flujo de radiación fue casi uniforme, sobre un soporte de vidrio de 15 cm de largo, 4,5 cm de alto y 9 cm de ancho. Las muestras, apoyadas sobre el soporte, se encontraban a 4,65 cm de distancia de las lámparas UV. Este soporte, previo a cada ensayo de inactivación, se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

FILTROS ÓPTICOS: se utilizaron filtros ópticos para obtener diferentes magnitudes del flujo de radiación, los cuales se colocaron sobre el vidrio de borosilicato del compartimento de inactivación. Para tal fin, se utilizaron láminas de base de poliéster de 0,1 mm de espesor, transparentes a la radiación UV-A, las cuales fueron impresas con diferentes tonalidades de gris generadas mediante el programa

de diseño gráfico Corel Draw. Estos filtros fueron diseñados de tal forma de proporcionar una transmitancia efectiva de 37,1 %, 25,7%, y 12,5%, los cuales corresponden a una radiación incidente de 0,90, 0,63 y 0,29 mW cm⁻², respectivamente. Las características ópticas de estos filtros neutros se muestran en la **Figura 2.3**.



2.2. ACONDICIONAMIENTO DE LAS PLACAS FOTOCATALÍTICAS

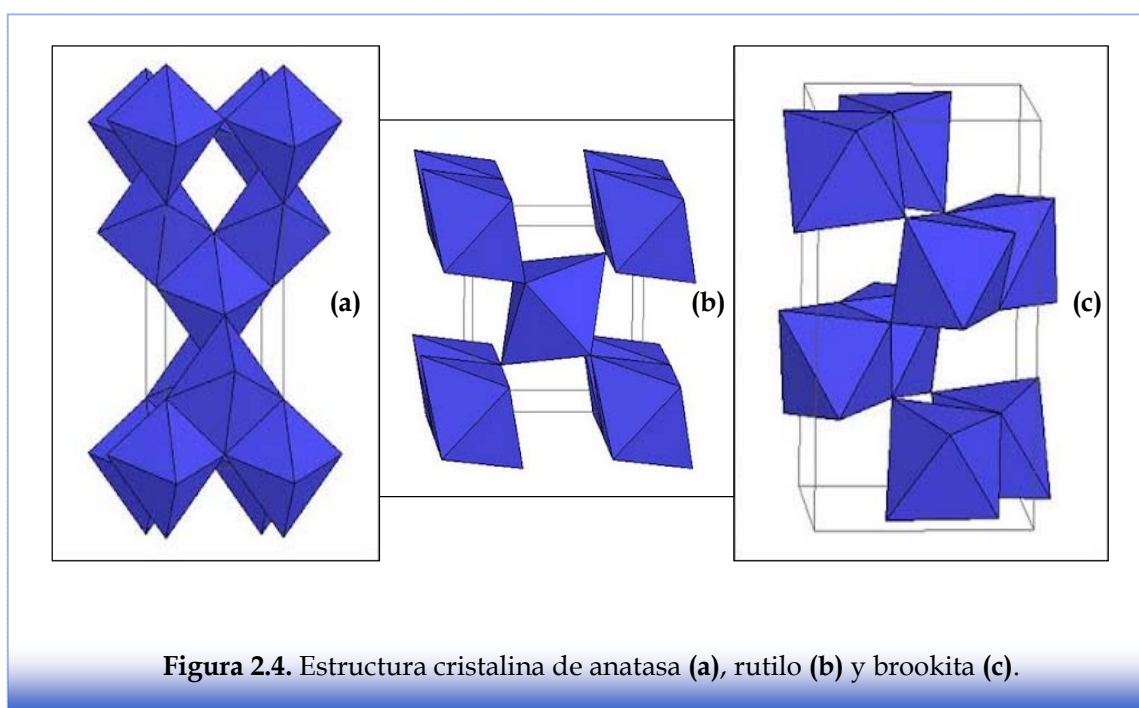
Las placas fotocatalíticas utilizadas fueron fragmentos de vidrio de borosilicato de 2 cm × 2 cm. Previo a la inmovilización de TiO₂, las placas de vidrio fueron lavadas con una solución que contenía 20 g de hidróxido de potasio, 250 mL de alcohol isopropílico y 250 mL de agua ultrapura. Las placas se mantuvieron en contacto con la solución de lavado por 24 horas y luego 2 h bajo ultrasonido (equipo Ultrasonik 300). Posteriormente, fueron calentadas durante 8 h a 500 °C para eliminar cualquier rastro de material orgánico que aún pudiera quedar en la superficie.

La elección del vidrio de borosilicato como soporte se debió a su alta transmitancia en la región UV-A del espectro de emisión de las lámparas (**Fig. 2.3**). Además, este tipo de vidrio tolera altas temperaturas, mayores a los 500 °C, propiedad necesaria para realizar el recubrimiento con el catalizador de TiO₂.

2.3. OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS DE TiO₂

El TiO₂ puede presentarse como fase amorfa, o como fase cristalina anatasa, rutilo y broquita (**Fig. 2.4**), siendo la fase rutilo la más estable a temperatura ambiente. En las tres formas, los átomos de titanio (Ti⁴⁺) están coordinados a seis átomos de oxígeno (O²⁻), formando TiO₆ octaédricos. La anatasa se compone de vértices de intercambio octaédricos que forma planos (0 0 1) (**Fig. 2.4a**) que resulta en una estructura tetragonal. En el rutilo el octaedro comparte bordes en planos (0 0 1) para dar una estructura tetragonal (**Fig. 2.4b**), y en brookita tanto los bordes como las esquinas son compartidos para dar una estructura ortorrómbica (**Fig. 2.4c**). Para

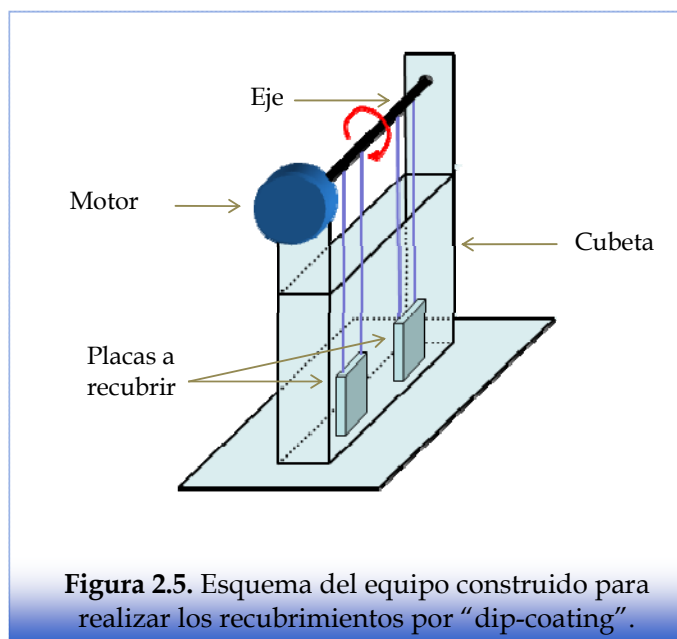
reacciones fotocatalíticas, la fase que presenta mayor reactividad es la anatasa. La formación de estas fases depende del material depositado, el método de deposición y la temperatura de calcinación. En particular, las películas de TiO_2 pueden transformarse de amorfo a anatasa y de anatasa a rutilo por calcinación. Las propiedades de la película están relacionadas con la fase cristalina, el tamaño del cristal, y la densidad de la misma.



En la presente Tesis, las películas de TiO_2 depositadas sobre las placas de vidrio de borosilicato fueron realizadas mediante la técnica de “dip-coating”. Este método consiste básicamente en sumergir la pieza a recubrir en la solución que contiene el catalizador sintetizado, y luego retirarla a una velocidad controlada. Se emplearon

diversos procedimientos para obtener la solución con el catalizador, pero en todos los casos se utilizó el “dip-coating” para recubrir las placas. Esta técnica se seleccionó debido a su mayor simplicidad en comparación con otras técnicas más difundidas para realizar recubrimientos superficiales, como “spin-coating”, “spray-gel”, o electroforesis, entre otros.

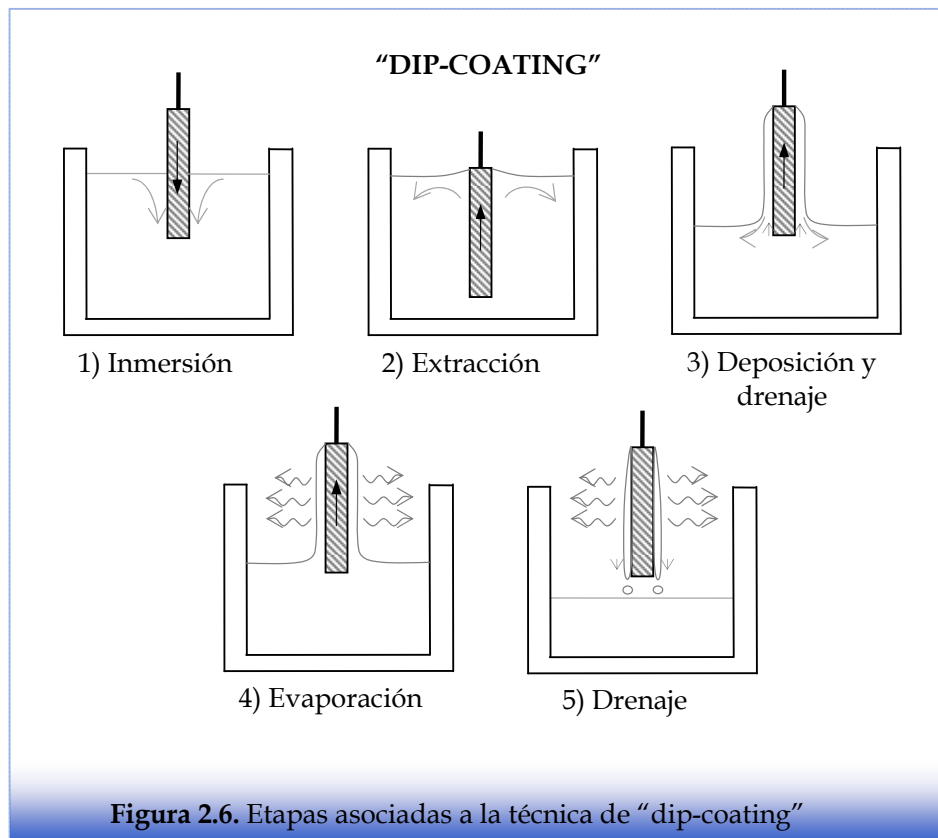
Con este fin, se construyó una cubeta de vidrio con un eje en la parte superior accionado con un motor de bajas rpm (**Fig. 2.5**). En el eje se enrolla un hilo que sujeta las placas fotocatalíticas. Esto permite lograr una velocidad baja y uniforme de remoción de la pieza a recubrir.



En la **Figura 2.6** se muestran las etapas involucradas en la obtención de los recubrimientos por la técnica de “dip-coating”. El primer paso consiste en sumergir

la placa a recubrir (paso 1), luego de un determinado tiempo se extrae a una velocidad determinada (paso 2), y comienza el proceso de deposición y drenaje (paso 3). Casi en forma simultánea a la extracción de la placa se inicia el proceso de evaporación (paso 4), y por último, una vez extraída la pieza recubierta, continúan ambos procesos, evaporación y drenaje (paso 5).

Las propiedades de las películas obtenidas están condicionadas por el proceso físico empleado, la estructura del precursor y las condiciones de deposición. Durante el proceso físico intervienen las fuerzas de arrastre viscoso, las fuerzas inerciales de la capa límite, la velocidad de evaporación, los gradientes de tensión superficial y la fuerza de gravedad.



En este trabajo, todas las películas de TiO₂ fueron depositadas por la técnica de “dip-coating” con una velocidad de retirada de 3 cm min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C). Las placas fueron luego secadas en estufa y finalmente calcinadas para aumentar la adherencia del recubrimiento y para inducir la formación de la fase anatasa. Las temperaturas utilizadas en la etapa de secado y calcinación variaron según el catalizador estudiado en cada caso (ver **Capítulos 3, 4 y 5**).

2.4. ESPOROS DE *Bacillus subtilis*

2.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE

El género *Bacillus* comprende bacilos Gram positivos (+), aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positivos, quimioheterótrofos, móviles con flagelos (perítricos) que se caracterizan por la capacidad de formar endosporas. Además, todos presentan forma de bastón, y sus medidas varían entre de 1-2,7 µm de largo por 0,3-2,2 µm de ancho. Las especies presentan gran heterogeneidad metabólica y nutricional. Son contaminantes de naturaleza ubicua, y habitan en el suelo, agua y polvo de aire. Además, algunas especies pueden ser parte de la flora normal del hombre y los animales (Logan y De Vos, 2009).

Dentro del género *Bacillus*, se encuentran especies de gran importancia en distintas áreas, como *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*. Por ejemplo, a nivel industrial, son relevantes en la producción de antibióticos, o proteínas tóxicas para insectos, entre otras aplicaciones. También son importantes en el área de la salud, ya que algunas especies pueden generar enfermedades de transmisión

alimentaria, y además producen enfermedades tanto en los animales como en las plantas o en el hombre.

Como se mencionó previamente, dentro de este género, se encuentra la especie *Bacillus subtilis*, la cual se considera la especie tipo del género, y se ha adoptado extensamente como un microorganismo modelo para estudios de laboratorio. *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, Catalasa-positiva, aerobia, comúnmente encontrada en el suelo. Tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas.

B. subtilis no es considerado patógeno humano. Puede contaminar los alimentos pero raramente causa intoxicación alimenticia. Sus esporos pueden sobrevivir el calentamiento extremo, que a menudo es usado para cocinar el alimento, y es responsable de causar la fibrosidad en el pan deteriorado.

Se ha visto que *B. subtilis* es muy manejable para la manipulación genética, y ha sido, por lo tanto, extensamente adoptado como un organismo modelo para estudios de laboratorio, sobre todo de esporulación, que es un ejemplo simplificado de la diferenciación celular. Como un organismo modelo de laboratorio *B. subtilis* a menudo es usado como el equivalente Gram positivo de *Escherichia coli*, un bacilo Gram negativo ampliamente estudiado.

2.4.2. COSECHA DE ESPOROS

Por los motivos expuestos en la sección anterior, en este trabajo de Tesis se adoptaron como microorganismos modelo los esporos de *Bacillus subtilis* (cepa ATCC 6633).

Primeramente, la cepa mencionada fue sometida a pruebas bioquímicas de identificación. Las pruebas realizadas y los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla 2.2.**

Tabla 2.2. Pruebas bioquímicas de identificación.

Prueba	Resultado
Catalasa	⊕
Citrato	⊕
Crecimiento en NaCl 7% (>72 h)	⊕
Hidrólisis del Almidón (>24 h)	⊕
Proteinasas (>24 h)	⊕
ANS	⊕
Reacción de Voges - Proskauer (>24 h)	⊕ (pH=5,5)
Reacción de Voges - Proskauer (>72 h)	⊕ (pH=6,0)

Para la obtención de suspensiones de esporos en agua destilada se utilizó la técnica propuesta por Shehata y Collins (1972). Para la inoculación del microorganismo se empleó una botella Roux. Este tipo de botella tiene una forma específica (**Fig. 2.7**) que proporciona una elevada superficie de contacto entre el medio de cultivo y el oxígeno disponible, lo que permite obtener altas concentraciones del microorganismo inoculado. A esta botella se le agrega el medio

de cultivo y se la utiliza en forma horizontal, con tapón de algodón para permitir el ingreso de aire a la misma.



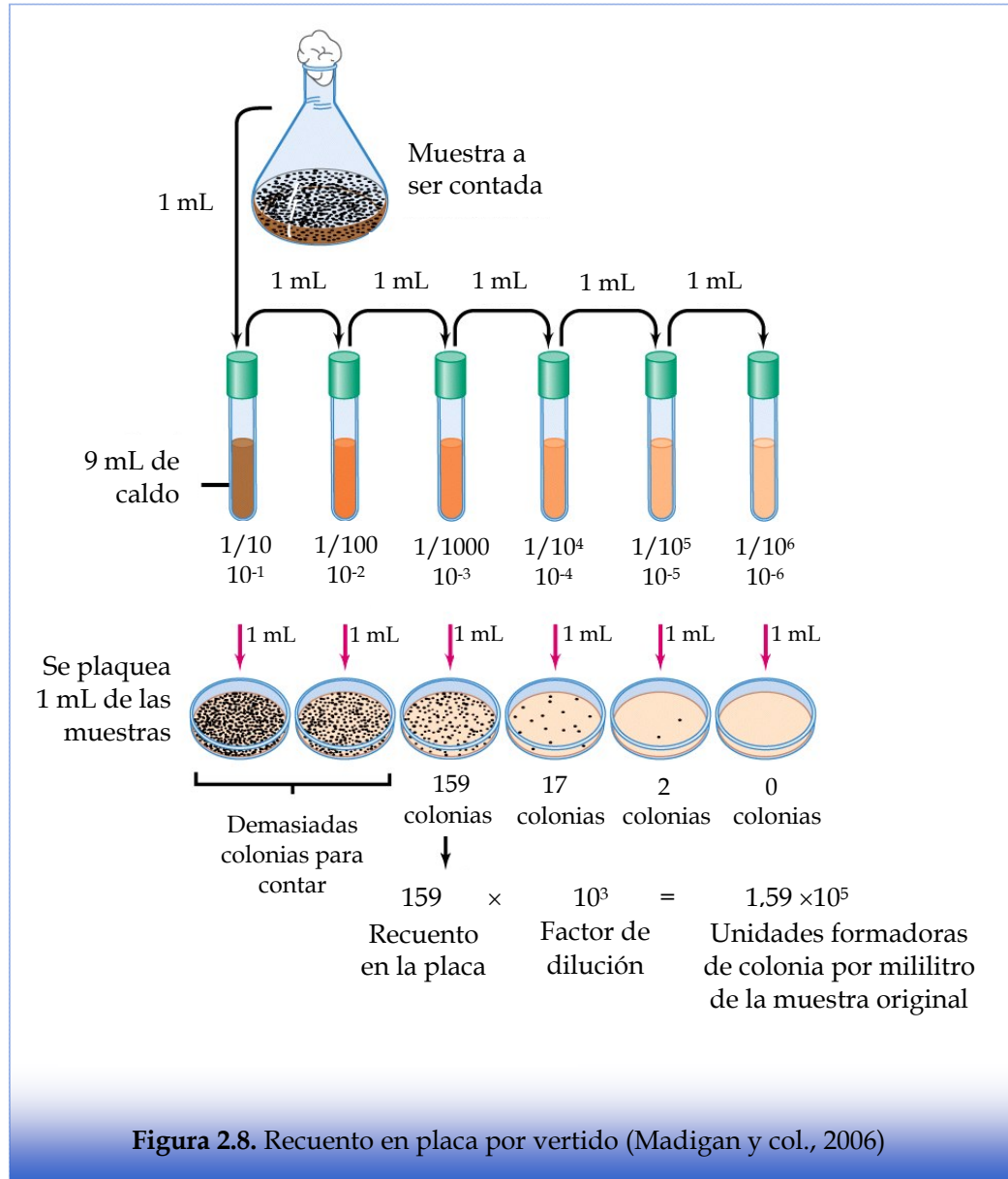
Figura 2.7. Botella Roux

El medio de esporulación utilizado consistió en agar nutritivo (laboratorios Merck) con 0,05% $MnSO_4$ y 0,05% $MgSO_4$. Tanto el $MnSO_4$ como el $MgSO_4$ generan en el medio de cultivo un ambiente adverso para el crecimiento del microorganismo, por lo que se espera obtener esporos de *B. subtilis*. 200 mL del mencionado medio de cultivo, previamente esterilizado en autoclave 15 minutos a 121 °C, se agregaron a la botella. Luego, la misma se colocó en forma horizontal para que el medio solidifique, y por último se inoculó con 5 mL de un repique de células vegetativas de *B. subtilis* en Caldo Nutritivo incubado 24 h a 30 °C. La botella fue incubada a 30 °C durante un período de 10 días. A continuación, los esporos y células vegetativas obtenidas fueron recuperados por lavado de la superficie del medio de esporulación con

solución fisiológica. Después de esto, los esporos recuperados se centrifugaron tres veces durante 15 minutos a 3500 rpm con la misma solución. La suspensión se mantuvo a 30 °C durante 48-72 h para inducir la lisis de las células vegetativas. A continuación, las células vegetativas y los esporos fueron lavados nuevamente conforme a las instrucciones descritas anteriormente. Este método se repitió tres veces para lavar las células. La suspensión de esporos fue suspendida en agua destilada estéril y conservada a 4 °C durante 2 meses.

A fin de conocer la concentración de esporos obtenidos en la cosecha, se le realizó un recuento en placa. Para ello, se tomó una alícuota de la suspensión de esporos y se la sometió a un choque térmico (80 °C durante 10 minutos). Este procedimiento se realiza para eliminar cualquier célula vegetativa que pudiera estar presente en la muestra. Seguidamente, se realizó un recuento en placa por vertido (**Fig 2.8**). A continuación se detalla brevemente la técnica mencionada.

A la muestra original se le realizan primeramente diluciones seriadas para reducir la población microbiana, suficiente como para obtener colonias separadas cuando se placa (**Fig 2.8**). Luego, 1 mL de las muestras diluidas se vuelca en placas de cultivo estériles junto con agar fundido a ebullición y luego enfriado a aproximadamente 45 °C. Después de que el agar ha solidificado, cada célula se fija en su lugar y forma una colonia individual. Las placas que contengan entre 30 y 300 colonias serán contadas. El número total de colonias es igual al número de microorganismos viables en la muestra diluida.



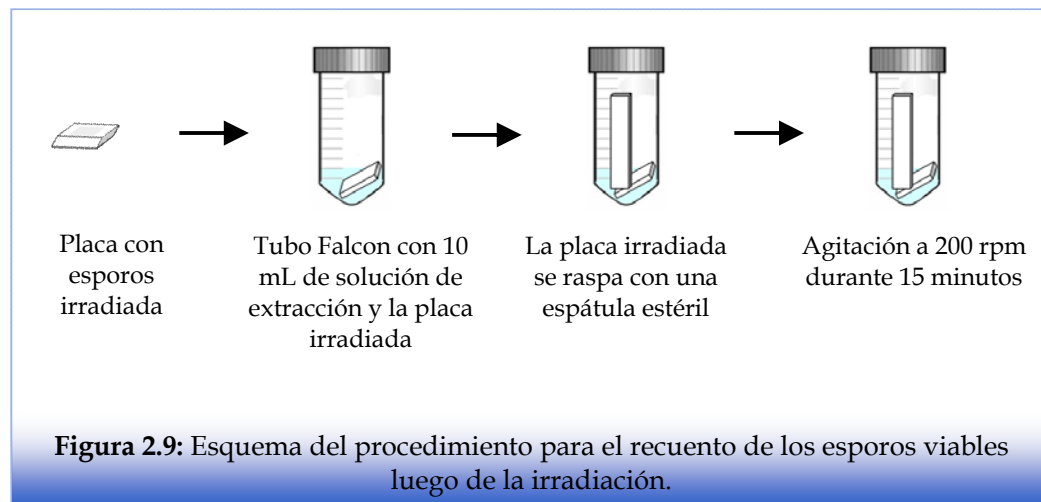
2.4.3. IRRADIACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESPOROS

Antes de iniciar los experimentos de irradiación, alícuotas de 1 mL de la suspensión de esporos fueron mantenidos a 80 °C durante 10 minutos (choque térmico) para eliminar las células vegetativas remanentes. Después de esto, alícuotas de 10 µL de la suspensión de esporos se esparcieron para cubrir una superficie de 1,5 cm × 1,5 cm tanto en placas de vidrio recubierta con películas de TiO₂ como en placas de vidrio sin catalizador. Después, las placas se mantuvieron a 30 °C durante un período de 1 hora a fin de secar las muestras de esporos. A continuación, las placas secas se introdujeron en el compartimento de irradiación, en el cual fueron expuestas a un nivel determinado de irradiación durante diferentes tiempos. Una vez transcurrido el tiempo de irradiación programado para cada muestra, se retiraron las correspondientes placas de vidrio y se contaron los esporos viables restantes.

2.4.4. RECUENTO DE LOS ESPOROS VIABLES

El recuento de esporos viables en placas recubiertas de TiO₂ y sin catalizador fue realizado de acuerdo a la siguiente técnica (**Fig. 2.9**). En primer lugar, se colocó una placa con la muestra de esporos en un tubo Falcon con 10 mL de solución de extracción estéril (0,1% de peptona en agua destilada estéril). A continuación, la muestra de esporos fue raspada suavemente usando una pequeña espátula estéril para separar las esporas de la superficie de la placa. Realizando esta metodología de raspado, se logró separar de la placa de vidrio tanto la muestra de esporos como el catalizador depositado sobre la misma. El tubo Falcon que contiene la placa de vidrio, la espátula y la solución de extracción fueron agitados a 200 rpm durante 15

minutos. Alícuotas de 1 mL de la suspensión resultante se vertieron en las placas de Petri para realizar el recuento en placa por vertido. Luego las placas fueron incubadas durante 48 horas a 30 °C y, por último, se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC). Cuando fue necesario, las soluciones de extracción fueron convenientemente diluidas con una solución de peptona 0,1% antes del paso de cuantificación para obtener 30 a 300 UFC por placa. Las pruebas se repitieron dos veces para cada condición experimental estudiada, y cada repetición se hizo por duplicado. En experimentos preliminares, se evaluó la eficiencia de lavado para la recuperación de esporos y el valor obtenido fue superior al 90%.



CAPÍTULO 3

ESTUDIO CINÉTICO

En este capítulo se muestran los resultados experimentales de la inactivación fotocatalítica de esporos de Bacillus subtilis dispersos sobre películas de TiO₂ e irradiados con diferentes niveles de radiación UV-A (2,44-0,29 mW cm⁻²).

Además, se propone un esquema de reacción simplificado para la inactivación fotocatalítica de esporos de Bacillus subtilis. A partir del esquema propuesto, se derivó en una expresión cinética para la inactivación fotocatalítica de esporos, la cual muestra una dependencia explícita con la absorción de radiación. Los parámetros cinéticos del modelo fueron estimados a partir de datos experimentales mediante el empleo de un algoritmo de optimización.

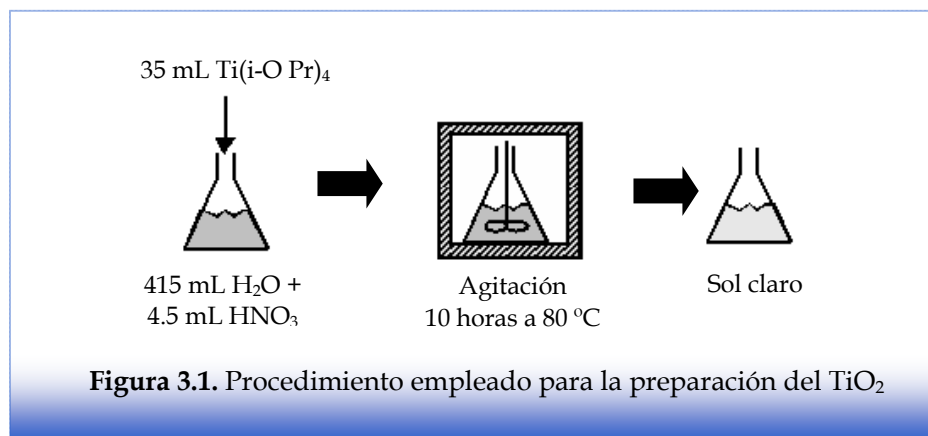
Finalmente, se comparan los datos experimentales con los resultados del modelo.

3.1. SÍNTESIS DEL CATALIZADOR DE TiO₂

Para la obtención del catalizador de TiO₂ se llevó a cabo una síntesis bajo la técnica Sol-Gel. En términos generales, esta técnica consiste en generar una suspensión de partículas, en este caso de TiO₂, de tamaño controlado a partir de reacciones de hidrólisis/condensación de sales, alcóxidos u organometálicos, para luego inmovilizarlos en la superficie a recubrir. Mediante esta técnica es posible obtener películas delgadas y de espesor muy uniforme. Permite además ejercer un elevado control de la pureza de los reactivos, del grado de homogeneidad de la mezcla de precursores, y de la microestructura de los recubrimientos (uniformidad y distribución de tamaños de partículas). Además, se requiere equipamiento simple y económico, y posibilita la preparación de recubrimientos a temperaturas bajas.

La secuencia de reacciones que tienen lugar a partir de alcóxidos comienza por la hidrólisis de los mismos. Estas reacciones pueden continuar hasta eliminarse completamente los grupos alcóxido. Posteriormente, o de forma simultánea con las reacciones de hidrólisis, pueden producirse reacciones de condensación, las cuales pueden dar lugar a la formación de cadenas. También pueden producirse reacciones de condensación entre alcóxidos no hidrolizados. En el caso de los alcóxidos de titanio, las reacciones de hidrólisis son muy rápidas, mucho más que las de condensación y se producen en condiciones descontroladas, formando grandes aglomerados con grupos alcóxidos sin hidrolizar en zonas donde no puede acceder el agua. Si se mantiene esta suspensión en las condiciones apropiadas, se pueden disgregar los aglomerados para obtener un sol estable.

Para la obtención de los resultados expuestos en este capítulo, el catalizador de TiO_2 se obtuvo a través de una técnica de Sol-Gel que usa tetraisopropóxido de titanio como precursor (Yamazaki-Nishida y col., 1993). La hidrólisis del tetraisopropóxido de titanio se llevó a cabo en medio acuoso y pH ácido. Para esto, un volumen de 415 mL de agua ultrapura fue mezclado con 4,5 mL de ácido nítrico concentrado (Anedra, 65%), y luego 35 mL de isopropóxido de titanio (Aldrich, 97%) fueron añadidos a esta mezcla. Bajo tales condiciones, la hidrólisis del precursor procedió enérgicamente, de forma descontrolada y vigorosa, produciendo grandes trozos de TiO_2 hidratado. La dispersión de las partículas formadas se logró agitando la suspensión durante un período de 10 h a $80\text{ }^\circ\text{C}$, hasta que se obtuvo un sol claro de nano-partículas de TiO_2 . En la **Figura 3.1** se representa en forma esquemática el procedimiento empleado.

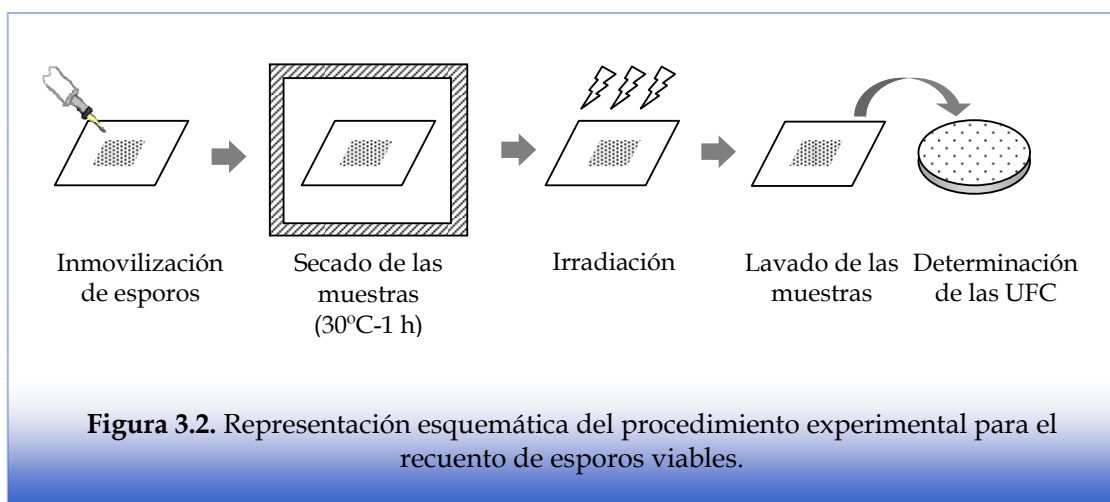


Luego de realizar el recubrimiento de las placas de vidrio mediante la técnica de “dip coating”, las mismas fueron secadas en estufa a $80\text{ }^\circ\text{C}$ y finalmente

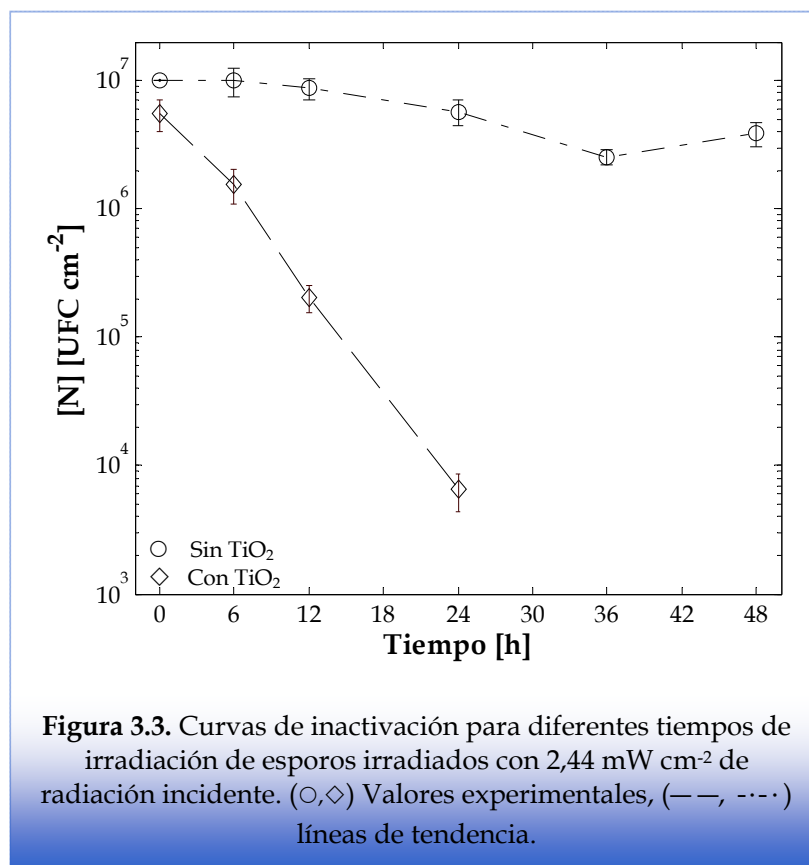
calentadas a 200 °C durante 6 horas para aumentar la adherencia del recubrimiento y para inducir a la formación de la fase anatasa.

3.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación se muestran los resultados de la inactivación fotocatalítica de esporos *B. subtilis*, la cual se evaluó al irradiar los esporos secos en contacto con TiO₂, y de la inactivación fotoquímica, la cual se determinó al irradiar los esporos secos sobre vidrio sin recubrir (en ausencia de TiO₂). Para estos ensayos se utilizó el dispositivo experimental descrito en el **Capítulo 2**. Los esporos que permanecieron viables después de la irradiación se expresan como [N], que representa las unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado (UFC cm⁻²) (**Fig. 3.2**).



La **Figura 3.3** muestra los resultados experimentales obtenidos cuando muestras de esporos sobre placas recubiertas de TiO_2 y sobre placas sin recubrir fueron expuestas a la radiación UV-A ($2,44 \text{ mW cm}^{-2}$) durante diferentes períodos de tiempo. En la misma figura se trazan líneas de tendencia para facilitar la observación de la reducción de la viabilidad de esporos.



Cuando los esporos de *B. subtilis* fueron irradiados sobre superficies de TiO_2 , su viabilidad disminuyó significativamente y aumentó el grado de inactivación con el tiempo de irradiación. Después de 24 horas de irradiación continua, la fracción de esporos viables fue cercana al 0,12%. Cuando las muestras fueron irradiadas durante

un período más largo de tiempo, el número de esporos viables fue inferior al límite de detección del procedimiento de cuantificación ($6,7 \times 10^2$ UFC cm⁻²). Sin embargo, cuando la irradiación de los esporos se llevó a cabo en las mismas condiciones experimentales, pero con los esporos de *B. subtilis* esparcidos sobre placas de vidrio sin TiO₂, la inactivación fue notablemente inferior (**Fig. 3.3**). Después de 48 horas de irradiación continua, la fracción de esporos viables fue cercana al 31%, mostrando que bajo las condiciones experimentales empleadas, la inactivación puramente fotoquímica no fue significativa en comparación con la inactivación fotocatalítica. La magnitud de la reducción de esporos irradiados sobre vidrio de borosilicato (sin TiO₂) en las condiciones mencionadas fue de 0,47 después de 48 horas de irradiación continua, mientras que aquellos irradiados sobre películas de TiO₂ fue superior a 3 después de 24 horas de irradiación continua. Estos resultados confirman que, bajo las condiciones de empleadas, los esporos de *B. subtilis* son mucho más vulnerables a la inactivación fotocatalítica que a la inactivación fotoquímica.

Para todos los niveles de radiación ensayados, la viabilidad de los esporos esparcidos sobre películas de TiO₂ disminuyó significativamente con el tiempo de exposición, tal como lo muestra la **Tabla 3.1**. Con respecto al efecto del nivel de irradiación sobre la velocidad de inactivación, los resultados experimentales demuestran que cuanto más intenso es el flujo de radiación alcanzado sobre la placa, más rápida resulta la inactivación de esporos. Más adelante se analizará la relación entre la velocidad de inactivación y el flujo de radiación, utilizando el modelo cinético.

Tabla 3.1. Inactivación de esporos esparcidos sobre películas de TiO₂ empleando diferentes niveles de radiación incidente

Tiempo [h]	N [UFC cm ⁻²]			
	Flujo de radiación incidente [mW cm ⁻²]			
	2,44	0,90	0,63	0,29
0	$3,67 \times 10^6$	$1,19 \times 10^7$	$1,73 \times 10^6$	$2,43 \times 10^6$
6	$1,04 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$8,83 \times 10^5$	$8,67 \times 10^5$
12	$1,36 \times 10^5$	$9,22 \times 10^5$	$3,23 \times 10^5$	$5,65 \times 10^5$
24	$4,33 \times 10^3$	$2,56 \times 10^5$	$7,65 \times 10^4$	$1,73 \times 10^5$
36	----	$3,20 \times 10^4$	----	$8,80 \times 10^4$
48	----	$7,33 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,43 \times 10^4$

3.3. ESQUEMA SIMPLIFICADO DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA

Se propone un esquema simplificado para el complejo proceso de inactivación fotocatalítica de esporos de *B. subtilis*. La secuencia de pasos de reacción y sus expresiones cinéticas correspondientes se muestran en la **Tabla 3.2**. El primer paso corresponde a la activación del semiconductor por la absorción de fotones de la radiación ultravioleta (reacción 1) con la energía suficiente para promover electrones de la banda de energía de valencia a la banda de energía de conducción, generando una carga positiva o hueco h^+ en la banda de valencia. La velocidad de este paso inicial es proporcional a la velocidad local a la cual los fotones son absorbidos en la película fotocatalítica. La constante de proporcionalidad Φ es el rendimiento cuántico primario. Durante su tiempo de vida, el h^+ foto-generado puede interactuar con las moléculas de agua adsorbidas en la superficie de catalizador para producir radicales $\cdot OH$ (reacción 2), mientras que los electrones libres (e^-) pueden transferirse al

oxígeno molecular adsorbido generando radicales $\cdot\text{O}_2^-$ (reacción 3). Además, los radicales $\cdot\text{OH}$ pueden reaccionar entre sí para formar H_2O_2 (reacción 4). Sin embargo, esto requiere que dos radicales $\cdot\text{OH}$ colisionen entre sí durante su corto tiempo de vida, lo cual es muy poco probable. Como consecuencia de esto, podemos suponer que la reacción 4 progresará a un ritmo muy lento y la concentración de H_2O_2 será despreciable. A fin de simplificar el modelo, se asume que los esporos están compuestos en su estructura de una única cubierta, la cual incluye la cubierta interior y exterior, y la corteza del espora. Los h^+ foto-generados pueden interactuar directamente con los compuestos de la cubierta del espora (reacción 5). Aunque no se considera que el hueco sea la especie reactiva más importante en la inactivación de los esporos, esta reacción es probable que se produzca y puede trabajar en conjunto con la oxidación principal llevada a cabo por los radicales $\cdot\text{OH}$. El paso 6 representa la degradación progresiva de los compuestos de la cubierta del espora en su punto de contacto con la superficie fotocatalítica debido a la acción de los radicales $\cdot\text{OH}$, la cual no causa lesiones letales al espora. El paso 7 representa la pérdida de viabilidad del espora originada por los radicales $\cdot\text{OH}$, para obtener los esporos inactivos, que podría ocasionarse por la pérdida de integridad de la cubierta, o por daños en el núcleo, o ambos procesos juntos. En este modelo propuesto, se supone que los esporos inactivos difieren de los activos sólo en su capacidad para germinar. El último paso es la recombinación de h^+ y e^- (reacción 8) con liberación simultánea de energía.

Al comienzo del proceso, todos los esporos en la superficie fotocatalítica están intactos, pero después de que comienza la irradiación, los compuestos orgánicos de

la cubierta del esporo se oxidan progresivamente. Asimismo, el núcleo comienza a ser oxidado. El daño en la cubierta y en el núcleo es acumulativo, y los esporos inicialmente intactos evolucionan a través de estados donde aumenta el grado de degradación. Cuando este daño alcanza un nivel que no puede ser reparado o invertido por los esporos durante la germinación, entonces el esporo es inactivo. Finalmente, de acuerdo a los resultados de Wolfrum y col. (2002), los esporos podrían ser mineralizados completamente. Teniendo en cuenta los niveles de radiación y los tiempos de exposición adoptados en este trabajo de Tesis, no se espera que se produzca la mineralización en nuestras condiciones experimentales.

Tabla 3.2. Esquema de reacción

Nº	Etapas de reacción	Velocidad de la etapa de reacción
(1)	$\text{TiO}_2 + h\nu \rightarrow \text{TiO}_2 + h^+ + e^-$	$r_1 = \Phi e^{a,s}$
(2)	$h^+ + \text{H}_2\text{O}_{(\text{ads})} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}^+$	$r_2 = k_2 [h^+][\text{H}_2\text{O}]_{\text{ads}}$
(3)	$e^- + \text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{O}_2^-$	$r_3 = k_3 [e^-][\text{O}_2]$
(4)	$2 \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	$r_4 = 2k_4 [\cdot\text{OH}]^2$
(5)	$h^+ + \text{Compuestos Superficiales} \rightarrow \text{Productos}$	$r_5 = k_5 [h^+][\text{CS}]$
(6)	$\cdot\text{OH} + \text{Compuestos Superficiales} \rightarrow \text{Productos}$	$r_6 = k_6 [\cdot\text{OH}][\text{CS}]$
(7)	$\cdot\text{OH} + \text{Esporos Viabiles} \rightarrow \text{Esporos Inactivos}$	$r_7 = k_7 [\cdot\text{OH}][\text{N}]$
(8)	$h^+ + e^- \rightarrow \text{Energía Térmica}$	$r_8 = k_8 [h^+][e^-]$

3.4. DERIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN CINÉTICA PARA LA INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE ESPOROS

Aplicando la aproximación de micro-estado estacionario local (ó velocidad neta de formación nula) para los huecos (h^+) y electrones (e^-) (**Tabla 3.2**), obtenemos

$$r_{h^+} = r_1 - r_2 - r_5 - r_8 = \Phi e^{a,s} - k_2 [h^+] [H_2O]_{ads} - k_5 [h^+] [SC] - k_8 [h^+] [e^-] \approx 0 \quad (3.1)$$

$$r_{e^-} = r_1 - r_3 - r_8 = \Phi e^{a,s} - k_3 [O_2]_{ads} [e^-] - k_8 [h^+] [e^-] \approx 0 \quad (3.2)$$

Luego, la concentración de huecos y electrones puede expresarse como

$$[h^+] = \frac{k_3 [O_2]_{ads}}{2 k_8} \left(\sqrt{1 + \frac{4 k_8 \Phi e^{a,s}}{k_3 [O_2]_{ads} (k_2 [H_2O]_{ads} + k_5 [CS])}} - 1 \right) \quad (3.3)$$

$$[e^-] = \frac{(k_2 [H_2O]_{ads} + k_5 [CS])}{2 k_8} \left(\sqrt{1 + \frac{4 k_8 \Phi e^{a,s}}{k_3 [O_2]_{ads} (k_2 [H_2O]_{ads} + k_5 [CS])}} - 1 \right) \quad (3.4)$$

Si la aproximación de micro-estado estacionario local se supone también para los radicales $\cdot OH$, tenemos

$$r_{OH} = r_2 - r_4 - r_6 - r_7 \approx 0 \quad (3.5)$$

$$r_{OH} = k_2 [h^+] [H_2O]_{ads} - 2k_4 [\cdot OH]^2 - k_6 [\cdot OH] [CS] - k_7 [\cdot OH] [N] \approx 0 \quad (3.6)$$

En la ecuación (3.6) puede suponerse que las reacciones de terminación radical-radical (reacción 4 en **Tabla 3.2**) son despreciables en comparación con la degradación fotocatalítica. Por lo tanto, obtenemos:

$$[\cdot\text{OH}] = \frac{k_2 [\text{H}_2\text{O}]_{\text{ads}} k_3 [\text{O}_2]}{2k_8 (k_6 [\text{CS}] + k_7 [\text{N}])} \left(\sqrt{1 + \frac{4 k_8 \Phi e^{a,s}}{k_3 [\text{O}_2]_{\text{ads}} (k_2 [\text{H}_2\text{O}]_{\text{ads}} + k_5 [\text{CS}])}} - 1 \right) \quad (3.7)$$

Los compuestos superficiales (es decir, [CS]) representan todos los compuestos químicos que conforman la cubierta del esporo en contacto directo con la película de TiO_2 . Estos compuestos actuarán como “scavengers” (agentes neutralizantes o atrapantes) de los radicales $\cdot\text{OH}$, reduciendo la disponibilidad de $\cdot\text{OH}$ para reaccionar con los objetivos vitales del esporo, y protegiendo de esta manera al esporo de ser inactivado. La completa mineralización de estos compuestos superficiales es muy poco probable bajo las condiciones utilizadas, y por lo tanto, no se esperan variaciones sustanciales de su concentración. Por esta razón, la concentración de los compuestos superficiales se consideró constante para propósitos del modelado.

Además, si consideramos que la concentración de agua y oxígeno adsorbidos se mantienen constantes durante el proceso de irradiación, podemos definir las constantes cinéticas K_1'' , K_2' y K_3 :

$$[\cdot\text{OH}] = \frac{K_1''}{(1 + K_3 [\text{N}])} \left(\sqrt{1 + K_2' e^{a,s}} - 1 \right) \quad (3.8)$$

donde:

$$K_1'' = \frac{k_2 k_3 [\text{O}_2]_{\text{ads}} [\text{H}_2\text{O}]_{\text{ads}}}{2k_8 k_6 [\text{CS}]} \quad (3.8\text{-a})$$

$$K_2' = \frac{4 k_8 \Phi}{k_3 [\text{O}_2]_{\text{ads}} (k_2 [\text{H}_2\text{O}]_{\text{ads}} + k_5 [\text{CS}])} \quad (3.8\text{-b})$$

$$K_3 = \frac{k_7}{k_6 [CS]} \quad (3.8-c)$$

La velocidad de degradación de los esporos se supone proporcional a la concentración de esporos y a la concentración de radicales [$\cdot\text{OH}$] (reacción (7)):

$$\frac{d[N]}{dt} = -k_7 [\cdot\text{OH}][N] \quad (3.9)$$

Sustituyendo la ecuación (3.8) en la ecuación (3.9), y reorganizando la expresión resultante, se obtiene:

$$\frac{d[N]}{dt} = -K'_1 \frac{[N]}{(1 + K_3 [N])} \left(\sqrt{1 + K'_2 e^{a,s}} - 1 \right) \quad (3.10)$$

donde:

$$K'_1 = k_7 K_1'' \quad (3.10-a)$$

La ecuación (3.10) se puede integrar fácilmente, y se obtiene:

$$[N] = [N_0] \exp \left\{ K_3 ([N_0] - [N]) - K_1 \left(\sqrt{K_2 + e^{a,s}} - \sqrt{K_2} \right) t \right\} \quad (3.11)$$

donde:

$$K_1 = K'_1 \sqrt{K'_2} \quad (3.11-a)$$

$$K_2 = \frac{1}{K'_2} \quad (3.11-b)$$

El conjunto final de parámetros cinéticos a determinar es $\{K_1, K_2, K_3\}$.

3.5. MODELO DEL CAMPO DE RADIACIÓN

La absorción de fotones en las películas de TiO_2 es el paso inicial de las reacciones fotocatalíticas, y la cinética de estos procesos depende de la Velocidad Superficial Local de Absorción de Fotones (Local Superficial Rate of Photon Absorption, LSRPA o $e^{a,s}$) (Imoberdorf y col., 2005). Debido a que los valores de $e^{a,s}$ no pueden medirse experimentalmente, se diseñó un modelo de campo de radiación que tiene en cuenta la emisión de radiación de las lámparas, su propagación en el compartimento de irradiación, su atenuación en el vidrio de borosilicato en la parte superior de este compartimento y, por último, la absorción de fotones en la película de TiO_2 . Los efectos que fueron considerados en el modelo de radiación son representados esquemáticamente en la **Figura 3.4**.

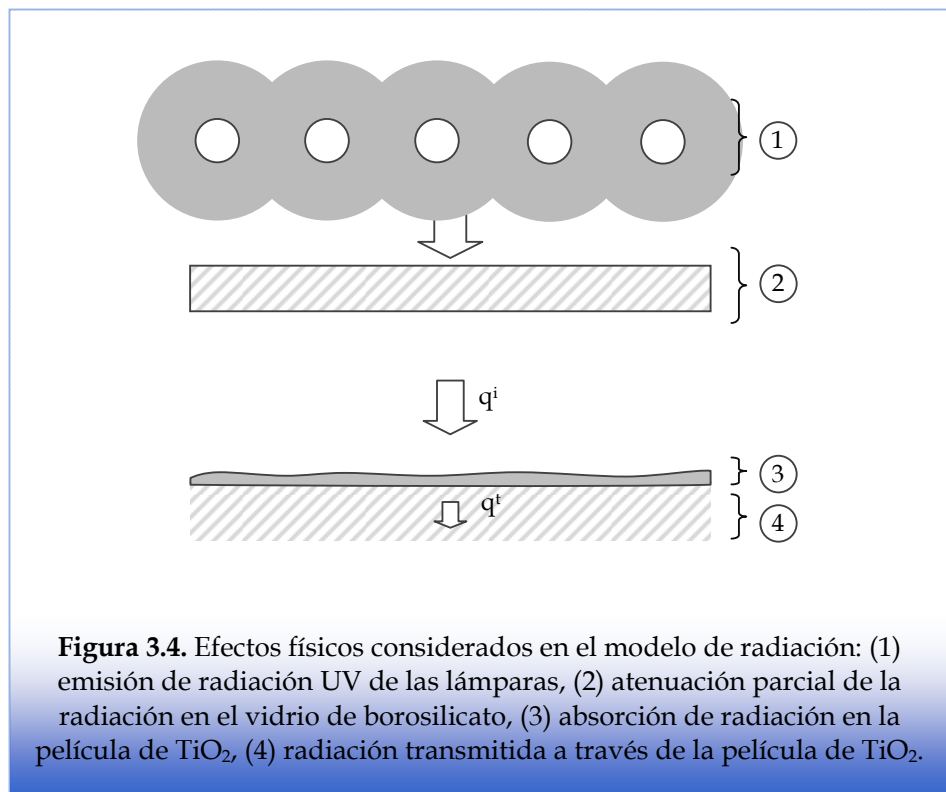


Figura 3.4. Efectos físicos considerados en el modelo de radiación: (1) emisión de radiación UV de las lámparas, (2) atenuación parcial de la radiación en el vidrio de borosilicato, (3) absorción de radiación en la película de TiO_2 , (4) radiación transmitida a través de la película de TiO_2 .

Para la generación de la malla, el volumen del compartimento de irradiación se definió como un paralelepípedo, del cual los volúmenes de las lámparas, definidos como cilindros, fueron restados (**Fig. 3.5**). A fin de simplificar los cálculos, se omitió el vidrio de borosilicato que separa el interior del compartimento de irradiación con UV, pero el efecto de atenuación que produce sobre el flujo de radiación fue incorporado en un paso posterior. Las dimensiones y configuración se definieron de manera de reproducir el dispositivo experimental. El compartimento de irradiación fue dividido en aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células tetraédricas utilizando el generador de mallas Gambit.

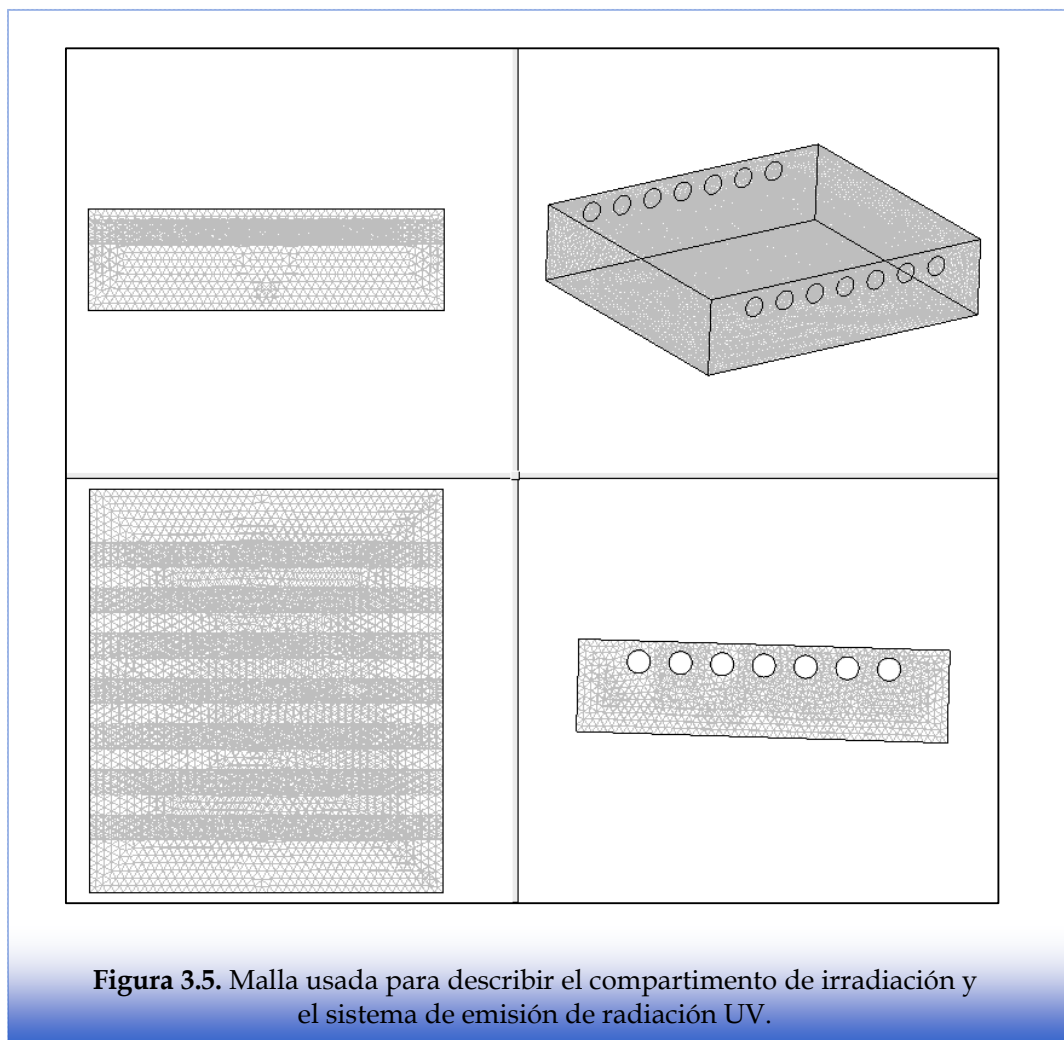
Para calcular la absorción de fotones en la película de catalizador, se resolvió la ecuación de transferencia radiativa (RTE, Radiative Transfer Equation) mediante el método de la ordenada discreta (DOM) utilizando el Software Fluent (Fluent 6.3). Se consideraron las siguientes condiciones de contorno:

(i) para describir las lámparas, se definió una entrada neta de flujo de energía radiante isotrópica en las superficies cilíndricas. El flujo de radiación en la superficie de la lámpara fue evaluado como:

$$q_{\text{lamp}} = \frac{P_{\text{eff,lamp}}}{2 \pi R_{\text{lamp}} L_{\text{lamp}}} \quad (3.12)$$

donde q_{lamp} es el flujo de radiación en la superficie de la lámpara, $P_{\text{eff,lamp}}$ es la potencia de emisión efectiva de las lámparas, R_{lamp} es el radio de la lámpara, y L_{lamp} es el largo de la lámpara.

(ii) para describir las paredes negras del compartimento de irradiación (descrito en la sección experimental), se seleccionó la propiedad opaca para las paredes externas.



Las direcciones de propagación de la radiación fueron discretizadas en 10 divisiones para los ángulos azimutal y polar. La RTE se puede independizar de la ecuación de transferencia de energía térmica considerando el sistema como isotérmico. Para garantizar la convergencia de la solución numérica, se utilizó un número de iteraciones de $1,0 \times 10^3$. Los valores del flujo de radiación incidente

calculado en los distintos nodos del plano donde se encontraban las muestras de esporos, que cubre todo el compartimento de irradiación (21×24 cm), están representados en la **Figura 3.6** como una graduación de grises, donde las zonas más oscuras corresponden a las regiones menos iluminadas. Para propósitos de validación, los valores de predicción del flujo de radiación local obtenida con simulaciones CFD fueron comparados con resultados experimentales. Para esto, se realizaron mediciones locales del flujo incidente en diferentes posiciones en un plano utilizando un radiómetro (IL 1700 - SED005 - WBS 320). Estas mediciones se llevaron a cabo colocando el sensor del radiómetro frente al sistema emisor de energía, en distintos nodos de una malla virtual plana situada a una distancia de 4,5 cm desde el plano que contiene el eje de las lámparas. La concordancia entre los resultados simulados y experimentales fue satisfactoria, con un error relativo promedio de 11%.

Al comparar el flujo de radiación local en diferentes lugares del compartimento de irradiación, se observaron variaciones significativas. Teniendo en cuenta la totalidad del área del compartimento de irradiación, el flujo máximo predicho de energía radiante en su centro es 62% más grande que el flujo mínimo, en las esquinas. La falta de uniformidad en el nivel de irradiación de las muestras de esporos es indeseable, porque las muestras situadas en las regiones menos iluminadas no exhibirían la misma actividad fotocatalítica que las muestras situadas en las regiones más iluminadas. Para evitar estas dificultades, se utilizó una superficie de irradiación de menor tamaño que el de la sección transversal completa del compartimento de irradiación. Para asegurar que toda la superficie fotocatalítica sea activa en cada ensayo experimental, se utilizó sólo la superficie más iluminada (9×12 cm), situada

en la zona central del compartimento de irradiación (**Fig. 3.6**). El flujo de radiación neta incidente promedio obtenido fue de 2,44 mW cm⁻². El criterio para esta decisión fue que, a fin de asegurar una LSRPA razonablemente uniforme sobre la película activa, una diferencia tolerable entre el sitio más iluminado y el menos iluminado debía ser menor del 17%.

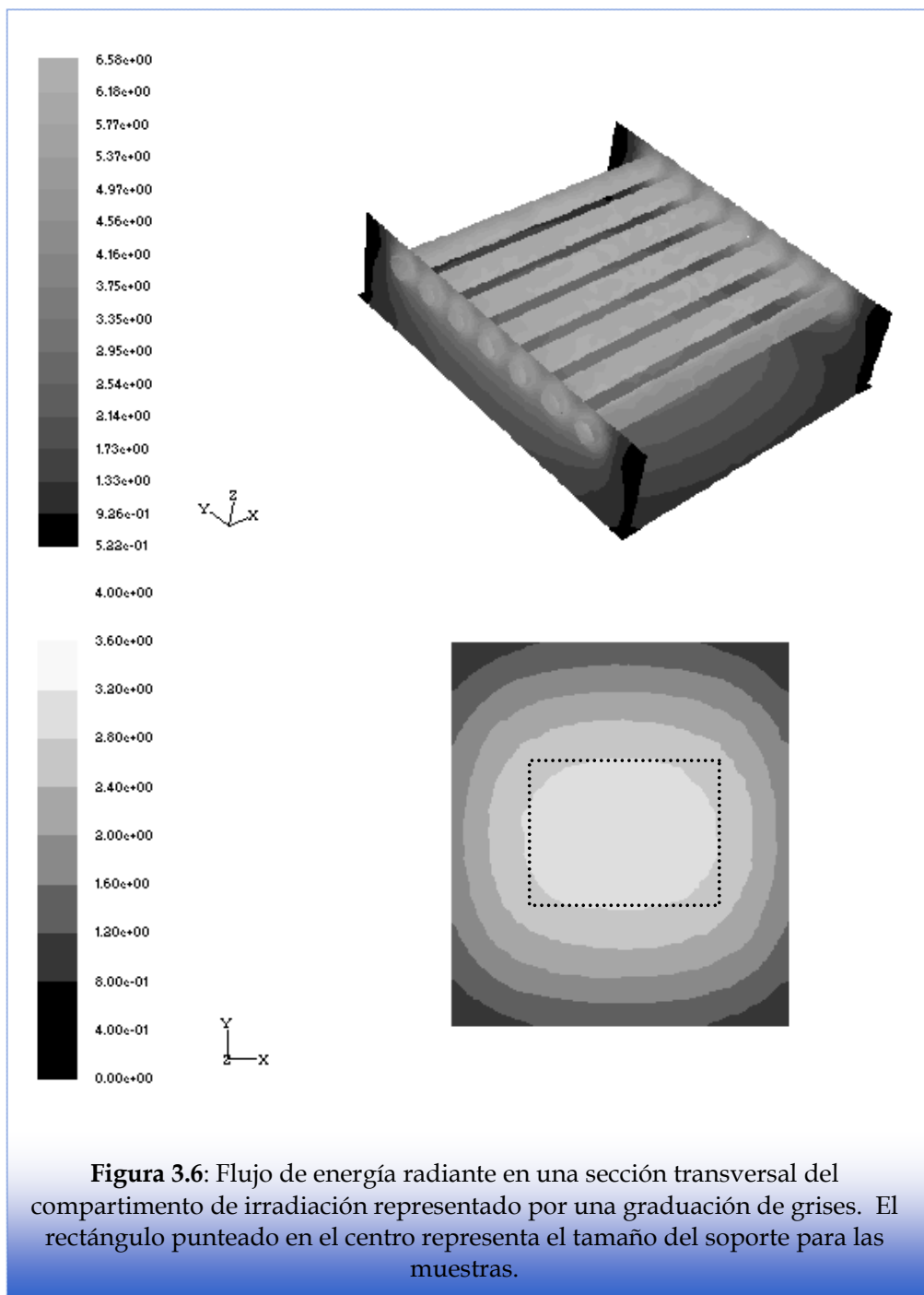
A fin de considerar la atenuación de la radiación producida por la absorción del vidrio de borosilicato, dicha absorción de la radiación fue descontada del flujo de radiación calculado porque, como se ha mencionado, este efecto no fue considerado en el modelo CFD. La radiación atenuada que llega realmente a las películas de TiO₂ puede calcularse a partir de:

$$q^i(\underline{x}) = q^0(\underline{x}) \exp\left(-\langle \kappa_{\lambda,g} \rangle_{\lambda_{\text{lamp}}} e_g\right) \quad (3.13)$$

donde $q^i(\underline{x})$ es la radiación efectiva que llega al recubrimiento de TiO₂, $q^0(\underline{x})$ representa el flujo de radiación obtenido de la simulación con CFD, $\langle \kappa_{\lambda,g} \rangle_{\lambda_{\text{lamp}}}$ es el coeficiente de absorción del vidrio de borosilicato, y e_g es el espesor de la placa de vidrio. El producto de $\langle \kappa_{\lambda,g} \rangle_{\lambda_{\text{lamp}}} e_g$ fue obtenido por mediciones espectrofotométricas de la transmitancia de las placas de vidrio sin catalizador (**Fig. 2.3**).

Estableciendo los balances de energía radiativa local en términos de flujos de energía local (**Fig. 3.4**), el LSRPA fue calculado en cada punto de la película catalítica que recubre las placas de vidrio (Imoberdorf y col., 2005):

$$e^{a,s}(\underline{x}) = q^i(\underline{x}) - q^t(\underline{x}) \quad (3.14)$$



En la ecuación (3.14), $q^i(\underline{x})$ representa el flujo radiante local que llega a la superficie catalítica y $q^t(\underline{x})$ es el flujo de energía radiante local que se transmite a través de las películas de TiO_2 . $q^t(\underline{x})$ puede calcularse como:

$$q^i(\underline{x}) = q^i(\underline{x}) \exp\left(-\langle \kappa_{\lambda,f} \rangle_{\lambda_{\text{lamp}}} e_f\right) \quad (3.15)$$

donde $\kappa_{\lambda,f}$ es el coeficiente de absorción de la película de TiO₂ y e_f representa el espesor de la película. Finalmente, introduciendo (3.15) en (3.14), se obtiene la expresión para calcular la velocidad superficial local de absorción de fotones:

$$e^{a,s}(\underline{x}) = q^i(\underline{x}) \left[1 - \exp\left(-\langle \kappa_{\lambda,f} \rangle_{\lambda_{\text{lamp}}} e_f\right) \right] \quad (3.16)$$

3.6. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Los parámetros cinéticos de la ecuación 3.11 fueron ajustados empleando el conjunto completo de resultados experimentales. La función objetivo (FO) a ser minimizada fue definida como la suma del cuadrado de las diferencias entre cada valor experimental de la concentración de esporos viables y el correspondiente valor calculado con las expresiones cinéticas, dividido por la desviación estándar del valor experimental:

$$FO(K_1, K_2, K_3) = \sum_{i=1}^n \frac{\left([N]_{\text{exp},i} - [N]_{\text{mod},i}\right)^2}{\sigma_i^2} \quad (3.17)$$

El conjunto valores de los parámetros cinéticos (K_1 , K_2 , K_3) que minimizó la FO fue considerado el mejor ajuste. Para encontrar este conjunto de valores, se utilizó el algoritmo genético (AG). En términos generales, el AG es un algoritmo de búsqueda heurística adaptable inspirado en la evolución, selección natural y genética. Este método de minimización fue seleccionado porque es capaz de encontrar el mínimo

absoluto de una determinada FO en lugar de sus mínimos locales, como ocurre en algunos de los métodos alternativos. En la **Figura 3.7** se muestra un esquema simplificado del algoritmo empleado. El primer paso consistió en la generación al azar de la primera población de 100 individuos (es decir, un grupo de valores de los parámetros cinéticos K_1 , K_2 y K_3). Usando los resultados experimentales y los valores predichos del conjunto completo de condiciones de operación estudiadas, se calculó la aptitud (es decir, la función objetivo) de cada individuo (es decir, de cada valor del parámetro cinético). Los individuos más aptos, aquellos que proporcionan el menor valor de la FO, fueron seleccionados para sobrevivir y se utilizaron para calcular la próxima generación. La próxima generación fue calculada cambiando el grupo seleccionado de parámetros por migración, entrecruzamiento y mutación al azar. Luego, la FO fue evaluada para la población completa de grupos de parámetros. Este proceso iterativo se repitió hasta la convergencia de los parámetros hacia aquellos que minimizan la FO. En la **Tabla 3.3** se muestran los valores de los parámetros obtenidos con el AG para la ecuación (3.11).

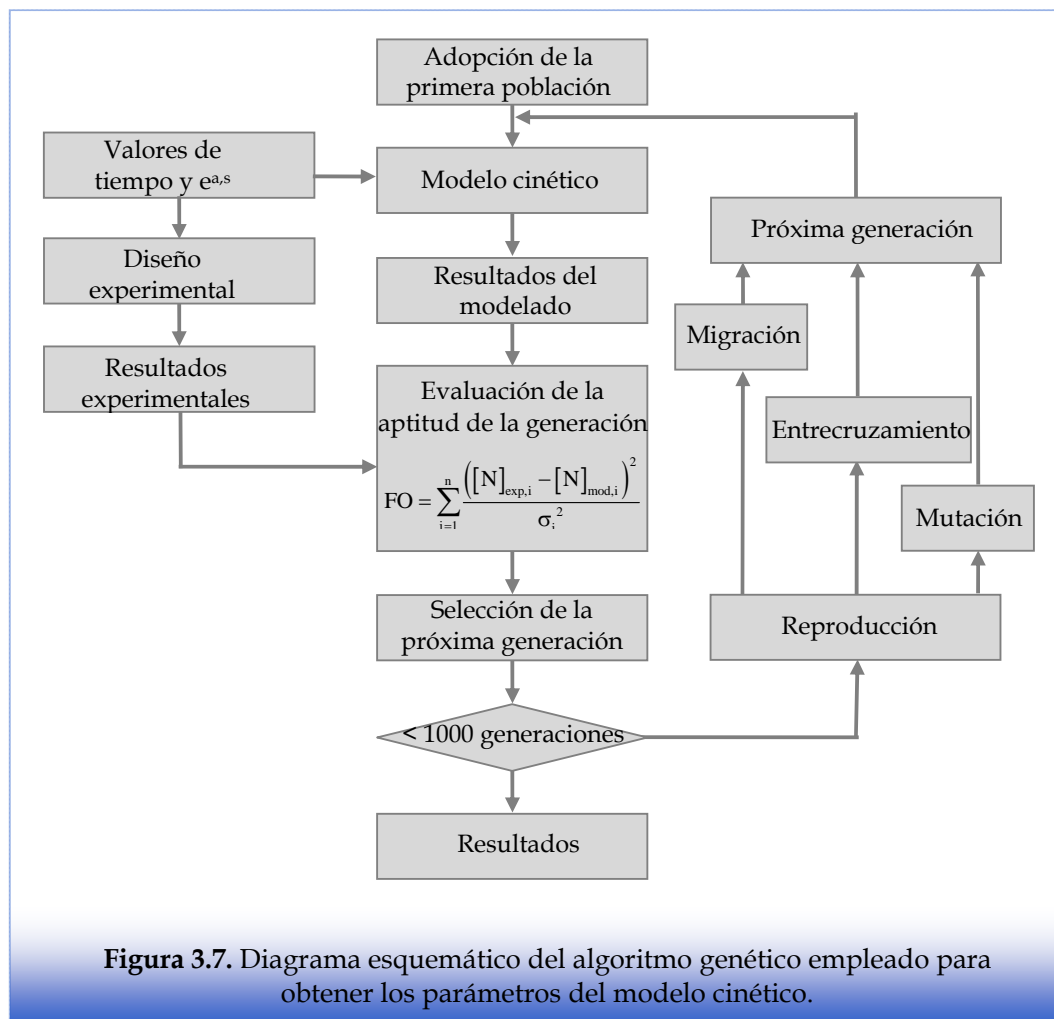
Tabla 3.3. Parámetros cinéticos

Parámetro	Valor	Unidades
K_1	123,76	cm Einstein ^{-1/2} h ^{-1/2}
K_2	$2,53 \times 10^{-9}$	Einstein h ⁻¹ cm ⁻²
K_3	$1,95 \times 10^{-27}$	cm ² CFU ⁻¹

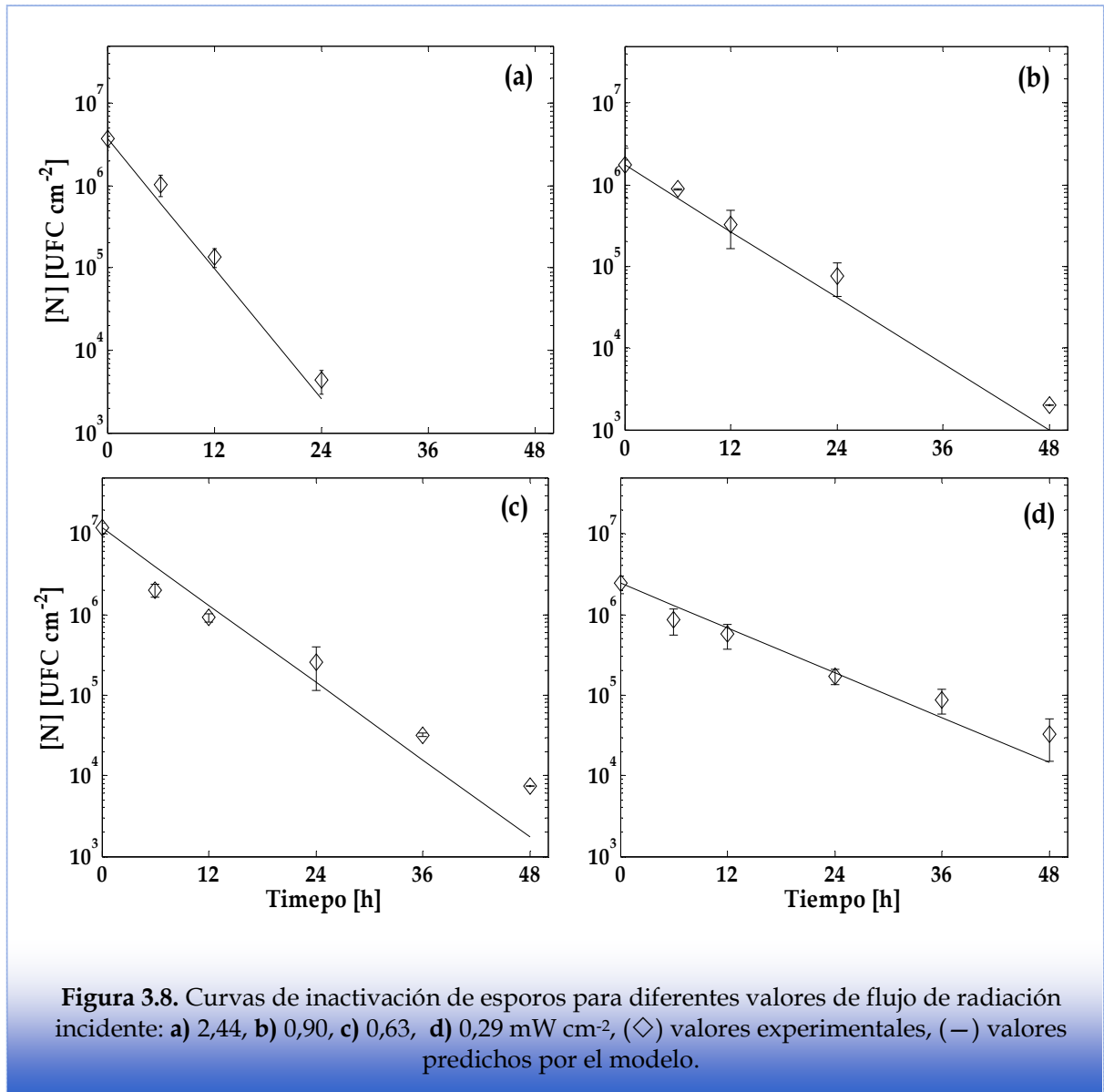
De la **Tabla 3.3**, es posible concluir que los términos afectados por K_2 y K_3 pueden ser despreciados en la ecuación (3.11). Entonces, la ecuación cinética final es:

$$[N] = [N_0] \exp\left(-K_1 \sqrt{e^{a,s} t}\right) \quad (3.18)$$

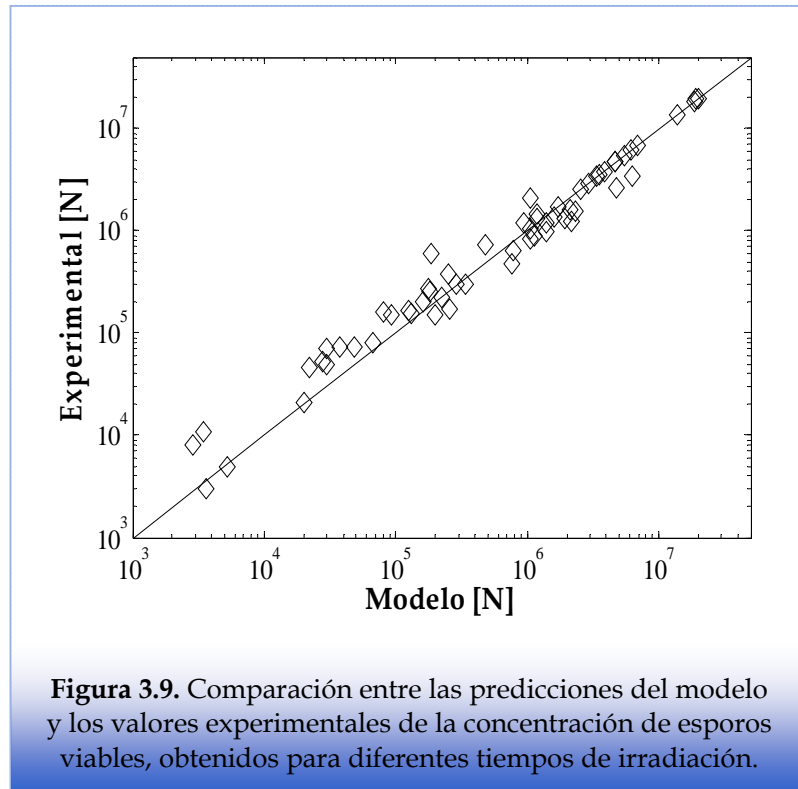
Se observa que velocidad de inactivación tiene una dependencia con la raíz cuadrada de la radiación absorbida por la película del fotocatalizador ($e^{a,s}$).



Las curvas de inactivación de los esporos de *Bacillus subtilis* y los valores obtenidos por el modelo (ecuación (3.18)), para los diferentes valores de flujo de radiación incidente estudiados, se muestran en la **Figura 3.7**. Se obtuvo una concordancia satisfactoria entre los datos experimentales y las predicciones del modelo.



Asimismo, la **Figura 3.8** compara los resultados experimentales con los predichos por el modelo cinético, para todos los datos experimentales obtenidos en este trabajo (Zacarías y col., 2010).



CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES RECUBRIMIENTOS DE TiO₂

En este capítulo se compara el rendimiento de diferentes recubrimientos de TiO₂ para la inactivación fotocatalítica de esporos de Bacillus subtilis secos dispersados sobre películas de TiO₂ bajo radiación UV-A. Se ensayaron tres clases de recubrimientos de TiO₂ con diferente número de capas.

A través de mediciones de transmitancia y reflectancia difusa de los recubrimientos, se calculó la fracción de energía efectivamente absorbida por las películas fotocatalíticas. Además, se determinó la cantidad de TiO₂ depositado en las placas de vidrio de borosilicato y se obtuvieron fotografías de las mismas con microscopio electrónico.

Finalmente, para comparar objetivamente el rendimiento de los recubrimientos, se calcularon dos tipos de eficiencias: la eficiencia fotónica y la eficiencia cuántica de inactivación.

4.1. MODIFICACIÓN DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Los experimentos fotocatalíticos fueron llevados a cabo en el reactor detallado en la **Sección 2.1**. Sin embargo, a este dispositivo se le realizaron leves mejoras para poder medir de forma más apropiada la temperatura y la humedad relativa. También se mejoró el sistema de cierre del compartimento de irradiación, permitiendo que dichas variables se mantengan más estables.

Dentro del compartimento de irradiación se hicieron mediciones locales del flujo de radiación incidente en diferentes posiciones en un plano mediante un radiómetro (ILT 1700, International Light Technologies), de la misma forma en que fuera descrito en la **Sección 3.5**. Sólo la superficie más iluminada, situada en la zona central del compartimento de irradiación, fue empleada para los experimentos. El flujo de radiación neto incidente promedio obtenido fue de $1,89 \text{ mW cm}^{-2}$, lo que equivale a $2,01 \times 10^{-5} \text{ Einstein cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ o $1,21 \times 10^{19} \text{ fotón cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. La conversión de contenido de energía (mW cm^{-2}) al contenido de fotones ($\text{Einstein cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) se realizó con la ecuación de Planck, considerando el espectro total de emisión de las lámparas (**Fig. 2.3**):

$$E = hc / \lambda$$

donde: h es la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ W s}^2$), c es la velocidad de la luz ($2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$), λ es la longitud de onda (m). $1 \text{ Einstein} = 1 \text{ mol } (6,022 \times 10^{23})$ de fotones.

Por otro lado, una solución saturada de sulfato de amonio fue incluida en el compartimento de irradiación para asegurar un ambiente con una elevada y

constante humedad relativa, necesarias para obtener una sostenible actividad fotocatalítica de TiO₂. A lo largo de los experimentos, la humedad y la temperatura dentro del compartimento de irradiación se mantuvieron constantes en 70% y 40 °C, respectivamente. Un termohigrómetro (Oakton Thermohygrometer Kit) acoplado al equipo fue empleado para medir estas variables.

4.2. PREPARACIÓN DE LOS CATALIZADORES

La inactivación fotocatalítica de esporos de *Bacillus subtilis* se ensayó sobre tres diferentes recubrimientos de TiO₂. El primero (**TiO₂ Degussa P-25**) usa una suspensión de 150 g L⁻¹ de TiO₂ Degussa P-25 (Evonik Degussa) en agua ultrapura (Osmonion Ultrapure Water, Apema) a un valor de pH de 1,5 (ajustado con HNO₃). La cantidad necesaria de catalizador fue dispersada en agua ultrapura al pH indicado y luego sonicada durante 2 h (van Grieken y col., 2009).

La segunda técnica (**TiO₂ Sol-Gel**) es la detallada en la **Sección 2.2**. Consiste en un método Sol-Gel que utiliza tetra-isopropóxido de titanio como precursor (Yamazaki-Nishida y col., 1993).

El tercer recubrimiento (**Sol-Gel/Degussa P-25**) fue obtenido por una técnica mixta de TiO₂ Sol-Gel/Degussa P-25 (Keshmiri y col., 2004). Primero, el etanol desnaturalizado (85% de etanol + 15% metanol) se mezcló con agua ultrapura y HCl concentrado (36,5%). El alcohol fue utilizado como solvente para prevenir la hidrólisis rápida del alcóxido de titanio. El HCl fue empleado en este proceso para

controlar la velocidad de condensación y evitar una rápida gelificación del sol. Tras unos minutos de agitación, se añadió a la mezcla el tetra-isopropóxido de titanio (Sigma Aldrich, 97%). La hidrólisis se llevó a cabo agregando gota a gota el precursor a la solución preparada, mientras se agitaba. Esta mezcla se agitó durante 2 horas. Después de este período, se agregó el TiO₂ Degussa P-25 y se agitó durante 12 h.

4.3. OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS DE TiO₂

Para las tres técnicas de recubrimiento estudiadas, la inmovilización de TiO₂ sobre las placas de vidrio se realizó mediante la técnica de dip-coating descrita en la **Sección 2.3**. Sin embargo, después de realizado el recubrimiento correspondiente, cada catalizador fue tratado en forma diferente. Para los recubrimientos con TiO₂ Degussa P-25, las placas fueron secadas en horno a 110 °C durante 24 horas y luego calentadas a 500 °C por 2 h, con una velocidad de calentamiento de 5 °C min⁻¹. Para el recubrimiento de TiO₂ Sol-Gel, las placas fueron secadas en horno a 80 °C por 1 h y luego calentadas a 200 °C durante 6 horas. Finalmente, para el recubrimiento de TiO₂ Sol-Gel/Degussa P-25, las placas fueron secadas a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h y luego calentadas a 500 °C por 2 h, con una velocidad de calentamiento de 11 °C min⁻¹.

Para obtener dos o tres capas de catalizador sobre las placas de vidrio, después de los pasos de secado y calcinación, la capa siguiente se realizó repitiendo el procedimiento empleado para depositar la primera capa. En particular, no fue

posible obtener una tercera capa con la técnica Sol-Gel/Degussa P-25 debido a las pobres propiedades de adherencia de la película resultante.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLACAS FOTOCATALÍTICAS

4.4.1. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE CATALIZADOR INMOVILIZADO SOBRE LAS PLACAS DE VIDRIO

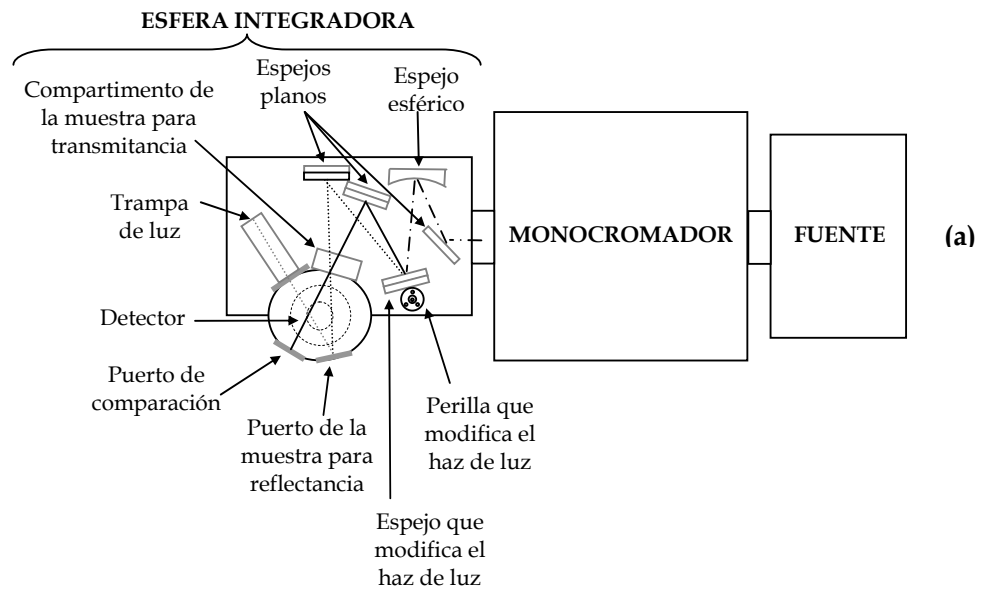
La cantidad de TiO₂ depositado en las placas de vidrio de borosilicato se midió mediante un procedimiento espectrofotométrico, adaptado de Jackson y col. (1991), que implica la digestión del catalizador seguido por una detección colorimétrica. La solución utilizada para disolver el TiO₂ (Solución A) fue preparada mezclando 10 g de (NH₄)₂SO₄ en 25 mL de H₂SO₄ concentrado. Cada vidrio recubierto fue colocado en un recipiente conteniendo 4 mL de la solución A. El vidrio recubierto con TiO₂ sumergido en la Solución A fue llevado a ebullición hasta que el TiO₂ se disolvió completamente (aproximadamente 1 h). A continuación fue enfriado y posteriormente se agregaron 6 mL de agua ultrapura. Todo el líquido fue transferido cuantitativamente a un matraz aforado de 25 mL, el cual se enrasó con una solución de 5/95 % v/v de H₂SO₄ concentrado/H₂O. A 10 mL de esta solución se le añadieron 3 gotas de H₂O₂ y se agitó. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución coloreada en 410 nm (Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS). Para determinar la cantidad de TiO₂ depositado en las placas de vidrio, previamente se realizó una curva de calibrado agregando diferentes cantidades de TiO₂ Degussa-P25 a la Solución A y siguiendo el mismo procedimiento descrito para las placas.

4.4.2. MEDICIONES DE TRANSMITANCIA Y REFLECTANCIA

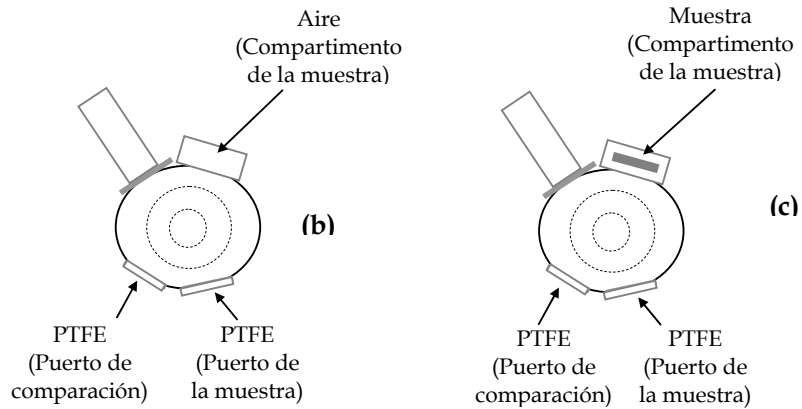
Se realizaron mediciones de reflectancia y transmitancia difusa de las placas recubiertas en un espectrofotómetro Optronic OL serie 750, equipado con una esfera integradora de reflectancia (OL 740-70). El equipo consiste en una fuente de iluminación (lámparas de deuterio y tungsteno), un monocromador y una esfera integradora (**Fig. 4.1-a**). El accesorio de la esfera integradora contiene un sistema de espejos que dirige el haz de luz a la posición deseada. La esfera posee dos aperturas en la pared para realizar las mediciones de reflectancia: el puerto de muestra y el puerto de comparación; y un compartimento para las mediciones de transmitancia. El detector está situado en la parte superior de la esfera de integración.

La metodología empleada para las mediciones de los espectros de reflectancia y transmitancia es similar a la descrita en Satuf y col. (2005) para obtener las propiedades ópticas de TiO_2 en suspensión. Sin embargo, en el presente trabajo, esta metodología fue modificada para medir las placas de vidrio de borosilicato sin recubrimiento y recubiertas con TiO_2 . Las lecturas fueron realizadas en la región UV, con longitudes de onda comprendidas entre 300 y 400 nm.

Las configuraciones de la esfera integradora para realizar las mediciones se muestran esquemáticamente en las **Figuras 4.1 b-e**.



TRANSMITANCIA



REFLECTANCIA

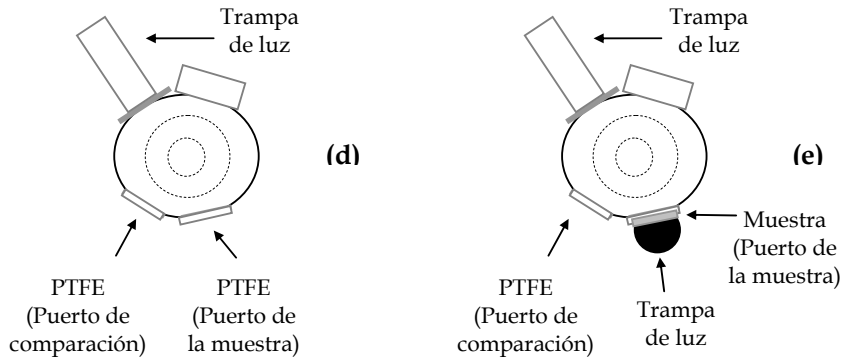


Figura 4.1. (a) Esquema general del espectrofotómetro Optronic OL serie 750. (b)-(e) Configuraciones de la esfera de integración: (b) y (c), mediciones de transmitancia; (d) y (e), mediciones de reflectancia.

Para las mediciones de transmitancia difusa, dos estándares de reflectancia de PTFE (politetrafluoroetileno) se colocaron en los puertos de comparación y muestra de la esfera. La lectura del 100% de transmitancia se obtuvo contra aire (**Fig. 4.1-b**). Para medir la transmitancia de la muestra, el vidrio recubierto con el catalizador fue colocado en el compartimento de la muestra (**Fig. 4.1-c**)

Para las mediciones de reflectancia difusa, el estándar de reflectancia PTFE se utilizó como referencia en el puerto de comparación. La lectura de 100% de reflectancia se obtuvo mediante la colocación de otro estándar de PTFE en el puerto de muestra (**Fig. 4.1-d**). Para medir la reflectancia de la muestra, el vidrio con el TiO_2 fue colocado en el puerto de muestra, y la parte posterior de dicha muestra fue cubierta por una trampa de luz que absorbe toda la radiación transmitida, manteniendo el estándar PTFE en el puerto de comparación (**Fig. 4.1-e**).

4.4.3. CÁLCULO DE LA RADIACIÓN ABSORBIDA

La velocidad superficial de absorción de fotones por las películas catalíticas, $e_f^{a,s}$, promediada sobre el área irradiada A_{irr} , puede expresarse como (Briggiler Marcó y col., 2011):

$$\langle e_f^{a,s} \rangle_{A_{irr}} = \langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} - \langle q_{f,tr} \rangle_{A_{irr}} - \langle q_{f,rf} \rangle_{A_{irr}} = \langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} \alpha_f \quad (4.1)$$

donde $q_{f,in}$ es el flujo radiativo local que alcanza la placa recubierta, $q_{f,tr}$ es el flujo radiativo local transmitido a través de la placa catalítica, $q_{f,rf}$ es el flujo radiativo

local reflejado por la superficie de TiO₂, y α_f es la fracción de la energía absorbida por la película de TiO₂. De la ecuación 4.1, α_f puede calcularse como:

$$\alpha_f = \frac{\langle q_{f,in} \rangle_{A_{ir}} - \langle q_{f,tr} \rangle_{A_{ir}} - \langle q_{f,rf} \rangle_{A_{ir}}}{\langle q_{f,in} \rangle_{A_{ir}}} \quad (4.2)$$

Para calcular α_f , se empleó el método de radiación neta (net-radiation method) (Siegel y Howell, 2002). Este método considera una serie de ventanas paralelas compuestas por un grupo de m idénticas placas translúcidas y un grupo de n placas idénticas. De la **Figura 4.2**, se observa que una cantidad R_m de la energía incidente unitaria es reflejada en el grupo de m placas, una cantidad T_m es transmitida, y una cantidad A_m es absorbida. Continuando con el proceso de reflexión, absorción y transmisión en las n placas, surgen los términos presentes en la **Figura 4.2**. Sumando los términos reflejados y transmitidos para el sistema de $m + n$ placas se obtiene:

$$R_{m+n} = R_m + R_n T_m^2 (1 + R_m R_n + R_m^2 R_n^2 + \dots) = R_m + \frac{R_n T_m^2}{1 - R_m R_n} \quad (4.3)$$

$$T_{m+n} = T_m T_n (1 + R_m R_n + R_m^2 R_n^2 + \dots) = \frac{T_m T_n}{1 - R_m R_n} \quad (4.4)$$

La energía total absorbida será igual a $1 - R_{m+n} - T_{m+n}$. Si suponemos que m representa el recubrimiento de TiO₂, y n la placa de vidrio, entonces las expresiones matemáticas finales utilizadas para calcular la fracción de la energía incidente transmitida (T), reflejada (R) y absorbida (α), están dadas por:

$$T_{fg} = \frac{T_f T_g}{1 - R_f R_g} \quad (4.5)$$

$$R_{fg} = R_f + \frac{R_g T_f^2}{1 - R_f R_g} \quad (4.6)$$

$$\alpha_f = 1 - T_f - R_f \quad (4.7)$$

donde f, g y fg representan las propiedades ópticas de la película de TiO₂ (film), vidrio (glass) y película+vidrio (film+glass), respectivamente. Los valores de T_{fg} y R_{fg} se obtuvieron mediante medidas espectrofotométricas de transmitancia y reflectancia difusa de las placas recubiertas, respectivamente. Cabe señalar que estas cantidades dependen de la longitud de onda de la radiación incidente.

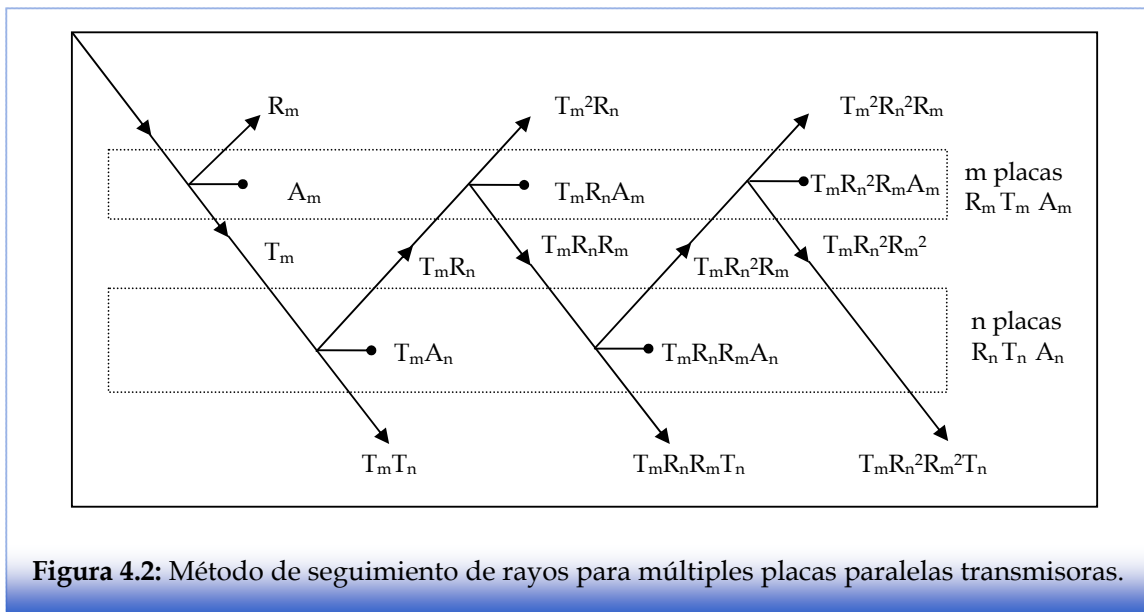


Figura 4.2: Método de seguimiento de rayos para múltiples placas paralelas transmisoras.

4.5. IRRADIACIÓN DE LAS MUESTRAS Y MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS ESPOROS

Se siguió el mismo procedimiento detallado en la **Sección 2.4.3 y 2.4.4**. Las placas con la alícuota de esporos, luego de ser secadas en estufa, fueron colocadas en el compartimiento de irradiación y expuestas a la radiación UV-A durante diferentes períodos de tiempo (2, 4, 6 u 8 h).

La disminución de los esporos viables en función del tiempo de irradiación fue ajustada con la ecuación exponencial:

$$N = N_0 \exp(-kt) \quad (4.8)$$

donde N [UFC cm⁻²] es la concentración de esporos bacterianos viables en el tiempo t [h], N_0 [UFC cm⁻²] la concentración inicial de esporos, y k [h⁻¹] la constante cinética.

4.6. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA FOTOCATALÍTICA

Se evaluaron dos tipos de eficiencias de inactivación fotocatalítica: la eficiencia fotónica η_{app} , también conocida como eficiencia cuántica aparente, y la eficiencia cuántica de inactivación η_{abs} (o eficiencia absoluta).

η_{app} se define como la relación entre la velocidad inicial de inactivación fotocatalítica y el flujo de energía de radiación que alcanza la placa recubierta con TiO₂, en todo el rango de longitudes de onda bajo consideración:

$$\eta_{\text{app}} = \frac{-\left(\frac{dN}{dt}\right)|_{t=0}}{\langle q_{f,\text{in}} \rangle_{A_{\text{irr}}}} \quad (4.9)$$

donde $\langle q_{f,\text{in}} \rangle_{A_{\text{irr}}}$ es el flujo de radiación (promediado en el área) que llega a la placa recubierta. El valor de $\langle q_{f,\text{in}} \rangle_{A_{\text{irr}}}$, obtenido experimentalmente usando un radiómetro (**Sección 4.1**), fue de $1,21 \times 10^{19}$ fotón $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$.

Por otro lado, η_{abs} puede definirse como el cociente entre la velocidad inicial de inactivación fotocatalítica y el flujo de energía de radiación absorbida por la película recubierta dentro del rango de longitudes de onda utilizado:

$$\eta_{\text{abs}} = \frac{-\left(\frac{dN}{dt}\right)|_{t=0}}{\langle e_f^{a,s} \rangle_{A_{\text{irr}}}} = \frac{-\left(\frac{dN}{dt}\right)|_{t=0}}{\langle q_{f,\text{in}} \rangle_{A_{\text{irr}}} \sum_{\lambda} \alpha_{f,\lambda} \varphi_{\lambda}} \quad (4.10)$$

donde φ_{λ} es la función de distribución normalizada de las longitudes de onda que alcanzan las placas recubiertas. φ_{λ} se calcula considerando la emisión espectral de las lámparas y la absorción de la radiación del vidrio de borosilicato que separa las lámparas del compartimiento de irradiación.

4.7. RESULTADOS

4.7.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLACAS FOTOCATALÍTICAS

4.7.1.1. Determinación espectrofotométrica de la cantidad de catalizador sobre las placas

La cantidad de TiO₂ depositada sobre las placas de vidrio de borosilicato, medidas por la determinación espectrofotométrica adaptada de Jackson y col. (1991), se muestra en la **Tabla 4.1**, donde cada determinación se llevó a cabo por triplicado.

Como se esperaba, se observó un aumento gradual en el contenido de TiO₂ [mg cm⁻²] con el número de capas de recubrimiento.

Tabla 4.1. Cantidad de TiO₂ depositado en las placas de vidrio

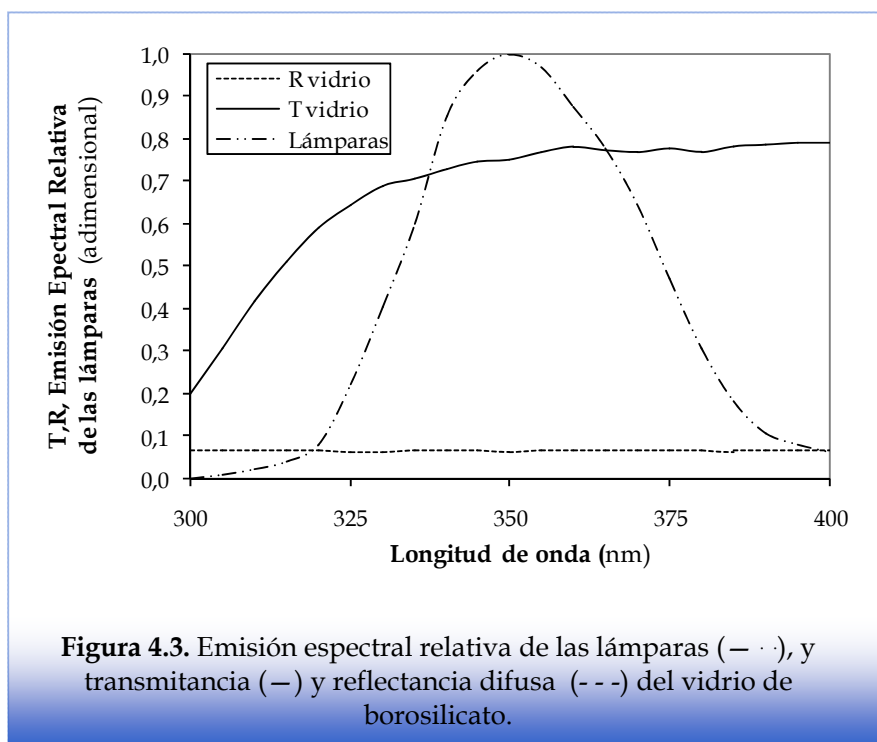
Recubrimiento	TiO ₂ [mg cm ⁻²]		
	1 capa	2 capas	3 capas
Degussa P-25	1,26	1,77	2,13
Sol-Gel	0,05	0,11	0,16
Sol-Gel/Degussa	0,58	2,01	----

4.7.1.2. Caracterización óptica

La **Figura 4.3** muestra la emisión espectral de las lámparas, con un máximo en 350 nm, así como la transmitancia y reflectancia difusa del vidrio de borosilicato. La **Figura 4.4** presenta los espectros de reflectancia y transmitancia difusa del vidrio de

borosilicato recubierto con diferente número de capas de TiO_2 Degussa P-25, Sol-Gel y Sol-Gel/Degussa.

Se observaron diferentes comportamientos ópticos para cada tipo de recubrimiento, en relación directa con la cantidad de TiO_2 depositado sobre cada muestra. Los recubrimientos de Degussa y Degussa/Sol-Gel presentaron absorciones significativamente mayores que las muestras de Sol-Gel, especialmente a longitudes de onda inferiores a 375 nm. Por otro lado, se observó un aumento gradual en la absorción de la radiación con el número de capas para los tres tipos de recubrimientos. Estos resultados experimentales, junto con otras características de las películas, se analizan en la **Sección 4.8**.



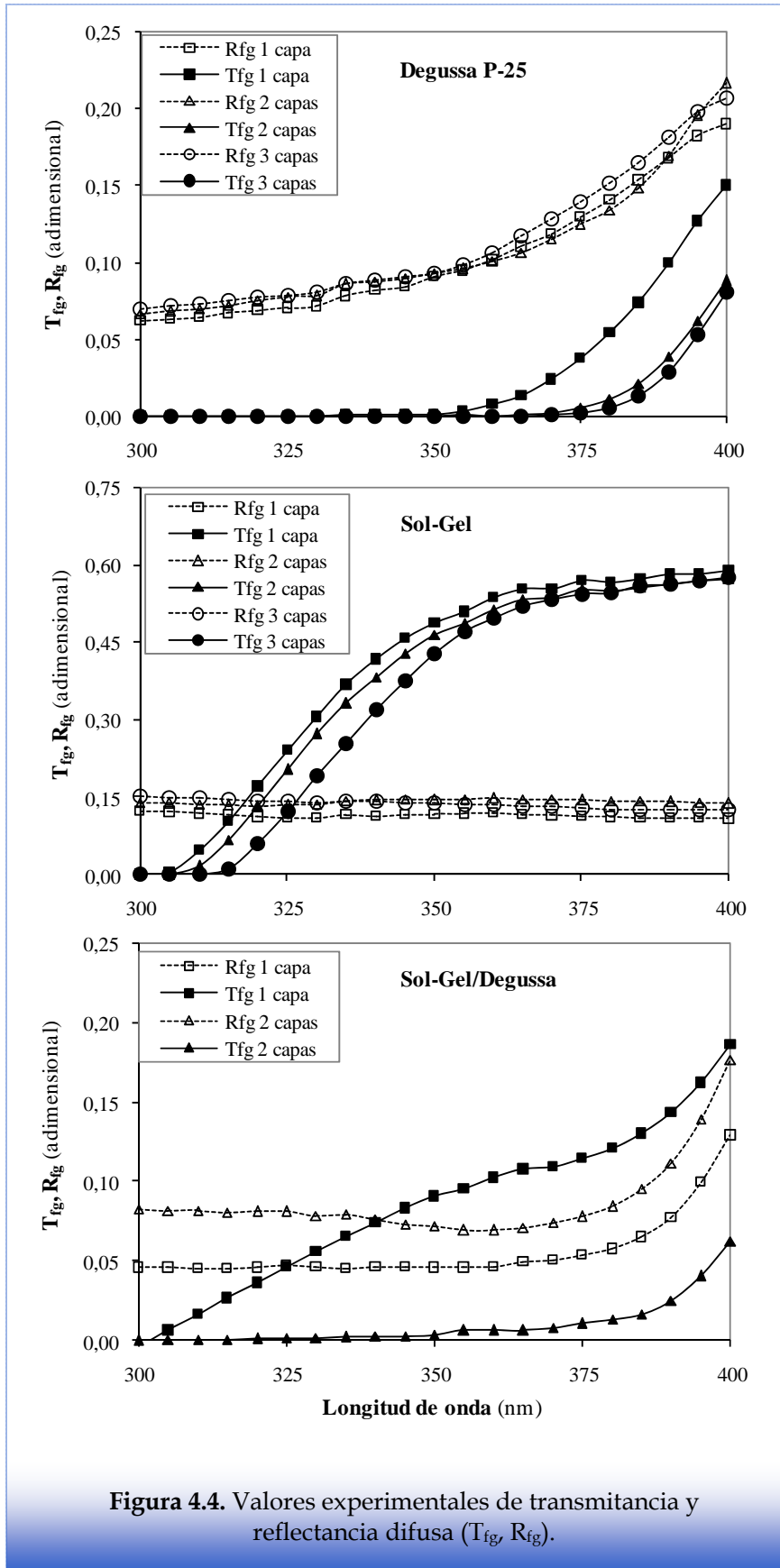


Figura 4.4. Valores experimentales de transmitancia y reflectancia difusa (T_{fg} , R_{fg}).

De las ecuaciones 4.5 y 4.6, y utilizando los valores experimentales de transmitancia y reflectancia presentados en las **Figuras 4.3** y **4.4**, podemos obtener T_f y R_f , y luego calcular α_f (ec. 4.7) entre 300 y 400 nm. La **Tabla 4.2** muestra un ejemplo de los resultados obtenidos a la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de las lámparas (350 nm). La fracción absorbida (α_f) es relativamente alta para los recubrimientos realizados con TiO₂ Degussa P-25 y TiO₂ Sol-Gel/Degussa, mientras que para el recubrimiento TiO₂ Sol-Gel dicha fracción es considerablemente menor.

Tabla 4.2. Valores calculados de T_f , R_f y α_f para 350 nm

	TiO ₂ Degussa P-25			TiO ₂ Sol-Gel			TiO ₂ Sol-Gel/Degussa	
	1 capa	2 capas	3 capas	1 capa	2 capas	3 capas	1 capa	2 capas
T_f	0,002	<0,001	<0,001	0,646	0,615	0,565	0,121	0,005
R_f	0,091	0,093	0,094	0,091	0,120	0,120	0,045	0,072
α_f	0,907	0,907	0,906	0,263	0,265	0,318	0,834	0,923

Para completar la caracterización de las placas fotocatalíticas, se obtuvieron imágenes de la superficie del recubrimiento con un microscopio electrónico de barrido (“SEM”: *Scanning Electron Microscope*, marca JEOL, modelo JSM 35C). La **Figura 4.5** muestra las imágenes correspondientes a los tres recubrimientos ensayados con dos capas. El recubrimiento obtenido con el método Sol-Gel (**Fig. 4.5 a**) presenta la superficie más uniforme. La imagen del catalizador Degussa P-25 (**Fig. 4.5 b**) revela una superficie más irregular, donde se observan las regiones oscuras del vidrio sin recubrir. La superficie más heterogénea se obtuvo con la técnica mixta (**Fig. 4.5 c,d**), con irregularidades considerables en toda la placa. Esta característica se

observa mejor en la **Figura 4.5 d**, a menor aumento. Cabe señalar que la adherencia del recubrimiento mixto al soporte fue deficiente.

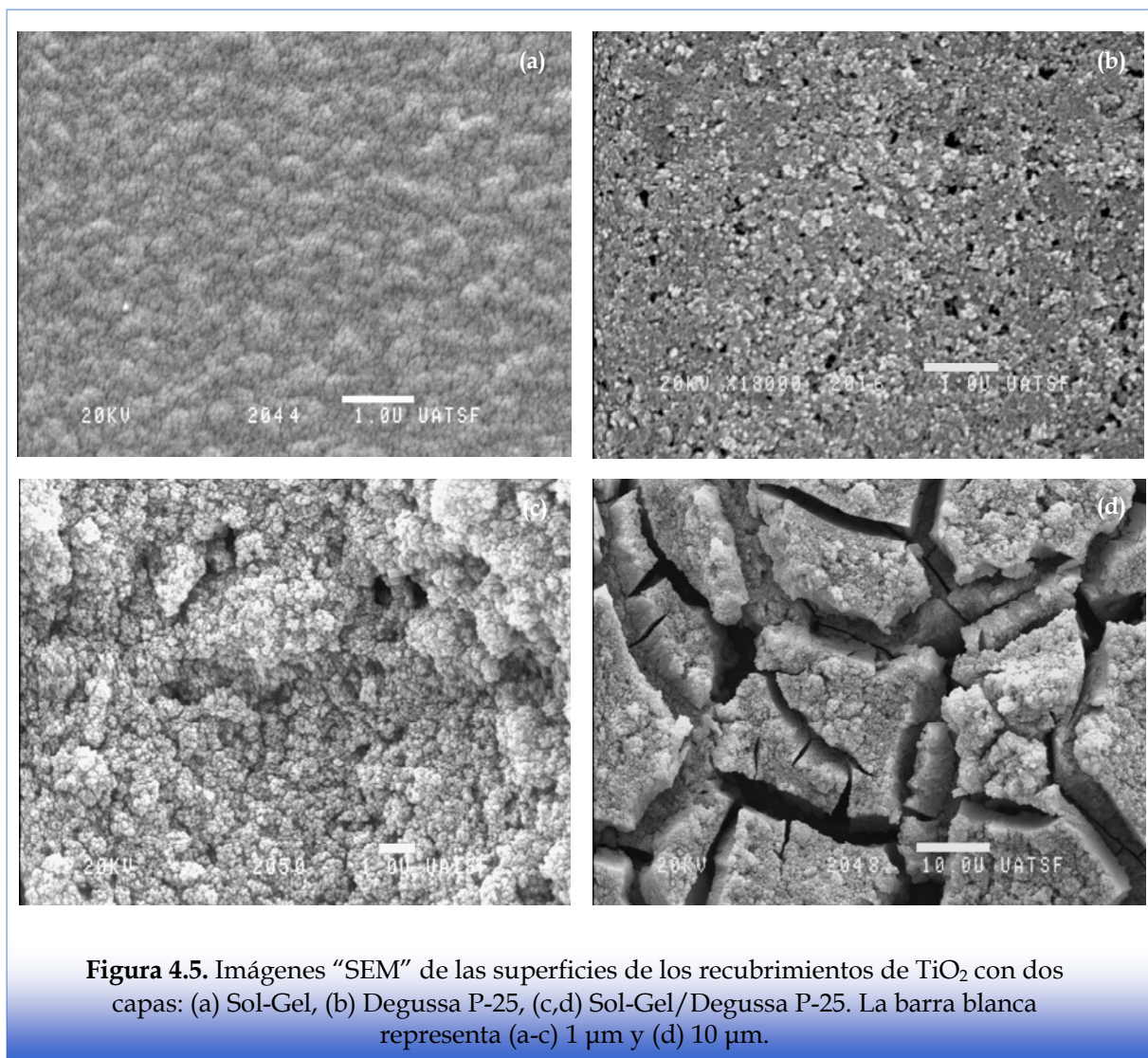
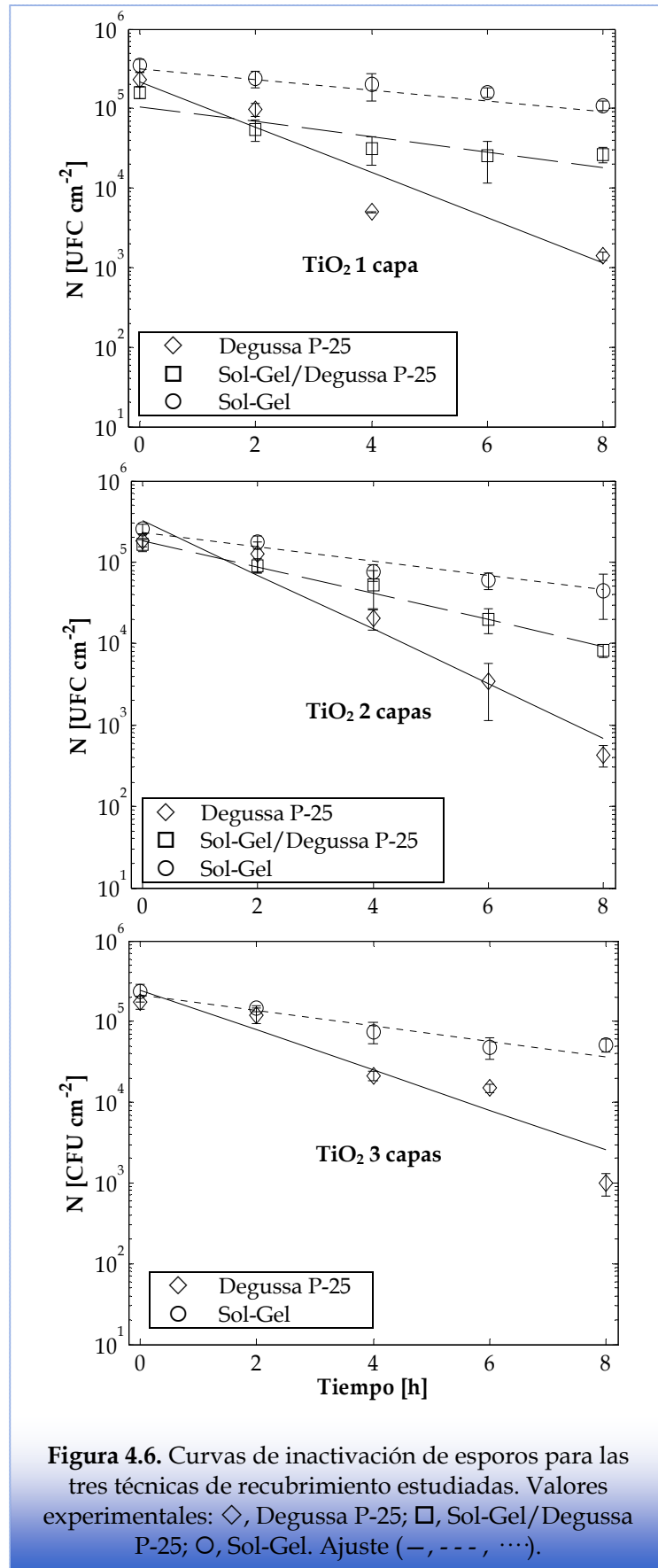


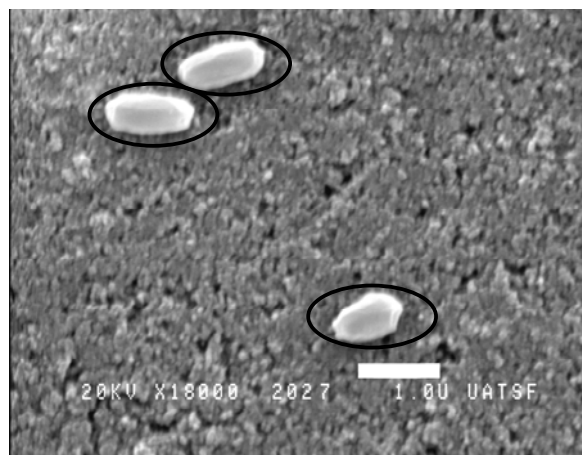
Figura 4.5. Imágenes “SEM” de las superficies de los recubrimientos de TiO₂ con dos capas: (a) Sol-Gel, (b) Degussa P-25, (c,d) Sol-Gel/Degussa P-25. La barra blanca representa (a-c) 1 μm y (d) 10 μm .

4.7.2. RESULTADOS DE INACTIVACIÓN DE ESPOROS

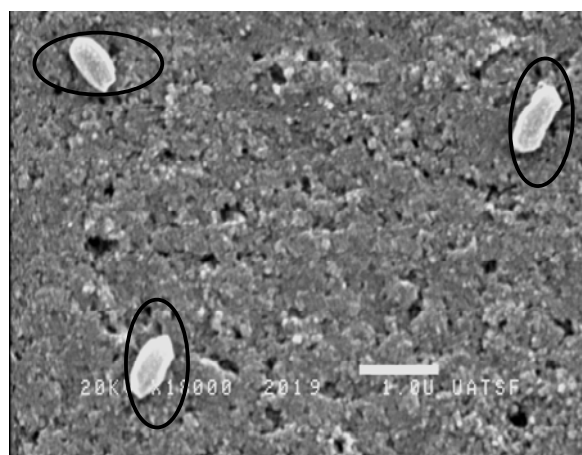
La **Figura 4.6** muestra los resultados experimentales y el ajuste utilizando la ecuación 4.8 obtenidos en la inactivación fotocatalítica de esporos de *Bacillus subtilis* sobre las placas recubiertas con TiO₂ Degussa, Sol-Gel y Sol-Gel/Degussa. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 99%. Cabe señalar que no fueron observados cambios detectables en la supervivencia de esporos cuando las muestras fueron mantenidas en la oscuridad o en ausencia de catalizador. Puede observarse que, cuando los esporos de *B. subtilis* fueron irradiados sobre superficies de TiO₂, su viabilidad disminuyó significativamente y aumentó el grado de inactivación con el tiempo de irradiación. Los valores de los parámetros de la ecuación 4.8, N_0 y k , para cada recubrimiento y para cada número de capas, se muestran en la **Tabla 4.3**. Por lo observado en la figura y la tabla mencionadas previamente, se puede advertir que la mayor velocidad de inactivación se obtiene con el catalizador Degussa P-25 con dos capas.

Para observar el efecto de la fotocatalisis sobre la estructura externa del espora, se tomaron imágenes "SEM" de los esporos irradiados sobre dos capas del catalizador Degussa P-25 en diferentes tiempos (**Fig. 4.7**). Los esporos están señalados con círculos negros, siempre del mismo tamaño para las tres imágenes. Se observa que a medida que transcurre el tiempo de irradiación, el tamaño del espora se reduce y se pierde la forma inicial ovalada característica del mismo.

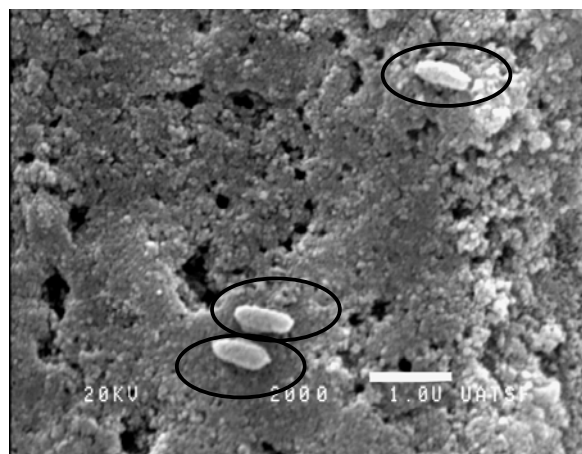




(a)



(b)



(c)

Figura 4.7. Imágenes “SEM” de la inactivación fotocatalítica de esporos sobre dos capas del catalizador Degussa P-25: (a) sin irradiar, (b) 4 h de irradiación, (c) 8 h de irradiación.

Tabla 4.3. Parámetros estimados de la ecuación 4.8.

Recubrimiento	Parámetro					
	N ₀ [UFC cm ⁻²] × 10 ⁻⁵			k [h ⁻¹]		
	1 capa	2 capas	3 capas	1 capa	2 capas	3 capas
Degussa P-25	2,13	3,20	2,48	0,655	0,767	0,572
Sol-Gel	2,87	2,31	2,18	0,139	0,202	0,225
Sol-Gel/Degussa	1,06	1,85	----	0,221	0,375	----

4.7.3. EVALUACIÓN DE EFICIENCIAS FOTOCATALÍTICAS

Para calcular las eficiencias fotónicas y cuánticas, se necesita conocer los valores de las velocidades iniciales de inactivación (numerador de las ecuaciones 4.9 y 4.10). Estos valores se calcularon a partir de la pendiente de las curvas de inactivación (**Figura 4.6**) y se muestran en la **Tabla 4.4**. Los valores de la energía absorbida por las placas recubiertas (denominador de la ecuación 4.10) también se presentan en dicha tabla. El denominador de la ecuación 4.9 (flujo de radiación incidente) es $1,21 \times 10^{19}$ fotón cm⁻² h⁻¹.

Tabla 4.4. Velocidad inicial de inactivación y energía absorbida por cada recubrimiento

Recubrimientos	$-\frac{dN}{dt}_{t=0}$ [UFC cm ⁻² h ⁻¹] × 10 ⁻⁵			$\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}}$ [fotón cm ⁻² h ⁻¹] × 10 ⁻¹⁹		
	1 capa	2 capas	3 capas	1 capa	2 capas	3 capas
Degussa P-25	1,400	2,450	1,420	1,050	1,070	1,070
Sol-Gel	0,399	0,467	0,491	0,337	0,341	0,403
Sol-Gel/Degussa	0,234	0,694	----	0,994	1,100	----

Los resultados finales de ambas eficiencias fotocatalíticas se resumen en la **Tabla 4.5** para cada recubrimiento estudiado y para las diferentes capas ensayadas. Debe señalarse que η_{abs} representa más claramente la eficiencia de inactivación fotocatalítica de los esporos bacterianos porque considera no sólo la radiación que alcanza la placa sino la energía efectivamente absorbida por la película catalítica.

Tabla 4.5. Eficiencias de inactivación fotocatalítica

Recubrimientos	Eficiencias Fotocatalíticas [UFC fotón ⁻¹]					
	$\eta_{\text{app}} \times 10^{14}$			$\eta_{\text{abs}} \times 10^{14}$		
	1 capa	2 capas	3 capas	1 capa	2 capas	3 capas
Degussa P-25	1,16	2,05	1,18	1,32	2,29	1,33
Sol-Gel	0,33	0,39	0,41	1,18	1,37	1,22
Sol-Gel/Degussa	0,19	0,58	----	0,24	0,63	----

4.8. DISCUSIÓN

En relación con el recubrimiento Degussa P-25, un alto porcentaje de la radiación incidente es absorbido por las placas con 1, 2 y 3 capas, como lo demuestran los valores de α_f en la **Tabla 4.2** y $\langle e^{a,s} \rangle_{\text{Airr}}$ en la **Tabla 4.4**. Además, se encontró un incremento apreciable del TiO₂ inmovilizado con el aumento del número de capas (**Tabla 4.1**). Cabe señalar que la mayor velocidad de inactivación fue obtenida con dos capas. Debido a que la cantidad de energía absorbida es similar para las tres muestras del recubrimiento con Degussa P-25, la eficiencia cuántica también es mayor para la placa con dos capas de TiO₂. De hecho, la mayor eficiencia de todas las muestras estudiadas se obtuvo con el recubrimiento de Degussa con dos

capas: $\eta_{\text{abs}} = 2,29 \times 10^{-14}$ UFC fotón⁻¹ (**Tabla 4.5**). Entre una y dos capas, se obtuvo un incremento apreciable en la cantidad de TiO₂ inmovilizado (**Tabla 4.1**). Por lo tanto, es razonable obtener una mayor inactivación de los esporos por el aumento en la cantidad de fotocatalizador disponible para interactuar con los microorganismos. Con tres capas, aunque la cantidad de catalizador es superior a la obtenida con dos capas, la velocidad de inactivación es menor, y similar a la encontrada con una capa. Una posible explicación puede encontrarse en la rugosidad de la superficie de la película con tres capas. Los esporos bacterianos podrían quedar atrapados en las irregularidades del recubrimiento donde la radiación no puede llegar (Caballero y col., 2009). Además, una excesiva producción de radicales hidroxilo podría conducir a la formación de radicales hidroperóxidos, que son menos efectivos para la inactivación de bacterias (Rincon y Pulgarin, 2003). A altas concentraciones de TiO₂, como es el caso de tres capas, las reacciones representadas por las ecuaciones 4.11 y 4.12 podrían contribuir a la disminución de la inactivación bacteriana. En la ecuación 4.11, $\cdot\text{OH}$ dimeriza para formar H₂O₂, que a su vez, produce HO₂ \cdot (ec. 4.12). El radical hidroperóxido es menos reactivo que el radical hidroxilo y no contribuye significativamente al proceso oxidativo.



Asimismo, un aumento en la velocidad de recombinación de electrones y huecos producidos por el exceso de partículas catalíticas podría contribuir a la disminución de la velocidad de inactivación (Caballero y col., 2009). Estos resultados

concuerdan con los obtenidos por van Grieken y col. (2009) para reactores de pared y de lecho fijo empleados para la inactivación de suspensiones acuosas de *E. coli*. La inmovilización de TiO₂ fue realizada bajo el mismo procedimiento utilizado en el presente trabajo. Ellos encontraron la máxima actividad con dos capas del recubrimiento y obtuvieron una clara disminución de la velocidad de inactivación cuando el reactor estaba recubierto con tres capas de catalizador.

En cuanto a los recubrimientos realizados con la técnica de Sol-Gel, se encontró un aumento gradual en el contenido de TiO₂ con el número de capas, dando como resultado un incremento en la absorción de la radiación, velocidad de inactivación y eficiencia fotónica. Sin embargo, en cuanto a η_{abs} , la muestra con dos capas fue la más eficiente; en este caso, puede observarse de la **Tabla 4.4** que el aumento de la energía absorbida por el recubrimiento (denominador de la ecuación 4.10) es mayor que el ligero aumento de la velocidad de inactivación inicial (numerador de la ecuación 4.10). Vale la pena destacar que la cantidad de catalizador y el porcentaje de absorción de la radiación de las películas obtenidas con Sol-Gel son significativamente inferiores a los obtenidos con el recubrimiento de Degussa, aunque los valores de la eficiencia cuántica de inactivación son similares.

Finalmente, se encontró un incremento significativo en la cantidad de TiO₂ inmovilizado con la técnica de Sol-Gel/Degussa entre una y dos capas. Se obtuvo un aumento en la absorción de la radiación, la velocidad inactivación y los parámetros de eficiencia con el número de capas. La máxima absorción de todas las muestras ensayadas se obtuvo con dos capas de la técnica mixta (92%). Observando el espectro de transmitancia y reflectancia, podemos afirmar que el restante 8% de la radiación

se pierde por reflexión (la transmitancia de esta muestra es casi nula). Aunque los recubrimientos obtenidos con la técnica de Sol-Gel/Degussa contienen altas cantidades de TiO₂ y absorben un alto porcentaje de la radiación incidente, las velocidades de inactivación fueron similares a las obtenidas con las muestras de Sol-Gel y los valores de η_{abs} son los más bajos en comparación con las otras dos técnicas de recubrimiento. La explicación a este comportamiento puede atribuirse al aumento indeseado de la recombinación de pares de electrones y huecos, y radicales hidroxilo, como se expuso anteriormente en el caso de tres capas del recubrimiento Degussa. Una deficiencia en el contacto de los esporos en la superficie del recubrimiento mixto también puede explicar los valores de velocidad de inactivación relativamente bajos (Faure y col., 2011). Esta posibilidad está respaldada por las imágenes de "SEM", que revelaron irregularidades significativas en la superficie del recubrimiento mixto (Fig. 4.5 c. d).

Los valores de eficiencia obtenidos en este trabajo (Zacarías y col., 2012) pueden compararse con los reportados por Briggiler Marcó y col. (2011). Ellos estudiaron la eficiencia de inactivación fotocatalítica de diez bacteriófagos dispersados en placas recubiertas de TiO₂ expuestas a la radiación UV-A durante diferentes períodos de tiempo. La mayor eficiencia de inactivación, obtenida para el bacteriófago J-1, fue de $2,273 \times 10^{-12}$ UFP fotón⁻¹. Este valor de eficiencia es dos órdenes de magnitud más alto que el encontrado en nuestro trabajo para el recubrimiento TiO₂ Degussa P-25 con dos capas (Tabla 4.5). Esta variación puede atribuirse a las diferencias estructurales entre el bacteriófago J-1 y el esporo de *B. subtilis*. En general, las estructuras de los virus son mucho más simples que las estructuras de un esporo

bacteriano. Asimismo, Marugán y col. (2008) estudiaron la desinfección fotocatalítica de *E. coli* en suspensiones acuosas. También encontraron valores de eficiencia fotónica mayores a la obtenida en este trabajo, en el orden de 10^{-11} UFC fotón⁻¹. En este caso, el microorganismo modelo era una bacteria vegetativa, siendo mucho menos complejo que un esporo bacteriano y menos resistente a la inactivación.

CAPÍTULO 5

EFICIENCIAS DE FOTOCATALIZADORES DE TiO₂ DOPADOS CON PLATA

En este capítulo se compara la velocidad de inactivación de recubrimientos de TiO₂ dopados con diferentes concentraciones de plata (Ag) para la inactivación fotocatalítica de esporos de Bacillus subtilis secos dispersados sobre películas de TiO₂ bajo radiación UV-A. En base a los resultados obtenidos previamente, se seleccionó la técnica de recubrimiento con mayor eficiencia: TiO₂ Degussa P-25 con 2 capas. A las placas recubiertas con dicho catalizador se le depositaron diferentes concentraciones de Ag y se ensayó su actividad para inactivar esporos.

Asimismo, se determinó la fracción de energía absorbida por los recubrimientos y se calcularon parámetros de eficiencia para comparar su rendimiento.

5.1. EXPERIMENTAL

Los ensayos experimentales fueron llevados a cabo en el reactor fotocatalítico detallado en la **Sección 2.1**, con las modificaciones mencionadas en la **Sección 4.1**.

5.1.1. PREPARACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS DOPADOS CON Ag

Se realizaron los recubrimientos con dos capas del catalizador TiO₂ Degussa P-25 (Evonik Degussa) descrito en la **Sección 4.2 y 4.3**.

A continuación, se depositaron diferentes concentraciones de Ag a través de una técnica de fotodeposición modificada (van Grieken y col., 2009) sobre las placas recubiertas con dos capas de TiO₂. La incorporación de plata se llevó a cabo sumergiendo las placas de vidrio recubiertas con TiO₂ en soluciones de nitrato de plata (Merck, AgNO₃ en HNO₃, 0,5 mol/L, 1000 mg/L) con la concentración deseada, agregando 2-propanol como compuesto orgánico de sacrificio, el cual actúa como “scavenger” (agente neutralizante) de los radicales hidroxilo y los huecos generados. Posteriormente, las placas fueron irradiadas con lámparas de UV-A (lámparas Philips actínicas BL de 20 W) durante 2 h. Luego, las placas se secaron en estufa a 100 °C durante 15 minutos. Las placas con el fotocatalizador Ag/TiO₂ inmovilizado fueron directamente utilizadas en las pruebas fotocatalíticas después de la etapa de secado.

5.1.2. CARACTERIZACION DE LOS RECUBRIMIENTOS CON Ag

La cantidad de plata incorporada a las placas recubiertas fue medida por espectroscopía de absorción atómica (EAA, Perkin Elmer Analyst 800). La técnica analítica para realizar la cuantificación involucró, en primer lugar, el agregado de ácido nítrico concentrado a las placas recubiertas de Ag/TiO₂. Luego, las placas sumergidas en el ácido fueron colocadas en equipo de ultrasonido durante 15 minutos. Seguidamente, una alícuota fue filtrada con un filtro de 0,4 µm para eliminar el catalizador presente en la suspensión, y finalmente el líquido filtrado fue analizado por EAA. Las determinaciones se realizaron por duplicado. La concentración de Ag se expresa en porcentaje peso en peso (% p/p) y se refiere a la masa de Ag en relación con la masa de TiO₂ que contiene cada placa de vidrio.

Además, se realizaron mediciones de reflectancia y transmitancia difusa de las placas recubiertas en un espectrofotómetro Optronic OL serie 750, equipado con una esfera integradora de reflectancia (OL 740-70). La metodología empleada fue la descrita en la **Sección 4.4.2**.

Conjuntamente, los cálculos de la fracción de energía absorbida por los recubrimientos y de los parámetros de eficiencia, se realizaron según lo descrito en las secciones **4.4.3** y **4.6**, respectivamente.

5.1.3. IRRADIACIÓN DE LAS MUESTRAS Y RECUENTO DE LOS ESPOROS VIABLES

La formación y cosecha de esporos se realizó siguiendo el procedimiento detallado en la **Sección 2.4.2**. Para la irradiación de las muestras de esporos y evaluación de su viabilidad, se siguió el procedimiento descrito en la **Sección 2.4.3** y **2.4.4**. Las placas con la alícuota de esporos, luego de ser secadas en estufa, fueron colocadas en el compartimiento de irradiación y expuestas a la radiación UV-A durante diferentes períodos de tiempo (2, 4 y 6 h).

Asimismo, la disminución de la cantidad de esporos viables en función del tiempo de irradiación fue ajustada con la ecuación exponencial 4.8 (**Sección 4.5**).

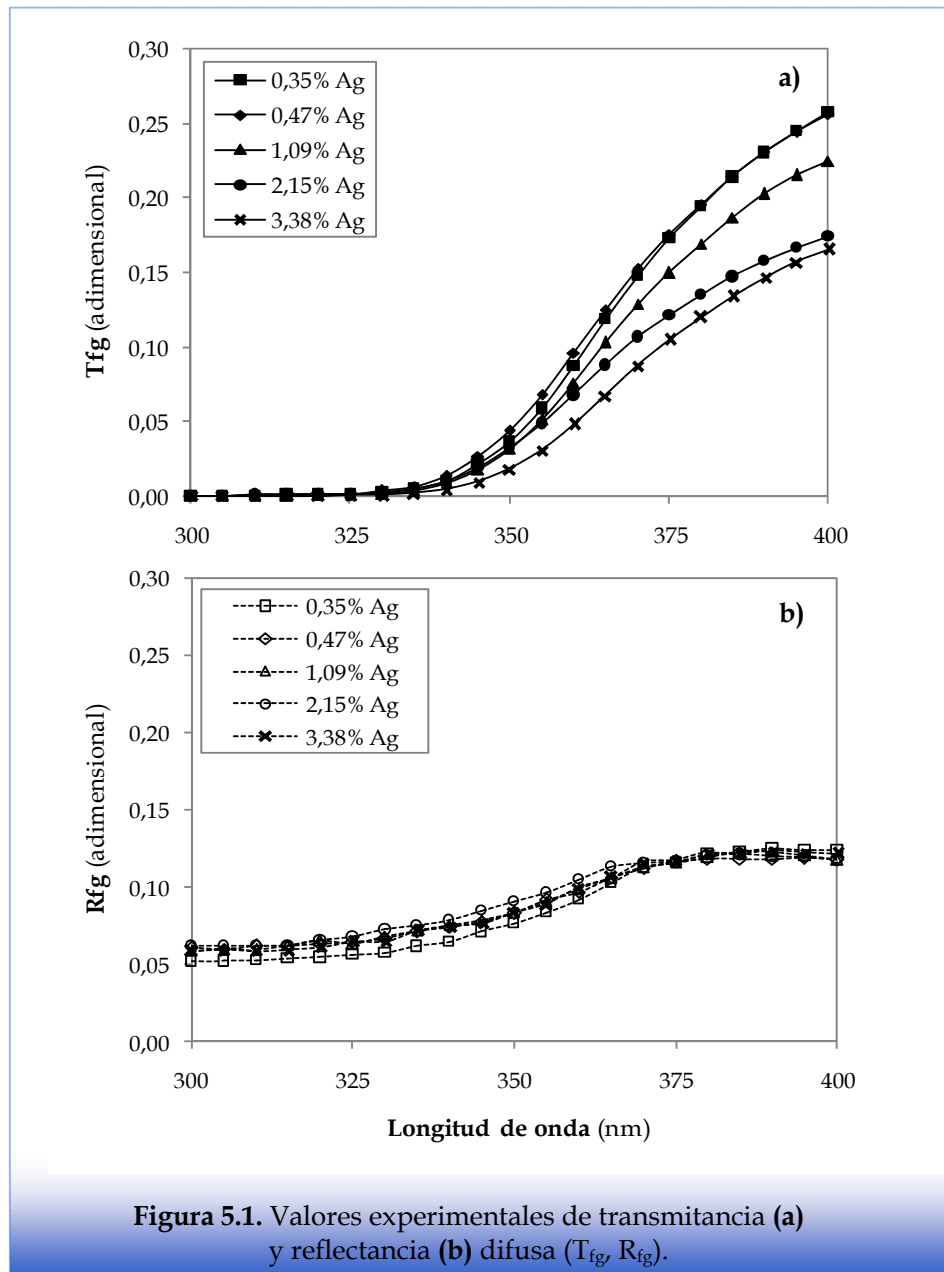
5.2. RESULTADOS

5.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL RECUBRIMIENTO

La **Figura 5.1** presenta los espectros de transmitancia y reflectancia difusa del vidrio de borosilicato recubierto con dos capas de TiO₂ Degussa P-25 y con diferentes concentraciones de Ag depositadas.

En la **Figura 5.1-a** se observa que, desde 300 nm hasta 325 nm aproximadamente, el comportamiento es muy similar para todos los recubrimientos ensayados, mostrando valores de transmitancia prácticamente nulos. A longitudes de onda mayores se observa que, a medida que aumenta el contenido de Ag en las placas, disminuye la transmitancia de la placa fotocatalítica.

En la **Figura 5.1-b** se observa que la reflectancia difusa para todas las muestras fue muy similar. Se obtuvieron valores crecientes de reflectancia hasta 375 nm, y luego este valor se mantuvo aproximadamente constante.



A partir de las ecuaciones 4.5 y 4.6 (Cap. 4), y utilizando los valores experimentales de transmitancia y reflectancia presentados en la **Figura 5.1**, podemos obtener T_f y R_f , y luego calcular α_f (ec. 4.7) entre 300 y 400 nm. La **Tabla 5.1** muestra los resultados obtenidos a la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de las lámparas (350 nm). La fracción de energía absorbida (α_f) es alta para todas las concentraciones de Ag depositadas, variando muy poco entre ellas.

Tabla 5.1. Valores calculados de T_f , R_f , y α_f para 350 nm
Recubrimiento (% p/p de Ag)

	0,35	0,47	1,09	2,15	3,38
T_f	0,047	0,057	0,040	0,041	0,023
R_f	0,077	0,083	0,083	0,091	0,084
α_f	0,876	0,860	0,877	0,868	0,893

A fin de completar la caracterización, se obtuvieron imágenes SEM de la superficie de los recubrimientos. La **Figura 5.2** muestra la imagen correspondiente al recubrimiento TiO₂ Degussa P-25 con dos capas con 1,09% p/p de Ag. Se observa una estructura similar a la obtenida para el catalizador TiO₂ Degussa P-25 con dos capas (ver **Fig. 4.5 b**), pero con la presencia de partículas más luminosas sobre la superficie, las cuales poseen gran variabilidad de tamaño y forma.

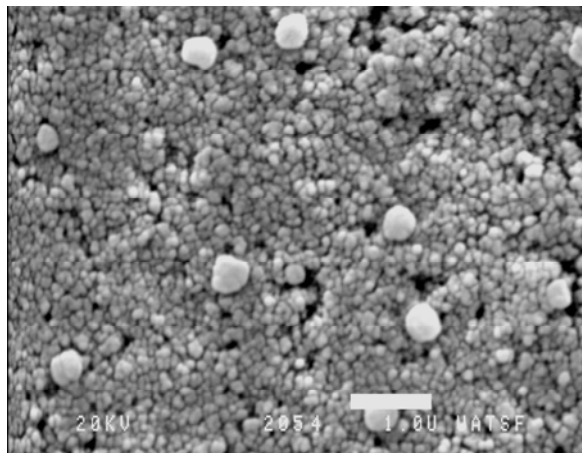


Figura 5.2. Imagen “SEM” de la superficie del recubrimiento de TiO₂ con dos capas de TiO₂ y con 1,09% p/p de Ag. La barra blanca representa 1 μm.

Para conocer la composición de dichas partículas, se realizó un Microanálisis de Rayos X por Sonda de Electrones (EPMA), el cual se efectuó con el equipo de SEM mencionado en la **Sección 4.7.1.2**, equipado con un sistema dispersivo de energía, marca EDAX, para realizar análisis químico elemental por rayos X. Esta técnica permite detectar aquellos elementos cuyo número atómico esté comprendido entre 11 (Sodio) y 92 (Uranio). El análisis químico elemental cualitativo se llevó a cabo tratando el espectro de rayos X con el software del sistema EDAX. Adicionalmente, se realizó un análisis semicuantitativo empleando el método teórico comúnmente denominado SEMIQ, que no requiere del empleo de estándares.

El resultado del análisis sobre las partículas mencionadas fue el siguiente: la mayoría estaba compuesta sólo por Titanio. Se halló Ag en las partículas de tamaño más irregular, pero en baja proporción (entre 5 y 11 % de Ag en relación al Ti). Por lo tanto, se puede concluir que la deposición de Ag no fue homogénea, y que puede

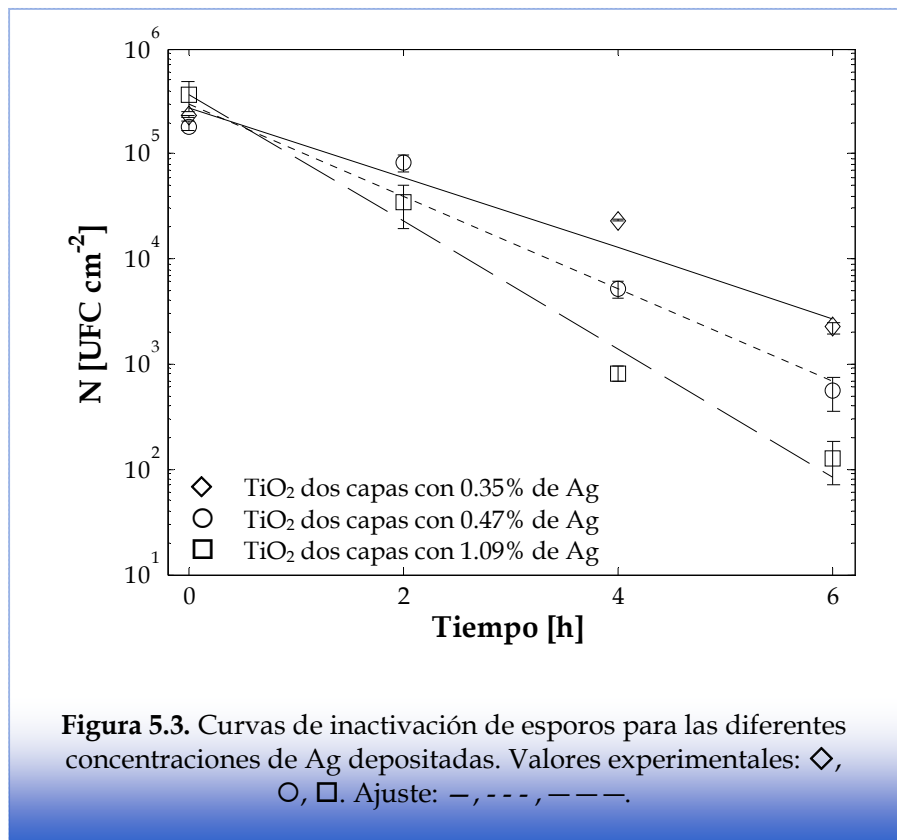
estar presente en partículas de diversos tamaños y formas. El cambio en el aspecto de la superficie del recubrimiento, en comparación con la **Figura 4.5 b**, podría atribuirse a la técnica realizada para la deposición de Ag, donde la placa fotocatalítica fue sumergida en una solución de nitrato de plata durante 2 horas, mientras era irradiada con luz UV-A.

5.2.2. RESULTADOS DE INACTIVACIÓN DE ESPOROS

La **Figura 5.3** muestra los resultados más relevantes obtenidos de la inactivación fotocatalítica de esporos de *Bacillus subtilis* sobre las placas recubiertas con dos capas de TiO₂ Degussa P-25 y con diferentes concentraciones de Ag depositadas. Se puede observar que a medida que aumenta el contenido de Ag en la placa, aumenta la velocidad de inactivación de los esporos. El máximo de inactivación se obtuvo con 1,09% p/p de Ag. Las barras de error representan los intervalos de confianza del 99%. Cabe señalar que no fueron observados cambios detectables en la supervivencia de esporos cuando las muestras fueron mantenidas en la oscuridad. En base a dicho resultado, se descarta una acción bactericida de la plata sobre los esporos cuando las muestras no son irradiadas.

Además, se muestran en la **Tabla 5.2** los valores de la constante cinética k de la ecuación 4.8 (junto con su error de estimación, y R^2) para cada concentración de Ag ensayada. Se observa un aumento de la constante cinética a medida que aumenta el contenido de Ag, obteniéndose el mayor valor con 1,09% p/p de Ag/TiO₂. Sin embargo, para las dos últimas concentraciones de Ag ensayadas, se observa una leve

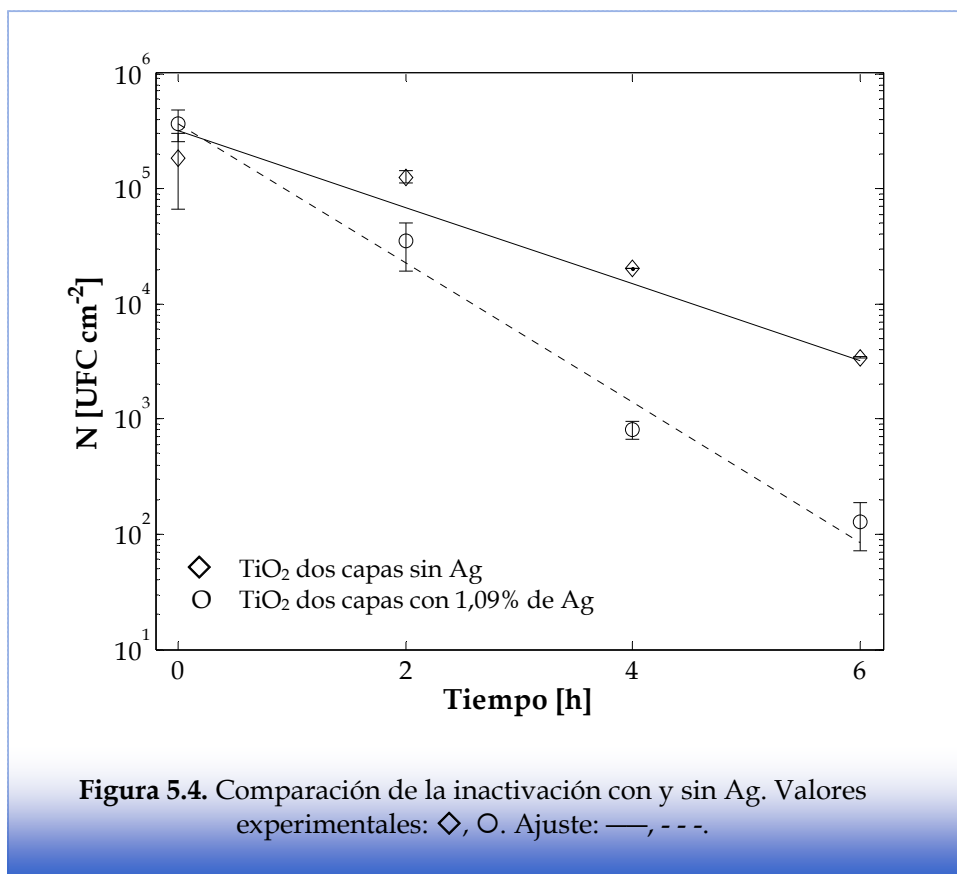
disminución en el valor de la constante k . Cabe señalar que, como se muestra en la **Tabla 5.2**, el error de estimación para estas dos últimas constantes fue relativamente alto.



En la **Figura 5.4** se compara la inactivación de esporos empleando el recubrimiento fotocatalítico con y sin agregado de Ag. En el ensayo realizado con TiO₂ con 1,09% p/p de Ag se obtuvo, luego de 6 h de irradiación, una disminución mayor a 3 órdenes de magnitud (de $3,71 \times 10^5$ a $1,29 \times 10^2$ UFC cm⁻²) en la concentración de esporos. Cuando se empleó el recubrimiento sin Ag, la disminución fue menor a 2 órdenes (de $1,84 \times 10^5$ a $3,40 \times 10^3$ UFC cm⁻²) considerando el mismo tiempo de irradiación.

Tabla 5.2. Parámetros estimados de la ecuación 4.8

Recubrimiento % p/p de Ag	Parámetro		
	k [h ⁻¹]		R ²
	Valor	Error	
0,35	0,771	0,059	0,960
0,47	1,011	0,062	0,953
1,09	1,397	0,078	0,976
2,15	1,102	0,112	0,897
3,38	1,219	0,123	0,899



5.2.3. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOCATALÍTICA

Para calcular las eficiencias fotónicas y cuánticas, se necesita conocer los valores de las velocidades iniciales de inactivación (numerador de las ecuaciones 4.9 y 4.10). Estos valores se calcularon a partir de la pendiente de las curvas de inactivación partiendo de una concentración inicial de esporos de $3,00 \times 10^5$ UFC cm⁻², y se muestran en la **Tabla 5.3**. Los valores de la energía absorbida por las placas recubiertas (denominador de la ecuación 4.10) también se presentan en dicha tabla. El denominador de la ecuación 4.9 (flujo de radiación incidente) es $1,21 \times 10^{19}$ fotón cm⁻² h⁻¹.

Tabla 5.3. Velocidad inicial de inactivación y energía absorbida por cada recubrimiento

Recubrimientos (% p/p)	$-\frac{dN}{dt}_{t=0}$ [UFC cm ⁻² h ⁻¹]	$\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}}$ [fotón cm ⁻² h ⁻¹]
0,35	$2,31 \times 10^5$	$9,94 \times 10^{18}$
0,47	$3,03 \times 10^5$	$9,80 \times 10^{18}$
1,09	$4,19 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{19}$
2,15	$3,31 \times 10^5$	$1,01 \times 10^{19}$
3,38	$3,66 \times 10^5$	$1,04 \times 10^{19}$

Los resultados de ambas eficiencias fotocatalíticas se resumen en la **Tabla 5.4** para las diferentes concentraciones de Ag ensayadas. Se puede observar que el mayor valor de eficiencia fue obtenido con el recubrimiento que contiene 1,09% p/p de Ag.

Tabla 5.4. Eficiencias de inactivación fotocatalítica

Recubrimientos (% p/p)	Eficiencias Fotocatalíticas [UFC fotón ⁻¹]	
	$\eta_{app} \times 10^{14}$	$\eta_{abs} \times 10^{14}$
0,35	1,91	2,33
0,47	2,50	3,09
1,09	3,46	4,18
2,15	2,73	3,27
3,38	3,02	3,53

5.3. DISCUSIÓN

En el desarrollo experimental de este trabajo no se evidenció inactivación de los esporos cuando la placa fotocatalítica no era irradiada con luz UV; es decir que no se observó actividad bactericida de la Ag sola sobre los esporos. En base a lo expuesto en la introducción de esta Tesis (**Sección 1.4**), los mecanismos propuestos para explicar el efecto bactericida de la plata están fundamentados en la estructura de una bacteria vegetativa (Marambio-Jones y Hoek, 2010), la cual posee una disposición en su pared celular y membrana plasmática mucho más vulnerable a los agentes externos que la cubierta y la corteza del esporo. Una bacteria vegetativa posee en la **pared celular** una capa de peptidoglicano, de espesor variable según la especie, y luego la **membrana plasmática**, constituida de una bicapa de fosfolípidos. En cambio, un esporo bacteriano posee una **cubierta** compuesta de múltiples capas proteicas, una **corteza** con una gruesa capa de peptidoglicanos, muy entrelazados, y el **núcleo** deshidratado, con alta concentración de minerales unidos al ácido

dipicolínico, y una alta concentración de pequeñas proteínas ácido-solubles que se unen al ADN y lo protegen.

Por lo anterior, se puede suponer que los esporos no son inactivados por la presencia solamente de la plata, ya que ésta no podría interaccionar con las proteínas de membrana, o ingresar a la célula y generar EROs, y afectar el ADN, entre otros efectos adversos. También podría suponerse que estos efectos ocurren sobre el esporo, pero a velocidades mucho menores que en bacterias vegetativas, y por lo tanto no fueron detectadas en los ensayos realizados en este trabajo.

Con respecto a los ensayos fotocatalíticos, cabe señalar que la mayor velocidad de inactivación fue obtenida con la muestra que contenía 1,09% p/p de Ag. Debido a que la cantidad de energía absorbida es similar para las diferentes concentraciones de plata ensayadas, la eficiencia cuántica también es mayor para la placa con 1,09% p/p de Ag ($\eta_{\text{abs}} = 4,18 \times 10^{-14}$, **Tabla 5.4**). Se debe resaltar que este valor es prácticamente el doble que el hallado con dos capas de TiO₂ Degussa P-25 sin Ag ($\eta_{\text{abs}} = 2,29 \times 10^{-14}$, **Tabla 4.5**).

Entre las tres concentraciones de Ag más bajas, se obtuvo un aumento en la velocidad de inactivación de los esporos a medida que aumentaba la concentración del metal dopado. Sin embargo, en las muestras con 2,15 y 3,38 % p/p de Ag, la constante cinética disminuyó levemente.

Las nanopartículas de plata pueden disolverse generando iones plata y se sugiere que, in vivo, esta liberación sea producto de la reacción de las nanopartículas con H₂O₂ (Asharani y col., 2009). Choi y col. (2008) ha reportado otro mecanismo

posible para la disolución de las nanopartículas de plata, en el cual la plata es oxidada en presencia de O_2 .

Con respecto a la actividad fotocatalítica de TiO_2 dopado con Ag, se propone en la bibliografía que los iones Ag^+ , eluidos de las nanopartículas de plata o quimisorbidos sobre su superficie, actúan como una trampa de electrones. Esto reduce la recombinación entre electrones y huecos, y por lo tanto resulta en un aumento de la disponibilidad de los huecos. El efecto sinérgico de los iones Ag^+ , y radicales altamente oxidantes generados por el proceso de fotocátalisis de TiO_2 , puede dar lugar a una velocidad mejorada de la destrucción microbiana (Vohra y col., 2005). Por lo tanto, después de la absorción de luz y separación de cargas, el electrón en la banda de conducción puede ser efectivamente atrapado por la plata, mientras que el hueco actúa oxidando la molécula de agua y formando radicales hidroxilo, sin el riesgo de recombinación. Ashkarran y col. (2011) afirman que existe una cantidad óptima de plata para atrapar rápidamente electrones, ya que la plata en exceso puede cubrir el dióxido de titanio y disminuir la absorción de luz. Además, la plata en exceso puede actuar como un sitio de recombinación en sí y dar como resultado una disminución en la eficiencia fotocatalítica. Por su parte, Tran y col. (2006) describen los motivos por los cuales un elevado contenido de Ag disminuye la actividad fotocatalítica del TiO_2 para la mineralización de compuestos orgánicos. Estos son: (1) una reducción en el acceso de la radiación a la superficie de TiO_2 debido a la cobertura de la superficie por los depósitos excesivos de plata, (2) el bloqueo de los sitios activos de TiO_2 por los depósitos de metal que son necesarios para el proceso fotocatalítico; (3) un aumento en las velocidades de recombinación de

carga con altas concentraciones de plata, y (4) una inhibición en el papel del oxígeno debido a la transferencia de electrones preferencial desde la superficie de TiO₂ a los depósitos de plata.

Por lo expuesto anteriormente, se puede suponer que los iones Ag⁺ actúan como una trampa de electrones cuando comienza el proceso de fotocátalisis, acelerando la generación de radicales oxidantes, y por lo tanto aumentando la velocidad de inactivación de los esporos. Por otro lado, cuando la corteza y la cubierta del espora comienzan a dañarse, son más vulnerables, por lo que en ese momento podría actuar también el efecto bactericida de la plata. Asimismo, la disminución en la constante cinética para las concentraciones de Ag ensayadas de 2,15 y 3,38 % p/p podría atribuirse a los elevados niveles de Ag presentes, que generan una disminución en la actividad fotocatalítica del TiO₂, tal como se explicó previamente.

**CONCLUSIONES
Y
PERSPECTIVAS FUTURAS**

En la presente tesis doctoral se planteo como objetivo el desarrollo de un proceso de descontaminación para la eliminación de microorganismos presentes en el aire, los cuales causan diversas enfermedades y problemas socioeconómicos, empleando una Tecnología Avanzada de Oxidación basada en una reacción fotocatalítica (radiación UV + TiO₂) con el catalizador inmovilizado.

Se utilizaron esporos de *Bacillus subtilis* como contaminante modelo, ya que representa una de las estructuras biológicas más resistentes para su eliminación y se utilizan como estándares de esterilización.

Los principales logros y conclusiones de la presente Tesis pueden resumirse de la siguiente forma:

- Se diseñó y construyó un dispositivo experimental que simula la situación real de irradiar esporos secos presentes en la atmósfera o depositados sobre alguna superficie.
- Se evaluó la inactivación fotocatalítica y fotoquímica de esporos de *B. subtilis*. Los esporos se esparcieron sobre placas de vidrio de borosilicato sin catalizador y sobre placas cubiertas con delgadas películas de TiO₂, y luego fueron sometidas a diferentes niveles de irradiación UV-A (2.44-0.29 mW cm⁻²) durante distintos tiempos (0, 6, 12, 24, 36, 48 horas).
- Los resultados experimentales mostraron una reducción significativa de la viabilidad de los esporos inmovilizados en las placas cubiertas de TiO₂ después

del período de irradiación (3 órdenes de magnitud después de 24 horas bajo 2.44 mW cm⁻² de irradiación continua), confirmando la viabilidad de la inactivación fotocatalítica de esporos como una tecnología de desinfección.

- La viabilidad de los esporos depositados sobre placas de vidrio de borosilicato sin catalizador no mostró cambios significativos después de ser sometido a la irradiación UV-A (0,47 órdenes de magnitud después de 48 horas bajo 2.44 mW cm⁻² de irradiación continua), descartando la posibilidad de inactivación de esporos puramente fotoquímica bajo las condiciones de trabajo utilizadas.
- Se desarrolló un modelo detallado del campo de radiación que permite el cálculo de la velocidad superficial local de absorción de fotones (LSRPA) en cualquier punto de la película de TiO₂.
- Se derivó un modelo cinético para representar el proceso de inactivación de esporos a partir de un esquema de reacción simplificado. Se obtuvo así una expresión cinética que permite el cálculo de la velocidad de inactivación de esporos e incorpora explícitamente el efecto de la absorción de radiación. Los resultados predichos con el modelo cinético ajustaron satisfactoriamente los resultados experimentales para diferentes tiempos de exposición y flujos de irradiación.
- Con el fin de lograr una mayor velocidad de inactivación, se estudiaron y compararon diferentes recubrimientos de TiO₂ utilizando catalizadores sintetizados en el laboratorio y catalizadores comerciales. Para comparar objetivamente el rendimiento de los recubrimientos, se calcularon dos tipos de

eficiencias: la eficiencia fotónica y la eficiencia cuántica de inactivación, las cuales tienen en cuenta la radiación incidente y la radiación absorbida sobre la superficie del catalizador.

- La mayor eficiencia de todas las muestras probadas se obtuvo con el recubrimiento de TiO₂ Degussa P-25 con dos capas. El cálculo de los parámetros de eficiencia representa una valiosa herramienta para comparar diferentes sistemas catalíticos. Además, la eficiencia cuántica permite dilucidar algunos aspectos del mecanismo fotocatalítico, porque muestra cuán eficientemente la radiación absorbida es empleada para inactivar microorganismos. También, puede ayudar a diseñar mejores recubrimientos, ya que los resultados pueden evidenciar problemas con el contacto de las bacterias con el recubrimiento, o la absorción de la radiación, por ejemplo.
- Se evaluó y comparó la velocidad de inactivación de recubrimientos de TiO₂ dopados con diferentes concentraciones de plata, la cual posee una reconocida actividad antibacteriana. Al recubrimiento TiO₂ Degussa P-25 con 2 capas se le depositaron diferentes concentraciones de Ag y se ensayó su actividad para inactivar esporos. Los resultados experimentales mostraron que existe una concentración óptima de Ag que aumenta notablemente la velocidad de inactivación de los esporos. La mayor velocidad de inactivación y eficiencia se obtuvo con el recubrimiento de TiO₂ Degussa P-25 con dos capas con 1.09% p/p Ag/TiO₂.

COMO POSIBLES TEMAS PARA DESARROLLAR EN EL FUTURO, SE PROPONEN:

- Diseñar y construir un fotorreactor de pared catalítica con dióxido de titanio soportado para la desinfección de una corriente gaseosa, en particular, aplicado a la inactivación de bacterias esporuladas de *Bacillus subtilis*.
- Contar con un sistema que cree una atmósfera de concentración conocida del contaminante. A partir de una suspensión líquida del microorganismo en estudio, se generarían microgotas de un tamaño determinado, debido a que es la forma en que los bioaerosoles se encuentran en la naturaleza.
- Desarrollar y validar experimentalmente un modelo que simule el proceso de inactivación de microorganismos en el reactor diseñado, con especial importancia al modelado del campo de radiación en las superficies catalíticas del reactor.
- Estudiar la influencia de distintas condiciones experimentales sobre la velocidad de inactivación microbiológica, tales como caudal de aire, concentración del microorganismo contaminante en la entrada del reactor, humedad relativa, flujo de radiación UV incidente, entre otras.
- Realizar ensayos con muestras reales de aire contaminado.

NOMENCLATURA

A	área, cm ²
ATCC	American Type Culture Collection
CS_i	compuestos superficiales del espora
e_g	espesor del vidrio de borosilicato, cm
e_f	espesor del recubrimiento de TiO ₂ , cm
e^{a,s}	velocidad superficial local de absorción de fotones (Local Superficial Rate of Photon Absorption (LSRPA)) (Einstein h ⁻¹ cm ⁻² o fotón cm ⁻² h ⁻¹)
h⁺	“huecos” positivos
k_i	parámetros cinéticos, unidades dependiendo del paso de reacción
K_i	parámetros cinéticos globales, unidades dependiendo del paso de reacción
L_{lamp}	largo de la lámpara, cm
N	concentración de esporos viables, CFU cm ⁻²
N₀	concentración inicial de esporos viables, CFU cm ⁻²
·OH	radical hidróxido
·O₂⁻	radical superóxido
P_{eff,lamp}	potencia de emisión efectiva de las lámparas, mW
PTFE	poli-[tetrafluoroetileno]
q_{lamp}	flujo de radiación en la superficie de las lámparas, mW cm ⁻²
qⁱ	flujo de radiación efectivo que alcanza el recubrimiento de TiO ₂ , mW cm ⁻²
q⁰	flujo de radiación obtenido por simulación con CDF, mW cm ⁻²
q^t	flujo de radiación efectivo que es transmitido a través del recubrimiento de TiO ₂ , mW cm ⁻²
q_{f,in}	flujo de radiación local que llega al recubrimiento catalítico de TiO ₂ (photon cm ⁻² h ⁻¹)
q_{f,tr}	flujo de radiación local que es transmitido a través del recubrimiento catalítico de TiO ₂ (photon cm ⁻² h ⁻¹)

$q_{f,rf}$	flujo de radiación local que es reflejado a través del recubrimiento catalítico de TiO_2 (photon $cm^{-2} h^{-1}$)
r_i	velocidad de reacción, $mol s^{-1} cm^{-2}$
R	reflectancia (dimensionless)
R_{lamp}	radio de la lampara, cm
t	tiempo, h
T	transmitancia (dimensionless)
TiO_2	dióxido de titanio
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Letras griegas

α_f	fracción de energía absorbida por el recubrimiento de TiO_2 (adimensional)
μ	eficiencia de inactivación fotocatalítica (UFC fotón ⁻¹)
φ_λ	función de distribución de las longitudes de onda que alcanzan el recubrimiento catalítico de TiO_2 (adimensional)
Φ	rendimiento cuántico principal
$\langle \kappa_{\lambda,g} \rangle_{\lambda_{lamp}}$	coeficiente de absorción del vidrio de borosilicato, cm^{-1}
$\langle \kappa_{\lambda,f} \rangle_{\lambda_{lamp}}$	coeficiente de absorción del recubrimiento de TiO_2 , cm^{-1}

Subíndices

λ	relativo a una específica longitud de onda
abs	denota la eficiencia cuántica de inactivación
app	denota la eficiencia fotónica (o eficiencia cuántica aparente)
A_{irr}	relativo a la zona irradiada
f	relativa a una propiedad de la película de TiO_2

fg	relativa a una propiedad de la película de TiO ₂ + vidrio
g	relativa a una propiedad de la placa de vidrio de borosilicato sin recubrimiento

Símbolos especiales

⟨ ⟩	promedio
[]	concentración

BIBLIOGRAFÍA

- Akhavan, O. Lasting antibacterial activities of Ag-TiO₂/Ag/a-TiO₂ nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 336, 117.
- Amro, N.; Kotra, L.; Wadu-Mesthrige, K.; Bulychev, A.; Mobashery, S.; Liu, G. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir* **2000**, 16, 2789.
- Asharani, P.V.; Mun, G. L. K.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **2009**, 3, 279.
- Ashkarran, A. A.; Aghigh, S. M.; Kaviani-pour, M.; Farahani, N. J. Visible light photo- and bioactivity of Ag/TiO₂ nanocomposite with various silver contents. *Current Applied Physics* **2011**, 11, 1048.
- Atlas, R.; Bartha, R. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Ed. Pearson Educación, Madrid, **2002**.
- Atrih, A.; Zöllner, P.; Allmaier, G.; Foster, S. J. Structural analysis of *Bacillus subtilis* 168 endospore peptidoglycan and its role during differentiation. *Journal of Bacteriology* **1996**, 178, 6173.
- Atrih, A.; Zöllner, P.; Allmaier, G.; Williamson, M.; Foster, S. J. Peptidoglycan structural dynamics during germination of *Bacillus subtilis* 168 endospores. *Journal of Bacteriology* **1998**, 180, 4603.
- Atrih, A.; Foster, S. J. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Bacteriology* **2001**, 91, 1.
- Atrih, A.; Foster, S. J. Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal* **2002**, 12, 217.
- Barnett, T. A.; Valenzuela, D.; Riner, S.; Hageman, J. H. Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation associated pigments. *Can. J. Microbiol.* **1983**, 29, 96.
- Bender, G. R.; Marquis, R. E. Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* **1985**, 50, 1414.

- Blake, D. M.; Maness, P.-C.; Huang, Z.; Wolfrum, E. J.; Huang, J. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Separation and Purification Methods* **1999**, 28, 1.
- Bokarea, A.; Sanapa, A.; Paib, M.; Sabharwala, S.; Athawale, A. A. Antibacterial activities of Nd doped and Ag coated TiO₂ nanoparticles under solar light irradiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 102, 273.
- Briggiler Marcó, M.; Quiberoni, A. L.; Negro, A. C.; Reinheimer, J. A.; Alfano, O. M. Evaluation of the photocatalytic inactivation efficiency of dairy bacteriophages. *Chem. Eng. J.* **2011**, 172, 987.
- Buchanan, C. E.; Henriques, A. O.; Piggot, P. J. Cell wall changes during bacterial endospore formation. En J.M. Ghuysen, R. Hackenbeck (eds.), *Bacterial Cell Wall*, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, **1994**, pp. 167-186.
- Buttner, M. P.; Willeke, K.; Grinshhpun, S. A. Sampling and análisis of airborne microorganisms. En: Hurst, C. J. y col. (ed). *Manual of environmental microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, USA, **1997**.
- Caballero, L.; Whitehead, K. A.; Allen, N. S.; Verran, J. Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO₂ using fluorescent light. *J. Photochem. Photobiol., A.* **2009**, 202, 92.
- Carlson, C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; Braydich-Stolle, L. K.; Hess, K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* **2008**, 112, 13608.
- Cho, M.; Chung, H.; Choi, W.; Yoon, J. Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71, 270.
- Choi, O.; Hu, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol* **2008**, 42, 4583.
- Choi, O.; Deng, K.; Kim, N.; Ross, L.; Surampalli, R.; Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res* **2008**, 42, 3066.

- Chong, M. N.; Jin, B.; Chow, C. W. K.; Saint, C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water Res.* **2010**, *44*, 2997.
- Chuaybamroong, P.; Chotigawin, R.; Supothina, S.; Sribenjalux, P.; Larpkiattaworn, S.; Wu, C.-Y. Efficacy of photocatalytic HEPA filter on microorganism removal. *Indoor Air.* **2010**, *20*, 246.
- Cui, B.; Peng, H.; Xia, H.; Guo, X.; Guo, H. Magnetically recoverable core-shell nanocomposites $c\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2\text{@TiO}_2\text{-Ag}$ with enhanced photocatalytic activity and antibacterial activity. *Separation and Purification Technology* **2013**, *103*, 251.
- Dalrymple, O. K.; Stefanakos, E.; Trotz, M. A.; Goswami, D. Y. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Appl. Catal., B.* **2010**, *98*, 27.
- de Lasa, H.; Serrano, B.; Salaces, M., *Photocatalytic reaction engineering*, Springer Publishing, New York, USA, **2005**.
- de la Rosa, M. C.; Mosso M. A.; Ullán, C. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental* **2002**, *5*, 375.
- Dibrov, P.; Dzioba, J.; Gosink, K.; Hase, C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag^+ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 2668.
- Domènech, X.; Jardim, W. F.; Litter, M. I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. En: Blesa, M. A. (Ed.), *Eliminación de contaminantes por fotocatálisis heterogénea*, Editorial Ciemat, Ministerio de Educación y Ciencia, Buenos Aires, Argentina, **2004**.
- Driks, A.; Setlow, P., Morphogenesis and properties of the bacterial spores. En: Brun, Y.; Shimkets, L. (Eds.), *Regulation of prokaryotic development*, American Society for Microbiology, Washington, USA, **1999**, pp. 191–218.
- Driks, A. The *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev* **1999**, *63*, 1.
- Ellar, D. J. Spore specific structures and their functions. *Symposium Society General Microbiology* **1978**, *28*, 295.
- Erkan, A.; Bakir, U.; Karakas, G. Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO_2 and TiO_2 thin films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006**, *184*, 313.

- Faure, M.; Gerardin, F.; André, J.-C.; Ponsa, M.-N.; Zahraa, O. Study of photocatalytic damages induced on *E. coli* by different photocatalytic supports (various types and TiO₂ configurations). *J. Photochem. Photobiol., A* **2011**, *222*, 323.
- Foster, H. A.; Ditta, I. B.; Varghese, S.; Steele, A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1847.
- Fujishima, A.; Rao, T. N.; Tryk, D. A. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2000**, *1*, 1.
- Gerhardt, P.; Marquis, R. E., Spore thermoresistance mechanisms. En: Smith, I.; Slepecky, R.; Setlow, P. (Eds.), *Regulation of procaryotic development*, American Society for Microbiology, Washington, USA, **1989**, pp. 43–63.
- Goswami, D. Y.; Trivedi, D. M.; Block, S. S. Photocatalytic disinfection of indoor air. *J. Solar Engineering* **1995**, *1*, 421.
- Goswami, D. Y.; Trivedi, D. M.; Block, S. S. Photocatalytic disinfection of indoor air. *J. Sol. Energ. Eng.* **1997**, *119*, 92.
- Goswami, T. K.; Hingorani, S. K.; Greist, H. Photocatalytic system to destroy bioaerosols in air. *J. Adv. Oxid. Technol.* **1999**, *4*, 185.
- Greist, H. T.; Hingorani, S. K.; Kelley, K.; Goswami, D. Y. Using scanning electron microscopy to visualize photocatalytic mineralization of airborne microorganisms. *Indoor Air* **2002**.
- Grinshpun, S. A.; Adhikari, A.; Honda, T.; Kim, K. Y.; Toivola, M.; Ramchander Rao, K. S.; Reponen, T. Control of aerosol contaminants in indoor air: Combining the particle concentration reduction with microbial inactivation. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 606.
- Guin, D.; Manorama, S. V.; Latha, J. N. L.; Singh, S. Photoreduction of Silver on Bare and Colloidal TiO₂ Nanoparticles/Nanotubes: Synthesis, Characterization, and Tested for Antibacterial Outcome. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13393.

- Guo, M.-Z.; Ling, T.-C.; Poon, C.-S. TiO₂-based self-compacting glass mortar: Comparison of photocatalytic nitrogen oxide removal and bacteria inactivation. *Building and Environment* **2012**, *53*, 1.
- Holt, K.; Bard, A. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry* **2005**, *44*, 13214.
- Horie, Y.; Taya, M.; Tone, S. Evaluation of photocatalytic sterilization rates of *Escherichia coli* cells in titanium dioxide slurry irradiated with various light sources. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **1998**, *31*, 577.
- Horie, Y.; Taya, M.; Tone, S. Effect of cell adsorption on photosterilization of *Escherichia coli* over titanium dioxide-activated charcoal granules. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **1998**, *31*, 922.
- Hoti, S. L.; Balaraman, K. Formation of melanin pigment by a mutant of *Bacillus thuringiensis* H-14. *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139*, 2365.
- Hou, Y.; Li, X.; Zhao, Q.; Chen, G.; Raston, C. L. Role of Hydroxyl Radicals and Mechanism of *Escherichia coli* Inactivation on Ag/AgBr/TiO₂ Nanotube Array Electrode under Visible Light Irradiation. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 4042.
- Hwang, E.; Lee, J.; Chae, Y.; Kim, Y.; Kim, B.; Sang, B.; Gu, M. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small* **2008**, *4*, 746.
- Imae, Y.; Strominger, J. L. Cortex content of asporogenous mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **1976**, *126*, 914.
- Imoberdorf, G.; Irazoqui, H. A.; Cassano, A. E.; Alfano, O. M. Photocatalytic degradation of tetrachloroethylene in gas phase on TiO₂ films: A kinetic study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 6075.
- Jackson, N. B.; Wang, C. M.; Luo, Z.; Schwitzgebel, J.; Ekerdt, J. G.; Brock, J. R.; Heller, A. Attachment of TiO₂ Powders to Hollow Glass Microbeads: Activity of the TiO₂-Coated Beads in the Photoassisted Oxidation of Ethanol to Acetaldehyde. *J. Electrochem. Soc.* **1991**, *138*, 3660.

- Jacoby, W. A.; Maness, P. C.; Wolfrum, E. J.; Blake, D. M.; Fennell, J. A. Mineralization of bacteria cell mass on a photocatalytic surface in air. *Environmental Science & Technology* **1998**, *32*, 2650.
- Keshmiri, M.; Mohseni, M.; Troczynski, T. Development of novel TiO₂ sol-gel-derived composite and its photocatalytic activities for trichloroethylene oxidation. *Appl. Catal., B.* **2004**, *53*, 209.
- Kim, B.; Kim, D.; Cho, D.; Cho, S. Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere* **2003**, *52*, 277.
- Kozlova, E. A.; Safatov, A. S.; Kiselev, S. A.; Marchenko, V. Y.; Sergeev, A. A.; Skarnovich, M. O.; Emelyanova, E. K.; Smetannikova, M. A.; Buryak, G. A.; Vorontsov, A. V. Inactivation and Mineralization of Aerosol Deposited Model Pathogenic Microorganisms over TiO₂ and Pt/TiO₂. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 5121.
- Kühn, K. P.; Chaberny, I. F.; Massholder, K.; Stickler, M.; Benz, V. W.; Sonntag, H. S.; Erdinger, L. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere* **2003**, *53*, 71.
- Le, N. T. T.; Nagata, H.; Aihara, M.; Takahashi, A.; Okamoto, T.; Shimohata, T.; Mawatari, K.; Kinouchi, Y.; Akutagawa, M.; Haraguchi, M. Additional Effects of Silver Nanoparticles on Bactericidal Efficiency Depend on Calcination Temperature and Dip-Coating Speed. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77*, 5629.
- Lin, C. Y.; Li, C. S. Inactivation of microorganisms on the photocatalytic surfaces in air. *Aerosol Science and Technology* **2003**, *37*, 939.
- Lin, W-C; Chen, C-N; Tseng, T-T; Wei, M-H; Hsieh, J.H.; Tseng, W J. Micellar layer-by-layer synthesis of TiO₂/Ag hybrid particles for bactericidal and photocatalytic activities. *Journal of the European Ceramic Society* **2010**, *30*, 2849.
- Liu, Y. T.; Sui, M. J.; Ji, D. D.; Wu, H. I.; Chou, C. C.; Chen, C. C. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *J. Invertebr. Pathol.* **1993**, *62*, 131.

- Logan, N. A.; De Vos, P.; Genus I. Bacillus. En: De Vos, P.; Garrity, G. M.; Jones, D.; Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. B. (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Three, The Firmicutes*, Second edition, Springer, New York, 2009, pp 21-127.
- Lok, C.; Ho, C.; Chen, R.; He, Q.; Yu, W.; Sun, H.; Tam, P.; Chiu, J.; Che, C. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res* **2006**, 5, 916.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.; *Brock, Biology of Microorganisms*, 11 edición, Pearson Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA, **2006**.
- Maness, P.-C.; Smolinski, S.; Blake, D. M.; Huang, Z.; Wolfrum, E. J.; Jacoby, W. A. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, 65, 4094.
- Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* **2010**, 12, 1531.
- Marquis, R.; Bender, G. Mineralization and heat resistance of bacterial spores. *Journal of Bacteriology* **1985**, 161, 789.
- Marquis, R. E.; Sim, J.; Shin, S. Y. Molecular mechanism of resistance to heat and oxidative damage. *Journal of Applied Bacteriology* **1994**, 76, 40.
- Marugán, J.; van Grieken, R.; Sordo, C.; Cruz, C. Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Appl. Catal., B* **2008**, 82, 27.
- Masaki, Y.; Masaude, S.; Ishida, K. TiO₂ photocatalyst for environmental purification. *Sumitomo Met.* **1999**, 50, 26.
- Matsunaga, T.; Tomoda R.; Nakajima T.; Wake H. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters* **1985**, 29, 211.
- May, K. R.; Harper, G. J. The efficiency of various liquid impinger samplers in bacterial aerosols. *Journal of Industrial Medical* **1957**, 14, 287.

- McDonnell, G.; Russell, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 147.
- Meador-Parton, J.; Popham, D. L. Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation. *Journal of Bacteriology* **2000**, *182*, 4491.
- Mendis, E.; Rajapakse, N.; Byun, H.; Kim, S. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci* **2005**, *77*, 2166.
- Mitchell, C.; Iyer, S.; Skomurski, S. F.; Vary, J. C. Red pigment in *Bacillus megaterium* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *52*, 64.
- Moeller, R.; Horneck, G.; Facius, R.; Stackebrandt, E. Role of pigmentation in protecting *Bacillus sp.* endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology* **2005**, *51*, 231.
- Munakata, N.; Rupert, C. S. Genetically controlled removal of “spore photoproduct” from deoxynucleid acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* **1972**, *111*, 192.
- Nel, A.; Xia, T.; Madler; L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **2006**, *311*, 622.
- Nicholson, W. L.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H. J.; Setlow, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme external terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2000**, *64*, 548.
- Paidhungat, M.; Setlow, B.; Driks, A.; Setlow, P. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology* **2000**, *182*, 5505.
- Pal, A.; Pehkonen, S. O.; Yu, L. E.; Ray, M. B. Photocatalytic inactivation of airborne bacteria in a continuous-flow reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 7580.
- Pal, A.; Min, X.; Yu, L. E.; Pehkonen, S. O.; Ray, M. Photocatalytic inactivation of bioaerosols by TiO₂ coated membrane. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **2005**, *3*, A45.
- Park, H.; Kim, J.; Kim, J.; Lee, J.; Hahn, J.; Gu, M.; Yoon, J. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res* **2009**, *43*, 1027.

- Paschoalino, M. P.; Jardim, W. F. Indoor air disinfection using a polyester supported TiO₂ photo-reactor. *Indoor Air* **2008**, 18, 473.
- Potts, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* **1994**, 58, 755.
- Prasad, G. K.; Ramacharyulu, P. V. R. K.; Merwyn, S.; Agarwal, G. S.; Srivastava, A. R.; Beer Singh; Rai, G. P.; Vijayaraghavan, R. Photocatalytic inactivation of spores of *Bacillus anthracis* using titania nanomaterials. *J. Hazard. Mater.* **2011**, 185,977.
- Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A., *Microbiology*, Fifth Edition, McGraw-Hill, **2002**.
- Riesenman, P. J.; Nicholson, W. L. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **2000**, 66, 620.
- Rincon, A. G.; Pulgarin, C., Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Appl. Catal., B.* **2003**, 44, 263.
- Russell, A. D. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clinical Microbiology* **1990**, 3, 99.
- Sánchez, B.; Sánchez-Muñoz, M.; Muñoz-Vicente, M.; Cobas, G.; Portela, R.; Suárez, S.; González, A. E.; Rodríguez, N.; Amils, R. Photocatalytic elimination of indoor air biological and chemical pollution in realistic conditions. *Chemosphere* **2012**, 87, 625.
- Sato, T.; Koizumi, Y.; Taya, M. Photocatalytic deactivation of airborne microbial cells on TiO₂-loaded plate. *Biochemical Engineering Journal* **2003**, 14, 149.
- Satuf, M. L.; Brandi, R. J.; Cassano, A. E.; Alfano, O. M. Experimental Method to Evaluate the Optical Properties of Aqueous Titanium Dioxide Suspensions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44, 6643.
- Schreurs, W.; Rosenberg, H. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1982**, 152, 7.
- Setlow, P. Mechanism which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology* **1994**, 76, 49S.

- Setlow, P. Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environ. Mol. Mut.* **2001**, 38, 97.
- Shanga, L.; Li, B.; Donga, W.; Chena, B.; Li, C.; Tanga, W.; Wangb, G.; Wu, J.; Ying, Y.; Heteronanostructure of Ag particle on titanate nanowire membrane with enhanced photocatalytic properties and bactericidal activities. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 178, 1109.
- Shehata, T. E.; Collins, E. B. Sporulation and heat resistance of psychrophilic strains of *Bacillus*. *Journal of Dairy Science* **1972**, 55, 1405.
- Siegel, R.; Howell, J., *Thermal Radiation Heat Transfer*, 4th ed., Taylor and Francis, New York, USA, **2002**.
- Skorb, E. V.; Antonouskaya, L. I.; Belyasova, N. A.; Shchukin, D. G.; Möhwald, H.; Sviridov, D. V. Antibacterial activity of thin-film photocatalysts based on metal-modified TiO₂ and TiO₂:In₂O₃ nanocomposite. *Applied Catalysis B: Environmental* **2008**, 84, 94.
- Slepecky, R.; Foster, J. W. Alteration in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect on some spore properties. *Journal of Bacteriology* **1959**, 78, 117.
- Slieman, T. A.; Nicholson, W. L. Role of dipicolinic acid in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to artificial and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 1274.
- Sontakke, S.; Modak, J.; Madras, G. Effect of inorganic ions, H₂O₂ and pH on the photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* with silver impregnated combustion synthesized TiO₂ catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental* **2011**, 106, 453.
- Srisitthiratkul, C.; Pongsorrarith, V.; Intasanta, N. The potential use of nanosilver-decorated titanium dioxide nanofibers for toxin decomposition with antimicrobial and self-cleaning properties. *Applied Surface Science* **2011**, 257, 8850.
- Sun, D. D.; Tay, J. H.; Tan, K. M. Photocatalytic degradation of *E. coliform* in water. *Water Research* **2003**, 37, 3452.
- Tran, H.; Chiang, K.; Scott, J.; Amal, R. Clarifying the role of silver deposits on titania for the photocatalytic mineralization of organic compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **2006**, 183, 41.

- Underwood, E. Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry. En: Hugo, W. B., Russell, A. D. (ed). *Pharmaceutical microbiology*. 5ª Edic. Ed. Blackwell Scientific Publication, London, **1992**.
- van Grieken, R.; Marugán, J.; Sordo, C.; Martínez, P.; Pablos, C. Photocatalytic inactivation of bacteria in water using suspended and immobilized silver-TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental* **2009**, *93*, 112.
- van Grieken, R.; Marugán, J.; Sordo, C.; Pablos, C. Comparison of the photocatalytic disinfection of *E. coli* suspensions in slurry, wall and fixed-bed reactors. *Catal. Today*. **2009**, *144*, 48.
- van Grieken, R.; Marugán, J.; Sordo, C.; Martínez, P.; Pablos, C. Photocatalytic inactivation of bacteria in water using suspended and immobilized silver-TiO₂, *Applied Catalysis B: Environmental* **2009**, *93*, 112.
- Vohra, A.; Goswami, D. Y.; Deshpande, D. A.; Block, S. S. Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surfaces in air. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* **2005**, *32*, 364.
- Vohra, A.; Goswami, D. Y.; Deshpande, D. A.; Block, S. S. Enhanced photocatalytic disinfection of indoor air. *Applied Catalysis B: Environmental* **2006**, *64*, 57.
- Wolfrum, E. J.; Huang, J.; Blake, D. M.; Maness, P.; Huang, Z.; Fiest, J. Photocatalytic oxidation of bacteria, bacterial and fungal spores, and model biofilm components to carbon dioxide on titanium dioxide-coated surfaces. *Environmental Science and Technology* **2002**, *36*, 3412.
- Wu, P.; Xie, R.; Imlay, K.; Shang, J. K. Visible-Light-Induced Bactericidal Activity of Titanium Dioxide Codoped with Nitrogen and Silver. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6992.
- Yamazaki-Nishida, S.; Nagano, K. J.; Phillips, L. A.; Cervera-March, S.; Anderson, M. A. Photocatalytic degradation of trichloroethylene in the gas phase using TiO₂ pellets. *Journal of Photochemical and Photobiology A: Chemical* **1993**, *70*, 95.
- Yang, W.; Shen, C.; Ji, Q.; An, H.; Wang, J.; Liu, Q.; Zhang, Z. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology* **2009**, *20*.

- Yao, Y.; Ochiaia, T.; Ishiguroa, H.; Nakanoa, R.; Kubota, Y. Antibacterial performance of a novel photocatalytic-coated cordierite foam for use in air cleaners. *Applied Catalysis B: Environmental* **2011**, 106, 592.
- Yoon, K. Y.; Byeon, J. H.; Park, C. W.; Hwang, J. Antimicrobial Effect of Silver Particles on Bacterial Contamination of Activated Carbon Fibers. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 1251.
- Zacarías, S. M.; Vaccari, M. C.; Irazoqui, H. A.; Imoberdorf, G. E.; Alfano, O. M. Effect of the radiation flux on the photocatalytic inactivation of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Photochem. Photobiol., A* **2010**, 214, 171.
- Zacarías, S. M.; Satuf, M. L.; Vaccari, M. C.; Alfano, O. M. Efficiency evaluation of different TiO₂ coatings on the photocatalytic inactivation of airborne bacterial spores. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, 51, 13599.
- Zhao, J.; Krishna, V.; Hua, B.; Moudgil, B.; Koopman, B. Effect of UV-A irradiance on photocatalytic and UV-A inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, 94, 96.
- Zhao, Y-K; Sung, W-P; Tsai, T-T; Wang, H-J. Application of Nanoscale Silver-Doped Titanium Dioxide as Photocatalyst for Indoor Airborne Bacteria Control: A Feasibility Study in Medical Nursing Institutions. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **2010**, 60, 337.