



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 “Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos”

# **“Bacteriófagos en ambientes de la industria láctea: estrategias de inactivación basadas en procesos fotoquímicos y avanzados de oxidación”**

Autora: Ing. María Fiorella Jacob

Directora: Dra. Mariángeles Briggiler Marcó

Co-directora: Dra. María de los Milagros Ballari

Integrantes del Jurado:

- Dra. Pilar Fernández Ibañez
- Dra. Graciela Liliana Garrote
- Dra. Paula María Alejandra Lucchesi

Unidad de Investigación: Instituto de Lactología Industrial  
(INLAIN, UNL-CONICET)

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral otorgada para la realización de este doctorado, como así también a la Facultad de Ingeniería Química (FIQ – UNL) por ser la mejor casa de estudios, en la que hoy tengo el honor de desempeñarme como docente y poder devolverle tan solo un poco de todo lo que me ha brindado.

A todas las organizaciones que financiaron los proyectos de investigación que hicieron posible la realización de esta tesis: CONICET, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel) y Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i).

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

A mi directora, Manqui, por su acompañamiento en el día a día en el laboratorio, por responder con amabilidad y buen humor las incontables dudas y cuestionamientos. A mi co-directora, Mili, por estar siempre dispuesta a recibirme en el INTEC (y ser mi Uber!), por pelear juntas hasta que cerraron los modelos.

A ambas, por el trato siempre amable, cercano y cariñoso, por ayudarme a resolver los rompecabezas que se nos planteaban, por las enseñanzas brindadas y porque aun estando lejos en este último tiempo, con un montón de cosas para hacer, lograron hacerse un tiempito para ayudarme con su trabajo a cumplir el calendario medio loco que les planteé.

A Andrea, por su buena predisposición para colaborar y por sus valiosos aportes para dar respuestas a los revisores.

Al área de microbiología del INLAIN, por cada momento compartido en el laboratorio, por las charlas que hicieron más amenas las largas experiencias, por su compañía y su interés en las cosas del otro.

A toda la cátedra de Química Analítica de la FIQ, por su paciencia y por confiar en mí como docente, por siempre brindarme su apoyo y contención.

A mis amigas de la salita, Vicky, Cata (aunque te hayas mudado), Mara, Mile y Pauli, por prestar sus orejas cada vez que lo necesité. Por los momentos de “tertulia”, las risas, por los “fuegos” que prendimos, por su compañía diaria. Por comprender los días de auriculares y por los *brainstormings* super útiles que se generaron en cada debate.

A mis amigos, que aun estando lejos encuentran la manera de estar presentes y cada mensajito suyo es una caricia al alma.

A mi novio Sergio, por el aguante de hace tantos años. Por su paciencia y su amor tan sano. Por acompañar sin juzgar y cocinarme todas las noches.

A mi familia, mi lugar seguro donde siempre puedo volver. Por esperarme con los brazos abiertos y acompañarme siempre en cada paso que doy. Por el cariño y las risas que funcionan como combustible para el día a día. Una vez más, soy lo que soy gracias a ustedes.

Soy muy afortunada de poder contar con todo su apoyo. Simplemente, **gracias** ♥ .

Los resultados de esta tesis doctoral fueron divulgados a través de los siguientes trabajos científicos.

### Publicación en revistas internacionales

- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. (2025). "Kinetic modeling of dairy phages inactivation under UV-C irradiation". *Science of the total environment*, 983 (179664), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.179664>
- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Alfano, O. M., Briggiler Marcó, M. y Ballari, M. de los M. (2024). "Inactivation kinetics of dairy phages using photocatalytic paint under diverse environmental conditions and radiation sources". *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12 (114261), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114261>
- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Alfano, O. M., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. (2023). Photocatalytic paint for phage inactivation in dairy industry: inactivation constants and efficiencies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11 (110617), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110617>
- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. "Influence of environmental and operating conditions on UV-C-based inactivation of dairy bacteriophages". En revisión en *Food and Environmental Virology*.
- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. "Photocatalytic Reactor Optimization for Dairy Bacteriophage Inactivation". En preparación.

### Capítulos de libro

- Briggiler Marcó, M., Ballari, M. de los M., Jacob, M. F., Quiberoni, A. del L., Alfano, O. M. (2024). Photocatalytic Inactivation of Bacteriophage Bioaerosols in the Dairy Industry. In: *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9999-9\\_1099](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9999-9_1099)

### Publicaciones en eventos científicos

- **Jacob, M. F.** (2025). "Inactivación de fagos utilizando pintura fotocatalítica: eficiencias, modelado y constantes cinéticas". 32° Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). San Miguel de Tucumán, Argentina.

- Ballari, M. de los M., **Jacob, M. F.**, Alfano, O. M., Quiberoni, A. del L., Briggiler Marcó, M. (2024). "Inactivation of dairy phages applying photocatalytic paint under diverse environmental conditions: a kinetic study". 6th Iberoamerican Conference on Advanced Oxidation Technologies (CIPOA). Florianópolis (SC) Brasil.
- **Jacob, M. F.**, Mercanti, D. J., Quiberoni, A. del L., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. (2023). "Study of diverse conditions on the inactivation of dairy phages using photocatalytic paint". 32° Congresso Brasileiro De Microbiologia. Foz do Iguaçu (PR), Brasil.
- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. (2023). "Influencia de condiciones ambientales y fuentes de irradiación en la inactivación fágica utilizando pintura fotocatalítica". XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CyTAL). Buenos Aires, Argentina.
- **Jacob, M. F.**, Briggiler Marcó, M., Alfano, O. M., Quiberoni, A. del L. y Ballari, M. de los M. (2023). "Oxidation advanced processes for dairy phage inactivation". French-Argentinean Workshop of Heterogeneous Catalysis. Santa Fe, Argentina.
- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. (2022). "Constantes de inactivación de fagos de bacterias lácticas utilizando pinturas fotocatalíticas". II Jornadas Latinoamericanas de Bacteriofagos. Buenos Aires, Argentina.
- **Jacob, M. F.**, Briggiler Marcó, M., Ballari, M. de los M., Quiberoni, A. del L. y Alfano, O. M. (2022). "Quantum and Photonic Efficiencies Evaluation of the Photocatalytic inactivation of Bacteriophages Present in Dairy Industry Air". 5th Iberoamerican Conference on Advanced Oxidation Technologies (CIPOA). Cusco, Perú.
- **Jacob, M. F.**, Quiberoni, A. del L., Ballari, M. de los M. y Briggiler Marcó, M. (2022). "Pinturas fotocatalíticas para la inactivación de fagos de bacterias lácticas". VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC). Córdoba, Argentina.
- **Jacob, M. F.** (2022). "Pinturas fotocatalíticas para la inactivación de fagos de bacterias lácticas". Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral (EJI). Santa Fe, Argentina.

# Índice

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>                                             | <b>4</b>  |
| <b>1.1. BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO .....</b>                                              | <b>5</b>  |
| 1.1.1. FUNCIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA .....                    | 8         |
| 1.1.1.1. <i>Acidificación</i> .....                                                        | 8         |
| 1.1.1.2. <i>Proteólisis</i> .....                                                          | 9         |
| 1.1.1.3. <i>Actividad lipolítica</i> .....                                                 | 9         |
| 1.1.1.4. <i>Producción de aroma y sabor</i> .....                                          | 9         |
| 1.1.1.5. <i>Protección del producto hacia microorganismos alterantes y patógenos</i> ..... | 9         |
| 1.1.1.6. <i>Actividad probiótica</i> .....                                                 | 10        |
| 1.1.1.7. <i>Formación de exopolisacáridos</i> .....                                        | 10        |
| <b>1.2. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS .....</b>                                            | <b>10</b> |
| 1.2.1. YOGUR .....                                                                         | 10        |
| 1.2.2. QUESO .....                                                                         | 11        |
| <b>1.3. BACTERIÓFAGOS .....</b>                                                            | <b>12</b> |
| 1.3.1. ESTRUCTURA DE LOS BACTERIÓFAGOS .....                                               | 13        |
| 1.3.2. CICLOS DE MULTIPLICACIÓN DE LOS FAGOS .....                                         | 15        |
| 1.3.2.1. <i>Ciclo lítico</i> .....                                                         | 17        |
| 1.3.2.2. <i>Ciclo lisogénico</i> .....                                                     | 18        |
| <b>1.4. INFECCIONES FÁGICAS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA .....</b>                               | <b>19</b> |
| 1.4.1. FUENTES DE INGRESO DE FAGOS A LAS INDUSTRIAS LÁCTEAS .....                          | 19        |
| 1.4.2. INFECCIONES FÁGICAS EN PROCESOS PRODUCTIVOS DE LA INDUSTRIA LÁCTEA .....            | 21        |
| <b>1.5. FAGOS INFECTIVOS DE BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO .....</b>                          | <b>22</b> |
| 1.5.1. FAGOS ESTUDIADOS .....                                                              | 26        |
| <b>1.6. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA FRECUENCIA DE INFECCIONES FÁGICAS .....</b>            | <b>27</b> |
| 1.6.1. TRATAMIENTO TÉRMICO A LA MATERIA PRIMA .....                                        | 28        |
| 1.6.2. HIGIENE Y DISEÑO DE LA PLANTA .....                                                 | 28        |
| 1.6.3. ROTACIÓN DE CULTIVOS .....                                                          | 30        |
| 1.6.4. EMPLEO DE CEPAS CON FAGORRESISTENCIA MEJORADA .....                                 | 30        |
| <b>1.7. PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN .....</b>                                          | <b>32</b> |
| 1.7.1. FOTOCATÁLISIS .....                                                                 | 33        |
| 1.7.1.1. <i>Pinturas fotocatalíticas</i> .....                                             | 37        |
| <b>1.8. RADIACIÓN UV-C .....</b>                                                           | <b>38</b> |
| <b>1.9. INFLUENCIA DE DIVERSAS CONDICIONES EN LA INACTIVACIÓN FÁGICA .....</b>             | <b>40</b> |
| <b>1.10. COMBINACIÓN DE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE INACTIVACIÓN .....</b>                   | <b>43</b> |
| <b>1.11. MODELADO CINÉTICO .....</b>                                                       | <b>44</b> |
| <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                     | <b>48</b> |
| OBJETIVO GENERAL .....                                                                     | 49        |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                | 49        |
| <b>CAPÍTULO 2 - PINTURA FOTOCATALÍTICA .....</b>                                           | <b>50</b> |

|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2.1. RESUMEN DEL CAPÍTULO .....</b>                                                             | <b>51</b>  |
| <b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                              | <b>53</b>  |
| 2.2.1. CEPAS BACTERIANAS .....                                                                     | 53         |
| 2.2.2. BACTERIOFAGOS .....                                                                         | 53         |
| 2.2.3. TITULACIÓN DE FAGOS.....                                                                    | 55         |
| 2.2.4. FORMULACIÓN DE LA PINTURA FOTOCATALÍTICA Y DEPOSICIÓN .....                                 | 57         |
| 2.2.5. DESCRIPCIÓN DEL REACTOR UTILIZADO.....                                                      | 59         |
| 2.2.5.1. <i>Medición del flujo de radiación y espectro de emisión de lámparas</i> .....            | 59         |
| 2.2.6. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FÁGICA SOBRE PINTURA FOTOCATALÍTICA .....                           | 60         |
| 2.2.7. VARIACIÓN DE CONDICIONES AMBIENTALES Y FUENTES DE RADIACIÓN .....                           | 62         |
| 2.2.7.1. <i>Variación de la humedad relativa</i> .....                                             | 63         |
| 2.2.7.2. <i>Variación del flujo de radiación</i> .....                                             | 63         |
| 2.2.7.3. <i>Variación de la fuente de radiación</i> .....                                          | 63         |
| 2.2.8. CÁLCULOS TEÓRICOS .....                                                                     | 64         |
| 2.2.8.1. <i>Cálculo de las constantes de inactivación</i> .....                                    | 64         |
| 2.2.8.2. <i>Cálculo de las eficiencias fotónica y cuántica</i> .....                               | 65         |
| 2.2.8.3. <i>Modelo cinético empírico</i> .....                                                     | 68         |
| 2.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....                                                                  | 69         |
| <b>2.3. RESULTADOS.....</b>                                                                        | <b>70</b>  |
| 2.3.1. DEPOSICIÓN DE PINTURAS .....                                                                | 70         |
| 2.3.2. CAMPO DE RADIACIÓN EN EL FOTORREACTOR.....                                                  | 70         |
| 2.3.3. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FÁGICA .....                                                        | 72         |
| 2.3.4. CÁLCULO DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACIÓN.....                                              | 78         |
| 2.3.5. CÁLCULO DE LAS EFICIENCIAS DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA .....                             | 84         |
| 2.3.6. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FÁGICA VARIANDO CONDICIONES AMBIENTALES Y FUENTES DE RADIACIÓN..... | 85         |
| 2.3.6.1. <i>Influencia de humedad relativa del ambiente</i> .....                                  | 85         |
| 2.3.6.2. <i>Influencia del flujo de radiación</i> .....                                            | 88         |
| 2.3.6.3. <i>Influencia de la fuente de radiación</i> .....                                         | 90         |
| 2.3.7. MODELO CINÉTICO EMPÍRICO.....                                                               | 93         |
| <b>2.4. DISCUSIÓN .....</b>                                                                        | <b>97</b>  |
| 2.4.1. COMPARACIÓN CON OTRAS TECNOLOGÍAS .....                                                     | 98         |
| 2.4.2. MECANISMOS DE INACTIVACIÓN.....                                                             | 102        |
| 2.4.3. ESTUDIO DE LA PINTURA FOTOCATALÍTICA EN OTROS SISTEMAS DE PURIFICACIÓN DE AIRE.....         | 105        |
| 2.4.4. INFLUENCIA DE CONDICIONES AMBIENTALES Y FUENTE DE RADIACIÓN.....                            | 105        |
| 2.4.5. MODELO CINÉTICO .....                                                                       | 109        |
| <b>CAPÍTULO 3 - RADIACIÓN UV-C.....</b>                                                            | <b>111</b> |
| <b>3.1. RESUMEN DEL CAPÍTULO .....</b>                                                             | <b>112</b> |
| <b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                              | <b>114</b> |
| 3.2.1. BACTERIOFAGOS Y CEPAS BACTERIANAS .....                                                     | 114        |
| 3.2.2. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO EXPERIMENTAL .....                                                   | 114        |
| 3.2.3. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FÁGICA .....                                                        | 114        |
| 3.2.3.1. <i>Segundo ciclo de radiación UV-C</i> .....                                              | 114        |
| 3.2.4. MODELOS CINÉTICOS TEÓRICOS.....                                                             | 115        |
| 3.2.4.1. <i>Modelo Weibull</i> .....                                                               | 116        |
| 3.2.4.2. <i>Modelo Weibull-tail</i> .....                                                          | 116        |
| 3.2.4.3. <i>Ecuación log-logistic</i> .....                                                        | 116        |
| 3.2.4.4. <i>Ecuación de Gompertz modificada</i> .....                                              | 116        |
| 3.2.4.5. <i>Modelo de Geeraerd</i> .....                                                           | 117        |

|                                                                                                   |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.4.6. Modelo de Chick-Watson modificado .....                                                  | 117        |
| 3.2.4.7. Modelo de Hom .....                                                                      | 117        |
| 3.2.4.8. Modelo de Baranyi y Roberts .....                                                        | 117        |
| 3.2.5. VARIACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN .....                                                | 118        |
| 3.2.5.1. Concentraciones fágicas iniciales.....                                                   | 118        |
| 3.2.5.2. Flujo de radiación.....                                                                  | 119        |
| 3.2.5.3. Humedad relativa .....                                                                   | 119        |
| 3.2.5.4. Agregado de catalizador.....                                                             | 119        |
| 3.2.5.5. Medios de suspensión fágica .....                                                        | 120        |
| 3.2.6. COMBINACIÓN DE TECNOLOGÍAS .....                                                           | 120        |
| 3.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....                                                                 | 120        |
| <b>3.3. RESULTADOS.....</b>                                                                       | <b>122</b> |
| 3.3.1. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FÁGICA .....                                                       | 122        |
| 3.3.1.1. Segundo ciclo de radiación UV-C .....                                                    | 127        |
| 3.3.2. AJUSTE DE MODELOS CINÉTICOS .....                                                          | 128        |
| 3.3.3. VARIACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN .....                                                | 132        |
| 3.3.3.1. Concentraciones fágicas iniciales.....                                                   | 132        |
| 3.3.3.2. Flujo de radiación.....                                                                  | 133        |
| 3.3.3.3. Humedad relativa .....                                                                   | 138        |
| 3.3.3.4. Agregado de catalizador.....                                                             | 141        |
| 3.3.3.5. Medios de suspensión fágica .....                                                        | 143        |
| 3.3.4. COMBINACIÓN SECUENCIAL DE TECNOLOGÍAS .....                                                | 146        |
| <b>3.4. DISCUSIÓN .....</b>                                                                       | <b>148</b> |
| 3.4.1. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN .....                                                              | 148        |
| 3.4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE COLA.....                                                            | 152        |
| 3.4.2.1. Segundo ciclo de inactivación .....                                                      | 152        |
| 3.4.2.2. Concentraciones iniciales menores .....                                                  | 152        |
| 3.4.2.3. Dosis mayores .....                                                                      | 153        |
| 3.4.3. MODELO CINÉTICO .....                                                                      | 153        |
| 3.4.4. INFLUENCIA DE DISTINTAS CONDICIONES SOBRE LA INACTIVACIÓN FÁGICA BAJO RADIACIÓN UV-C ..... | 154        |
| 3.4.4.1. Flujo de radiación.....                                                                  | 154        |
| 3.4.4.2. Humedad relativa .....                                                                   | 154        |
| 3.4.4.3. Agregado de catalizador.....                                                             | 156        |
| 3.4.4.4. Medios de suspensión fágica .....                                                        | 157        |
| 3.4.5. COMBINACIÓN DE TECNOLOGÍAS .....                                                           | 159        |
| <b>CAPÍTULO 4 - REACTOR FOTOCATALÍTICO SEMIPILOTO .....</b>                                       | <b>161</b> |
| <b>4.1. RESUMEN DEL CAPÍTULO .....</b>                                                            | <b>162</b> |
| <b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                             | <b>164</b> |
| 4.2.1. BACTERIÓFAGO Y CEPA HOSPEDADORA .....                                                      | 164        |
| 4.2.2. SISTEMA EXPERIMENTAL .....                                                                 | 164        |
| 4.2.2.1. Soportes para el fotocatalizador y preparación de recubrimientos.....                    | 165        |
| 4.2.2.2. Sistema de emisión de radiación UV-A .....                                               | 167        |
| 4.2.2.3. Medición del flujo de radiación.....                                                     | 168        |
| 4.2.3. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FÁGICA .....                                                       | 169        |
| 4.2.4. CÁLCULOS TEÓRICOS .....                                                                    | 170        |
| 4.2.4.1. Cálculo de las constantes de inactivación.....                                           | 170        |
| 4.2.4.2. Cálculo de las eficiencias fotónica, cuántica y energética .....                         | 170        |
| 4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....                                                                 | 175        |
| <b>4.3. RESULTADOS.....</b>                                                                       | <b>176</b> |

|                                                                                    |            |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.1. DEPOSICIÓN DE CATALIZADOR EN LOS DISTINTOS SOPORTES .....                   | 176        |
| 4.3.2. CAMPO RADIANTE .....                                                        | 176        |
| 4.3.3. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN CON DISTINTOS SOPORTES .....                        | 178        |
| 4.3.3.1. <i>Vidrio borosilicato</i> .....                                          | 180        |
| 4.3.3.2. <i>Vidrio común esmerilado</i> .....                                      | 182        |
| 4.3.3.3. <i>Filtro</i> .....                                                       | 184        |
| 4.3.3.4. <i>Comparación entre los distintos soportes</i> .....                     | 186        |
| 4.3.4. CÁLCULO DE EFICIENCIAS .....                                                | 189        |
| 4.3.5. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN CON LUCES LEDs .....                                | 192        |
| 4.3.5.1. <i>Constantes de inactivación para filtro irradiado por LEDs</i> .....    | 192        |
| 4.3.5.2. <i>Comparación entre las distintas fuentes de radiación</i> .....         | 194        |
| 4.3.5.3. <i>Cálculo de eficiencias</i> .....                                       | 196        |
| <b>4.4. DISCUSIÓN .....</b>                                                        | <b>198</b> |
| 4.4.1. DEPOSICIÓN DE CATALIZADOR .....                                             | 198        |
| 4.4.2. SOPORTE PARA EL CATALIZADOR .....                                           | 199        |
| 4.4.3. FUENTES DE RADIACIÓN UV-A .....                                             | 203        |
| 4.4.4. BIOAEROSOLLES .....                                                         | 204        |
| 4.4.5. COMPARACIÓN CON OTRAS TECNOLOGÍAS .....                                     | 205        |
| <b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSIONES .....</b>                                             | <b>208</b> |
| <b>5.1. INACTIVACIÓN CON PINTURA FOTOCATALÍTICA .....</b>                          | <b>209</b> |
| <b>5.2. INACTIVACIÓN CON RADIACIÓN UV-C .....</b>                                  | <b>210</b> |
| <b>5.3. INACTIVACIÓN CON FOTOCATÁLISIS (UV-A, <math>\text{TiO}_2</math>) .....</b> | <b>211</b> |
| <b>5.4. INFLUENCIA DE CONDICIONES AMBIENTALES Y DE OPERACIÓN .....</b>             | <b>212</b> |
| <b>5.5. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>                                           | <b>213</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                                          | <b>216</b> |

## Abreviaturas y símbolos

|                                    |                                                                                                    |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| %                                  | Porcentaje                                                                                         |
| % p/p                              | Porcentaje peso en peso [g/100 g]                                                                  |
| % p/v                              | Porcentaje peso en volumen [g/100 ml]                                                              |
| % v/v                              | Porcentaje volumen/volumen [ml/100 ml]                                                             |
| <>                                 | Promedio                                                                                           |
| °C                                 | Grado centígrado                                                                                   |
| $^1\text{O}_2$                     | Oxígeno singlete                                                                                   |
| $A_P$                              | Área superficial de cada placa del reactor semipiloto                                              |
| A.                                 | <i>Aspergillus</i>                                                                                 |
| Abi                                | Infección abortiva                                                                                 |
| ADN                                | Ácido desoxirribonucleico                                                                          |
| $A_{irr}$                          | Área irradiada, área superficial recubierta                                                        |
| $\alpha$                           | Error típico para el análisis estadístico                                                          |
| $\alpha_f$                         | Fracción de energía absorbida por el recubrimiento de pintura o $\text{TiO}_2$ , según corresponda |
| $\alpha_{f - \text{No TiO}_2}$     | Fracción de energía absorbida por la pintura sin $\text{TiO}_2$                                    |
| $\alpha_{\text{TiO}_2^*, \lambda}$ | Fracción de radiación absorbida por unidad de peso y unidad de área superficial recubierta         |
| $\alpha_{\text{TiO}_2, \lambda}$   | Fracción de energía absorbida por el $\text{TiO}_2$ a la longitud de onda $\lambda$                |
| ANMAT                              | Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica                             |
| ANOVA                              | Análisis de varianza                                                                               |
| ARN                                | Ácido ribonucleico                                                                                 |
| ATCC                               | <i>American Type Culture Collection</i>                                                            |
| ATP                                | Trifosfato de adenosina                                                                            |
| B.                                 | <i>Bacillus</i>                                                                                    |
| BAL                                | Bacterias del ácido láctico                                                                        |
| C.                                 | <i>Candida</i>                                                                                     |
| $\text{Ca}^{2+}$                   | Ion Calcio                                                                                         |
| CAA                                | Código Alimentario Argentino                                                                       |
| CIP                                | <i>Clean in place</i> , limpieza <i>in situ</i>                                                    |
| cm                                 | Centímetro                                                                                         |
| $\text{cm}^2$                      | Centímetro cuadrado                                                                                |
| CNRZ                               | <i>Centre National de la Reserche Zootechnique</i>                                                 |
| CRISPR                             | <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>                                   |
| Cw                                 | Concentración de agua en la fase gaseosa [mol agua/ $\text{m}^3$ aire]                             |
| dUFP/dt                            | Derivada de las Unidades Formadoras de Placa respecto al tiempo, velocidad de inactivación fágica  |
| e-                                 | Electrón                                                                                           |
| $E_{\lambda}/E_T$                  | Emisión espectral relativa de las lámparas                                                         |
| E.                                 | <i>Escherichia</i>                                                                                 |
| EPS                                | Exopolisacáridos                                                                                   |
| $e^{a,s} = \text{LSRPA}$           | Velocidad local superficial de absorción de fotones                                                |
| eV                                 | Electrón volt                                                                                      |
| FAO                                | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>                                     |
| $f_d$                              | Factor de dilución                                                                                 |
| g                                  | Gramo                                                                                              |

|                         |                                                                                                       |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GRAS                    | Generalmente reconocidos como seguros                                                                 |
| h                       | Hora                                                                                                  |
| h <sup>+</sup>          | Hueco                                                                                                 |
| HO <sub>2</sub> •       | Radical Hidroperoxilo                                                                                 |
| HR                      | Humedad relativa                                                                                      |
| HTST                    | <i>High temperature, short time</i> ; Alta temperatura, corto tiempo                                  |
| I+D                     | Investigación y desarrollo                                                                            |
| ICTV                    | Comité Internacional de Taxonomía de Virus                                                            |
| INLAIN                  | Instituto de Lactología Industrial                                                                    |
| INTEC                   | Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química                                         |
| J                       | Joule                                                                                                 |
| k                       | Constante cinética de inactivación aparente                                                           |
| k <sub>coating</sub>    | Constante cinética de inactivación aparente debida a la presencia de recubrimientos                   |
| k <sub>control i</sub>  | Constante cinética de inactivación aparente obtenida con el Control i                                 |
| k <sub>control ii</sub> | Constante cinética de inactivación aparente obtenida con el Control ii                                |
| k <sub>light</sub>      | Constante cinética de inactivación aparente debida al efecto fotoquímico                              |
| k <sub>nph</sub>        | Constante cinética de inactivación aparente no fotocatalítica                                         |
| k <sub>ph</sub>         | Constante cinética de inactivación aparente exclusivamente fotocatalítica                             |
| k <sub>reactor</sub>    | Constante cinética de inactivación aparente obtenida con el Control iii                               |
| k <sub>1</sub>          | Parámetro cinético, constante cinética de proporcionalidad pre-potencia                               |
| k <sub>2</sub>          | Parámetro cinético, orden de velocidad de reacción considerando flujo de radiación incidente          |
| k <sub>3</sub>          | Parámetro cinético, punto medio de la función logística que modela la humedad relativa                |
| k <sub>4</sub>          | Parámetro cinético, pendiente de la curva de la función logística que modela la humedad relativa      |
| kb                      | Kilopares de bases                                                                                    |
| KDa                     | Kilodalton                                                                                            |
| k <sub>max</sub>        | Parámetro del modelo Geeraerd y Baranyi y Roberts, que representa la máxima velocidad de inactivación |
| k <sub>T</sub>          | Constante cinética de inactivación aparente total (obtenida con ensayos fotocatalíticos)              |
| L.                      | <i>Lactococcus</i>                                                                                    |
| λ                       | Longitud de onda                                                                                      |
| Lb.                     | <i>Lactobacillus</i>                                                                                  |
| Lc.                     | <i>Lactocaseibacillus</i>                                                                             |
| LD                      | Límite de detección                                                                                   |
| LDR                     | Leche descremada reconstituída                                                                        |
| LED                     | <i>Light emitting diode</i>                                                                           |
| Leuc.                   | <i>Leuconostoc</i>                                                                                    |
| Lp.                     | <i>Lactiplantibacillus</i>                                                                            |
| LTLT                    | <i>Low temperature, long time</i> ; Baja temperatura, tiempo prolongado                               |
| M                       | Molar                                                                                                 |
| m.o.i.                  | <i>Multiplicity of infection</i>                                                                      |
| M17                     | Medio de cultivo utilizado para el recuento de los estreptococos lácticos                             |
| m <sup>2</sup>          | Metro cuadrado                                                                                        |
| m <sup>3</sup>          | Metro cúbico                                                                                          |

|                                         |                                                                                                   |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| mg                                      | Miligramo                                                                                         |
| Mg <sup>2+</sup>                        | Ion Magnesio                                                                                      |
| min                                     | Minuto                                                                                            |
| mJ                                      | Milijoule                                                                                         |
| ml                                      | Mililitro                                                                                         |
| mM                                      | Milimolar                                                                                         |
| MRS                                     | Medio de cultivo, Man-Rogosa-Sharpe                                                               |
| N                                       | Número de placas del reactor                                                                      |
| n                                       | Número de muestras                                                                                |
| N <sub>L</sub>                          | Número de lámparas                                                                                |
| nm                                      | Nanómetro                                                                                         |
| $\eta_{abs}$                            | Eficiencia de inactivación fotocatalítica de absorción de radiación                               |
| $\eta_{ele}$                            | Eficiencia de inactivación fotocatalítica eléctrica                                               |
| $\eta_{ene}$                            | Eficiencia de inactivación fotocatalítica energética                                              |
| $\eta_{ph}$                             | Eficiencia de inactivación fotocatalítica fotónica                                                |
| $\eta_{qu}$                             | Eficiencia de inactivación fotocatalítica cuántica                                                |
| O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>           | Radical superóxido                                                                                |
| •OH                                     | Radical Hidroxilo                                                                                 |
| OMG                                     | Organismos genéticamente modificados                                                              |
| OMS                                     | Organización Mundial de la Salud                                                                  |
| P                                       | Concentración fágica [UFP/ml]                                                                     |
| P.                                      | <i>Penicillium</i>                                                                                |
| pb                                      | Pares de pases                                                                                    |
| P <sub>min</sub>                        | Parámetro del modelo Baranyi y Roberts que representa la porción de la cola ( <i>P</i> ) residual |
| P <sub>res</sub>                        | Parámetro del modelo Geeraerd que representa la porción de la cola ( <i>P</i> ) residual          |
| P <sub>0</sub>                          | Concentración fágica inicial [UFP/ml]                                                             |
| PAOs                                    | Procesos avanzados de oxidación                                                                   |
| P <sub>exp</sub>                        | Concentración fágica experimental                                                                 |
| PIP                                     | Proteína de Infección Fágica                                                                      |
| PIR                                     | Pico de irradiancia                                                                               |
| P <sub>L</sub>                          | Potencia de cada lámpara                                                                          |
| P <sub>mod</sub>                        | Concentración fágica predicha por el modelo                                                       |
| ppm                                     | Partes por millón [mg/l]                                                                          |
| Ps.                                     | <i>Pseudomonas</i>                                                                                |
| P <sub>T</sub>                          | Potencia del sistema de iluminación                                                               |
| q <sub>f, in</sub>                      | Flujo de radiación total incidente                                                                |
| q <sub>f, rf, λ</sub>                   | Flujo local de radiación reflejado por la superficie del recubrimiento                            |
| q <sub>f, tr, λ</sub>                   | Flujo local de radiación transmitido por la superficie del recubrimiento                          |
| q <sub>m<sup>-</sup></sub>              | Flujo de radiación incidente sobre la capa de catalizador desde el grupo de lámparas inferior     |
| q <sub>m<sup>-1</sup><sup>+</sup></sub> | Flujo de radiación incidente sobre la capa de catalizador desde el grupo de lámparas superior     |
| q <sub>P</sub>                          | Flujo de radiación incidente que llega a las placas del reactor semipiloto                        |
| r                                       | Velocidad de inactivación                                                                         |
| R                                       | Radiación [%]                                                                                     |

|                   |                                                                                         |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| $R_{fsf}$         | Reflectancia del sistema <i>film</i> - soporte - <i>film</i>                            |
| $R^2$             | Bondad del ajuste de la línea de tendencia                                              |
| $R_f$             | Reflectancia difusiva                                                                   |
| $R_m$             | Reflectancia difusa de la capa m                                                        |
| RMSE              | Error cuadrático medio                                                                  |
| ROS               | Especies oxidantes altamente reactivas                                                  |
| rpm               | Revoluciones por minuto                                                                 |
| $R_s$             | Reflectancia del sistema soporte sin recubrir                                           |
| s                 | Segundo                                                                                 |
| S.                | <i>Staphylococcus</i>                                                                   |
| SEM               | Microscopía electrónica de barrido                                                      |
| $\sigma$          | Desviación estándar                                                                     |
| SL                | Parámetro del modelo Geeraerd que representa el largo del hombro                        |
| $SO_4^{\bullet-}$ | Radical Sulfato                                                                         |
| St.               | <i>Streptococcus</i>                                                                    |
| subsp.            | Subespecie                                                                              |
| t                 | Tiempo                                                                                  |
| $T_{fsf}$         | Transmitancia del sistema <i>film</i> - soporte - <i>film</i>                           |
| $t_{99}$          | Tiempo necesario para inactivar el 99 % de las partículas fágicas iniciales             |
| TEM               | Microscopía electrónica de transmisión                                                  |
| $T_f$             | Transmitancia difusiva                                                                  |
| $\Theta$          | Ángulo de inclinación de las placas para el reactor semipiloto con respecto a la normal |
| $T_m$             | Transmitancia difusa de la capa m                                                       |
| $T_s$             | Transmitancia del sistema soporte sin recubrir                                          |
| UFP               | Unidades Formadoras de Placas                                                           |
| $\mu l$           | Microlitro                                                                              |
| $\mu m$           | Micrómetro                                                                              |
| UV                | Ultravioleta                                                                            |
| V                 | Volumen                                                                                 |
| VIS               | Visible                                                                                 |
| W                 | Watt                                                                                    |
| WPC               | <i>Whey Protein Concentrate</i> , Concentrado de Proteínas de Suero                     |
| XPS               | Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X                                             |

# **RESUMEN**

La infección por bacteriófagos, virus que infectan bacterias de forma específica, es la causa más común de falla de las bacterias ácido lácticas (BAL) empleadas en los procesos fermentativos de la industria láctea. Estas infecciones pueden causar una reducción o incluso la completa inhibición de las actividades desarrolladas por los cultivos lácticos, lo que deriva en dificultades tecnológicas y pérdidas económicas.

Los fagos pueden ingresar a las instalaciones industriales por diversas vías, por lo que su presencia resulta prácticamente inevitable. Aunque el sector industrial aplica distintas estrategias para reducir la frecuencia de estos ataques, ninguna resulta completamente eficiente y los fagos continúan representando un riesgo relevante para la industria láctea. Por este motivo resulta necesario explorar nuevas metodologías de inactivación fágica.

Inicialmente se estudió la inactivación de dieciséis fagos empleando una pintura fotocatalítica formulada con  $\text{TiO}_2$  dopado con carbono, bajo radiación visible ( $\lambda = 360 - 720 \text{ nm}$ ) en un reactor de laboratorio. Los fagos fueron depositados y secados sobre placas de vidrio recubiertas con pintura e irradiados por un máximo de 20 h. Se observó una cinética de inactivación de primer orden respecto de la concentración de fagos, lográndose la completa inactivación de ocho fagos, mientras que los restantes redujeron parcialmente su infectividad, evidenciando un comportamiento fago-dependiente.

A continuación, se procedió a investigar la inactivación de los dieciséis fagos empleando radiación UV-C ( $\lambda = 200 - 280 \text{ nm}$ ), utilizando la misma técnica de deposición que la anterior y el mismo reactor, por un tiempo máximo de tratamiento de 10 min. Se observó la inactivación completa de seis fagos a los 2 min de tratamiento (dosis de  $0,13 \text{ J/cm}^2$ ) y un efecto de cola para los diez restantes, es decir, persistencia de una fracción de fagos infectivos, al ser tratados con dosis de radiación entre  $0,13$  y  $0,32 \text{ J/cm}^2$ . Las curvas de inactivación obtenidas se ajustaron con modelos cinéticos disponibles en bibliografía. Por otro lado, cuando se combinó esta tecnología con fotocatálisis (UV-A =  $340 - 400 \text{ nm}$ ,  $\text{TiO}_2$ ) u ozono gaseoso (10 ppm) se logró una completa inactivación fágica, desapareciendo el efecto de cola.

En presencia de pintura fotocatalítica o de radiación UV-C, se estudió la influencia de diversas condiciones, como por ejemplo humedad relativa, flujo de radiación incidente, longitud de onda, agregado de catalizador y medio de suspensión, obteniendo resultados que dependieron de la condición ensayada y tecnología investigada. Para la pintura fotocatalítica se propuso un modelo cinético que relaciona la tasa de inactivación con la humedad relativa y con el flujo de radiación para predecir el comportamiento fágico, logrando muy buen ajuste.

Finalmente se estudió la inactivación del fago ATCC 8014-B1 (infectivo de *Lactiplantibacillus plantarum*) contenido en bioaerosoles mediante fotocatálisis (UV-A =

340 – 400 nm,  $\text{TiO}_2$ ) con el objetivo de optimizar el funcionamiento de un fotorreactor escala semi-piloto. Se investigó la inactivación depositando el catalizador sobre distintos soportes (vidrio borosilicato, vidrio común esmerilado y filtro) y utilizando diferentes fuentes de radiación UV-A (lámparas fluorescentes y LEDs). Todas las curvas de inactivación siguieron una cinética de primer orden respecto de la concentración de fagos. Las mayores eficiencias fotónica y cuántica fueron obtenidas utilizando el filtro y en presencia de lámparas LEDs. Con estas lámparas también se observó una mayor eficiencia energética en relación a las obtenidas al utilizar lámparas fluorescentes.

Las estrategias de inactivación estudiadas contribuirían a reducir la frecuencia de infecciones fágicas en la industria láctea. Sin embargo, es fundamental considerar la influencia de diversas condiciones ambientales en las tasas de inactivación. En base a esos resultados, podrían adaptarse equipos ya disponibles comercialmente para implementar estos procesos de inactivación de fagos en plantas lácteas.

# **CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1. Bacterias del ácido láctico**

Las bacterias del ácido láctico (BAL) constituyen un amplio grupo de bacterias, relacionadas por ciertas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Son organismos GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*, generalmente reconocidos como seguros), bacterias gram positivas, no formadoras de esporos, catalasa negativa, de hábitat no aeróbico pero aerotolerantes, muy exigentes nutricionalmente, no móviles, ácido tolerantes y estrictamente fermentativas, para las cuales el ácido láctico constituye uno de los productos principales de la fermentación de carbohidratos (von Wright et al., 2024). Según su morfología celular, se pueden clasificar en cocos (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, entre otros) y bacilos (*Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Carnobacterium*), y según su temperatura óptima de desarrollo, en mesófilas, si varía entre 22 y 30 °C, y termófilas, si varía entre 37 y 45 °C.

Como las BAL no poseen un sistema respiratorio funcional, deben obtener su energía mediante fosforilación a nivel de sustrato. Con las hexosas, existen dos vías fermentativas básicas. La vía homofermentativa que se basa en la glicólisis, mediante la cual produce únicamente ácido láctico. Por otro lado, la fermentación heterofermentativa produce, además de ácido láctico, cantidades significativas de dióxido de carbono y etanol o acetato mediante la vía de la pentosa fosfato (von Wright et al., 2024). Teóricamente la fermentación homoláctica produce 2 moles de ATP por mol de glucosa consumida. En la fermentación heteroláctica, en cambio, el rendimiento correspondiente es sólo 1 mol de ATP si la fórmula de acetilfosfato como intermediario se reduce a etanol. Sin embargo, si el acetilfosfato se convierte a ácido acético en presencia de aceptores de electrones alternativos, se forma un ATP adicional (von Wright et al., 2024).

Las BAL son capaces de reproducirse en diversos entornos, incluyendo los hábitats relacionados con el huésped, como los tractos intestinales de animales y humanos (Son et al., 2020; Zhou et al., 2020) o el tracto urogenital (Pan et al., 2020), así como nichos relacionados con los alimentos, como los lácteos (Quilodrán-Vega et al., 2020), vegetales, cárnicos, u otros tipos de alimentos fermentados (Lopez et al., 2022).

Sin embargo, sus requerimientos nutricionales resultan complejos, debido a su capacidad limitada de biosíntesis asociado a un reducido paquete enzimático, por lo que se las considera como bacterias muy exigentes desde el punto de vista nutricional. Por lo tanto, como fuente de carbono y energía utilizan principalmente azúcares simples (mono y disacáridos), como fuente de nitrógeno utilizan aminoácidos y péptidos cortos,

los cuales además se encuentran en baja concentración en la leche, y como factores de crecimiento emplean vitaminas (del grupo B) y nucleótidos.

Estas bacterias se emplean en distintas industrias, que involucran fermentaciones cárnicas, por ejemplo para la producción de salchichas (Fadda et al., 2024), fermentaciones de vegetales, frutas y semillas (pickles, chucrut, kimchi, aceitunas, chocolate, café, jugos fermentados y productos fermentados de soja) (Forssten y Ouwehand, 2024) y fermentaciones no alcohólicas de cereales (producción de pan, bebidas no alcohólicas y vinagre) (Gänzle, 2024), como así también pueden ser empleadas en la fermentación ácido láctica que se realiza dentro de los silo-bolsas (Ouwehand, 2024). Principalmente, en relación a la industria láctea, se utilizan como cultivos iniciadores o *starters* para la producción de queso, yogur, leches fermentadas y manteca (Binda y Ouwehand, 2024), siendo el queso y el yogur los productos lácteos fermentados más consumidos en nuestro país. Asimismo, cepas de BAL con actividad probiótica demostrada, son incorporadas en la producción de diversos alimentos funcionales con el fin de obtener efectos benéficos en la salud del consumidor.

En relación a los productos lácteos y dado que la leche es un producto altamente perecedero, la fermentación de la misma usando BAL es una forma natural para aumentar su vida útil y preservar los componentes nutritivos de la leche. Además, a través de la fermentación, la leche se transforma en un producto más fácilmente digerible, al mismo tiempo que aumenta su calidad organoléptica y sus propiedades nutricionales (Binda y Ouwehand, 2024). La popularidad de los productos lácteos fermentados se debe a la prolongación de su vida útil, seguridad, funcionalidad y propiedades sensoriales, nutricionales y beneficiosas para la salud del consumidor (Hill et al., 2017). La ingesta de estos productos puede ejercer efectos positivos sobre la salud, como por ejemplo la prevención de ciertas enfermedades, que pueden ser el resultado de interacciones directas con los microorganismos vivos ingeridos, o interacciones indirectas a través de la ingesta de metabolitos microbianos, productos de la fermentación o las matrices alimentarias iniciales *per se* (Gille et al., 2018).

La correcta selección y aplicación industrial de las BAL como cultivos iniciadores en la industria láctea es realmente muy importante para la estandarización de los procesos de producción durante la elaboración de alimentos lácteos fermentados, producidos en gran escala bajo condiciones controladas. Estas bacterias deben ser seleccionadas considerando las funciones que las mismas deben llevar a cabo dependiendo el producto a elaborar, evaluando su contribución a la seguridad, calidad y propiedades sensoriales del producto terminado. La principal función de los cultivos iniciadores es la transformación del alimento, en este caso, la leche. Por lo tanto, el primer paso para seleccionar las cepas que van a poder cumplir con las necesidades

del proceso, desarrollando adecuadamente las funciones requeridas específicamente para elaborar el producto deseado, consiste en considerar su tasa de acidificación, la producción de componentes para la biopreservación, la producción de componentes de *flavor*, entre otros (Weckx et al., 2009).

En base a esto, los géneros y especies de BAL más empleados en la industria láctea son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus thermophilus*.

En particular, las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* han sido principalmente aisladas de la leche, vegetales y piel de animales (Hernández Madagán, 2007). La especie de este género más relevante en la industria láctea es *L. lactis*, ya que forma parte de los cultivos iniciadores empleados en la producción de una gran variedad de quesos (Vitzilaiou et al., 2022) y manteca (Atamer et al., 2009), cumpliendo funciones de desarrollo de acidez, aroma, sabor y textura, como así también de conservación del producto final.

El género *Lactobacillus* está formado por un grupo heterogéneo de BAL, las cuales poseen implicancias importantes en la fermentación de alimentos. Los lactobacilos han sido empleados durante décadas en la preservación de alimentos, para realizar fermentaciones de productos lácteos, vegetales y salchichas, como así también como inoculantes en silos (Giraffa et al., 2010). Particularmente, una especie muy utilizada en la industria láctea es *Lb. delbrueckii*, tanto como una de las dos especies empleadas como cultivo iniciador (*starter*) en la producción de yogur (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) como para la elaboración de quesos tipo suizo (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*). Asimismo, es un constituyente fundamental de los cultivos iniciadores de suero empleados para la elaboración de quesos duros. Otra especie de gran importancia en la industria láctea es *Lb. helveticus*, utilizada en la elaboración de diversos tipos de quesos como Emmental, Grana Padano, Parmigiano Reggiano y Muzzarella.

Las especies del género *Lacticaseibacillus* como *rhamnosus*, *casei* y *paracasei* así como también *Lb. acidophilus*, son empleadas mundialmente en la producción de bebidas lácteas fermentadas y en algunos tipos de quesos. Sin embargo, no suelen emplearse como cultivos iniciadores debido a su escasa habilidad para desarrollar en leche, pero sí son adicionadas a productos lácteos como cultivos probióticos y también pueden participar en la fermentación secundaria durante la maduración de quesos, contribuyendo de manera beneficiosa con las características organolépticas del producto (Vinderola et al., 2000).

En el caso de *Lp. plantarum*, es una bacteria ácido láctica flexible y versátil, ya que se encuentra en una variedad de nichos ambientales incluyendo fermentaciones lácteas, cárnicas, de vegetales y cereales. Varios autores han demostrado propiedades

probióticas para algunas cepas de esta especie (Aljohani et al., 2025; Zhang et al., 2025), siendo utilizadas en la producción comercial de alimentos funcionales de diversas matrices.

El género *Leuconostoc* comprende a un grupo de BAL heterofermentativas frecuentemente utilizadas en la industria láctea. Este género también contribuye con la producción de compuestos de aroma y sabor como diacetilo, acetoína, acetato, entre otros, durante la elaboración de productos lácteos fermentados. Las especies *Leuc. mesenteroides* y *Leuc. pseudomesenteroides* suelen utilizarse como cultivos adjuntos, en combinación con otras especies bacterianas, para contribuir con la formación de ojos mediante la producción de CO<sub>2</sub> en la elaboración de quesos azules o tipo suizo. En particular, en la elaboración de quesos azules, se utilizan cepas de *Leuc. mesenteroides* para generar una textura abierta en la cuajada, mediante la producción de grandes cantidades de gas, lo que facilita la colonización de *Penicillium roqueforti* (Pujato et al., 2014).

*St. thermophilus* se utiliza como cultivo iniciador multifuncional para producir leches fermentadas, como el yogur, y quesos. En Argentina, es la especie de BAL más utilizada en la industria láctea fermentativa. Crece simbióticamente con *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante la fermentación para producir ácido láctico y acetaldehído, responsable del sabor característico del yogur. En los quesos, *St. thermophilus* contribuye a la acidificación de la leche y al desarrollo de sabor durante la maduración (Gobbetti y Calasso, 2014).

### 1.1.1. Funciones de las bacterias lácticas en la industria láctea

#### 1.1.1.1. Acidificación

Las BAL producen la acidificación de la leche, mediante la fermentación de la lactosa (azúcar mayoritario de la leche), que conduce a la producción de ácido láctico. Este proceso resulta esencial porque contribuye con el descenso del pH y la coagulación de la leche. La acidificación también influye significativamente en el aroma, sabor y textura del producto final (Carminati et al., 2016) y contribuye a la preservación y seguridad de los productos elaborados, como se explicará más adelante. Las BAL homofermentantes tienen mayor capacidad acidificante, por lo que son empleadas en los procesos productivos donde se necesitan acidificaciones mayores, como en el caso del yogur, para conducir a la coagulación de la leche, o en los quesos duros y semiduros, para contribuir con la contracción de la cuajada y la expulsión del suero. En cambio, las BAL heterofermentantes producen menor acidificación ya que, como se explicó previamente, realizan la fermentación por la vía enzimática de la pentosa fosfato, a través de la cual se obtiene ácido láctico junto a otros productos como el dióxido de

carbono y etanol. Estas bacterias son empleadas principalmente para contribuir con el desarrollo de caracteres organolépticos, ya que el dióxido de carbono producido por esta ruta favorece la formación de ojos en los quesos y, en conjunto con el etanol, afectan al aroma y sabor de los mismos (Høier et al., 2010).

#### 1.1.1.2. Proteólisis

Como se mencionó anteriormente, las BAL son muy exigentes nutricionalmente, y utilizan como fuente de nitrógeno aminoácidos o péptidos cortos. Como los mismos son escasos en la leche, las BAL han desarrollado un sistema proteolítico complejo para hidrolizar proteínas. El mismo está formado por las enzimas proteasa de pared, encargada de cortar la caseína de la leche y generar oligopéptidos; las enzimas permeasas, que transportan dichos péptidos dentro de la célula, y las enzimas peptidasas, encargadas de hidrolizar los péptidos, generando los aminoácidos que las bacterias utilizarán como fuente de nitrógeno. Además de ser indispensables para la obtención de fuente de nitrógeno para el desarrollo de las bacterias, los aminoácidos originados a partir de la proteólisis son luego transformados en compuestos de *flavor*, lo cual representa también una importancia tecnológica principalmente durante la elaboración de quesos (von Wright et al., 2024).

#### 1.1.1.3. Actividad lipolítica

La capacidad lipolítica de las BAL es generalmente escasa, pero pueden contener algunas enzimas esterolíticas y lipolíticas intracelulares, capaces de hidrolizar ciertos ácidos grasos. La presencia de los ácidos grasos libres producidos por lipólisis contribuye al *flavor*, principalmente de los quesos, ya que actúan como precursores de compuestos responsables del aroma y sabor de los mismos (De Angelis y Gobbetti, 2011).

#### 1.1.1.4. Producción de aroma y sabor

Mediante distintos mecanismos tales como la proteólisis, lipólisis, metabolismo del ácido cítrico y la misma heterofermentación de los azúcares, las BAL producen los compuestos de aroma y sabor característicos de los productos lácteos, tales como el diacetilo (importante en manteca y quesos frescos), acetaldehído (importante en yogur), acetona, acetoína y etanol (Høier et al., 2010).

#### 1.1.1.5. Protección del producto hacia microorganismos alterantes y patógenos

Esta protección se produce como consecuencia de la acidificación (producción de ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico), ya que al bajar el pH los microorganismos alterantes y patógenos encuentran dificultades para desarrollar, al ser inhibidos por la acidez. Las BAL también pueden producir otros compuestos, tales como

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y bacteriocinas, que tienen la capacidad de controlar o reducir el desarrollo de bacterias indeseables, lo que resulta fundamental en la conservación de alimentos y la seguridad alimentaria (Fergus et al., 2019).

#### 1.1.1.6. Actividad probiótica

Algunas cepas de BAL poseen actividad probiótica, lo que significa que, al ser suministrados en cantidades adecuadas, conferirán un efecto beneficioso en la salud del consumidor (Salminen et al., 2021). Los beneficios asociados al consumo de microorganismos probióticos específicos son muy diversos e incluyen la estimulación del sistema inmunológico, la reducción del riesgo de diarrea o de la duración de la misma (Fagnant et al., 2023; Urbńska et al., 2016), mejoras en los síntomas tanto del síndrome del colon irritable (Wen et al., 2020) como de cólicos infantiles (Y. Liu et al., 2022; Schreck Bird et al., 2017) y de la intolerancia a la lactosa (Savaiano, 2014), la prevención de enterocolitis necrotizante en prematuros, entre otros (J. Sun et al., 2017; Thomas et al., 2017; H. Wang et al., 2023).

#### 1.1.1.7. Formación de exopolisacáridos

Algunas BAL presentan la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS), definidos como una red de filamentos que están compuestos por residuos de distintos azúcares dispuestos de manera repetitiva. Estos pueden quedar adheridos a la célula (polisacáridos capsulares) o ser excretados al medio (polisacáridos viscosos). La producción de EPS representa un importante aporte tecnológico ya que, además de aumentar el rendimiento en el caso de elaboración de quesos (ayudando a la cohesión de la pasta), pueden mejorar la textura de leches fermentadas, evitando la sinéresis del coágulo, lo que produce efectos sobre la firmeza, viscosidad, suavidad y estabilidad del producto (Ale et al., 2016). Además, se ha reportado que estos compuestos podrían generar efectos beneficiosos en la salud del consumidor, mediante actividades inmunoestimulantes (Salazar et al., 2014), antitumorales y reductoras del colesterol (K. Wang et al., 2014).

## **1.2. Productos lácteos fermentados**

### 1.2.1. Yogur

El Código Alimentario Argentino (CAA) define al yogur como el producto de la leche coagulada, obtenida por fermentación láctica, mediante la adición de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, con o sin adición de nata pasteurizada, suero en polvo, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche (ANMAT, 2006a). Estas bacterias deben encontrarse viables y activas en el yogur

(contenido total mayor a  $10^7$  UFC/g al momento del consumo) durante el período de validez del mismo (FAO/OMS, 2011). El yogur es producido a través de la fermentación ácido-láctica de la leche, realizada por las bacterias previamente mencionadas. La importancia de *St. thermophilus* en la fermentación láctea se debe a varios motivos. En primer lugar, posee una capacidad de acidificación rápida, lo que es sumamente útil para disminuir el pH de la leche utilizada para las fermentaciones. Por otro lado, *St. thermophilus* tiene la capacidad de producir metabolitos que contribuyen sinérgicamente al crecimiento de los lactobacilos. Específicamente en la producción del yogur, la interacción que se produce entre ambas especies es conocida como proto-cooperación. *St. thermophilus* produce dióxido de carbono y ácido fórmico, lo que estimula el crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que los lactobacilos hidrolizan proteínas de la leche, liberando péptidos y aminoácidos que estimulan el crecimiento y actividad de *St. thermophilus*. Asimismo, esta proto-cooperación favorece la síntesis de metabolitos tales como acetaldehído y acetoina, que contribuyen a las propiedades sensoriales de los productos lácteos (Sieuwerts et al., 2008).

La popularidad mundial que posee el yogur está estrechamente vinculada a las bacterias que lo componen, ya que son las responsables de su característico aroma agradable, textura y algunos de sus aspectos saludables (Marette et al., 2017). El efecto benéfico más conocido y mejor descrito es el relacionado a la reducción de los síntomas asociados a la intolerancia a la lactosa (Saborido y Leis, 2018). Por otro lado, el consumo de yogur se ha asociado a la reducción del riesgo de diabetes tipo 2 (G.-C. Chen et al., 2017; Gille et al., 2018) como así también a la disminución del riesgo de hipertensión arterial (Y. Chen et al., 2014; Rai et al., 2017). Finalmente, las cepas bacterianas presentes en el yogur podrían interactuar con la microbiota intestinal, mejorando la diversidad de la misma (Zhernakova et al., 2016), eliminando bacterias entéricas patógenas y pudiendo también reforzar la barrera intestinal (Rohde et al., 2009).

### 1.2.2. Queso

El CAA define al queso como un producto fresco o madurado que se obtiene por separación del suero de la leche, coagulada por acción del cuajo y/o enzimas específicas, complementada o no por bacterias específicas o por ácidos orgánicos permitidos a este fin, con o sin el agregado de sustancias colorantes permitidas, especias o condimentos u otros productos alimenticios (ANMAT, 2006b).

El proceso productivo básico del queso sigue esencialmente los siguientes pasos: se agregan los cultivos iniciadores y posteriormente para lograr la coagulación, el cuajo. A continuación, se corta el coágulo formado y se drena el suero. Finalmente, la cuajada remanente es prensada en un molde y se deja madurar (Fox y McSweeney,

2017). Si bien el proceso de producción de los distintos tipos de quesos sigue esencialmente los mismos pasos, la variedad de quesos es casi infinita. Las diferencias en los diversos tipos de quesos están relacionadas con el uso de distintos cultivos iniciadores (*starters*), naturales o comerciales, la presencia o ausencia de mohos, los métodos de separación del suero de quesería (filtrado, prensado o calentamiento), los diferentes métodos de maduración (variación del tiempo y las condiciones ambientales en la cámara de maduración, el untamiento de la superficie del queso con diversas preparaciones, entre otras), como así también con el uso de leche pasteurizada o sin pasteurizar. A partir de las variaciones de estos parámetros y de las distintas formas, tamaños e ingredientes agregados en la producción, se puede obtener una gran variedad de quesos (Binda y Ouwehand, 2024).

Teniendo en cuenta lo expuesto, en todos los procesos que involucran BAL, es menester que dichas bacterias presenten una elevada viabilidad y actividad, de modo que puedan desarrollar sus funciones satisfactoriamente y así obtener productos con las características deseadas. Por este motivo, es fundamental mantener las infecciones fágicas bajo control, ya que éstas son la principal causa de falla de los procesos fermentativos donde las BAL se encuentran involucradas.

### **1.3. Bacteriófagos**

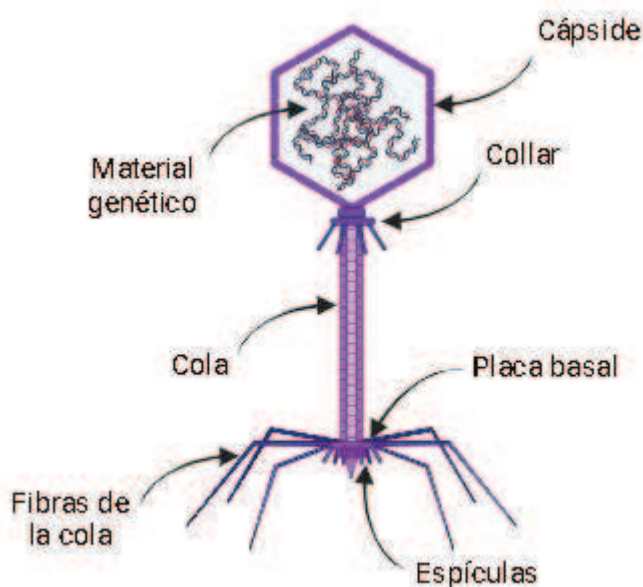
Los bacteriófagos, o más comúnmente llamados fagos, son virus que infectan bacterias y se encuentran presentes en todos los ecosistemas que ellas habiten, como por ejemplo el suelo, las plantas, el agua y los animales. Incluso en los humanos, los fagos pueden encontrarse en la boca, piel, estómago, intestino o vagina (Hoyle et al., 2014). De esta manera, los fagos son la entidad biológica más abundante del planeta, alcanzando un valor cercano a  $10^{31}$  partículas virales totales, ejerciendo un rol de modulador en las poblaciones bacterianas.

El término “bacteriófago” proviene del griego y está compuesto por las palabras “bacteria” y “*phagein*” (fago), significando “devorador de bacterias”. Este término fue introducido por primera vez por Félix d'Hérelle en 1917, aunque existe evidencia previa (años 1847, 1896, 1898 y 1915) de una posible actividad de estos virus sobre la actividad bacteriana (Mahony et al., 2019). Como los fagos infectan exclusivamente a bacterias y lo hacen de manera muy específica, fueron considerados en primera instancia como una estrategia muy prometedora para luchar contra las infecciones bacterianas humanas, pero, con el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Sir Alexander Fleming, dicha aplicación quedó relegada (Abedon et al., 2017).

Al infectar a la cepa bacteriana (cepa sensible u hospedadora), el fago utiliza la maquinaria biosintética de la bacteria para multiplicarse, causando su lisis, para producir la liberación de nuevos viriones que podrán infectar otras células bacterianas. A pesar de ser altamente específicos de la cepa sensible, es posible que algunos fagos infecten cepas diferentes dentro de la misma especie bacteriana, si éstas están relacionadas genéticamente entre sí (Pujato et al., 2019).

### 1.3.1. Estructura de los bacteriófagos

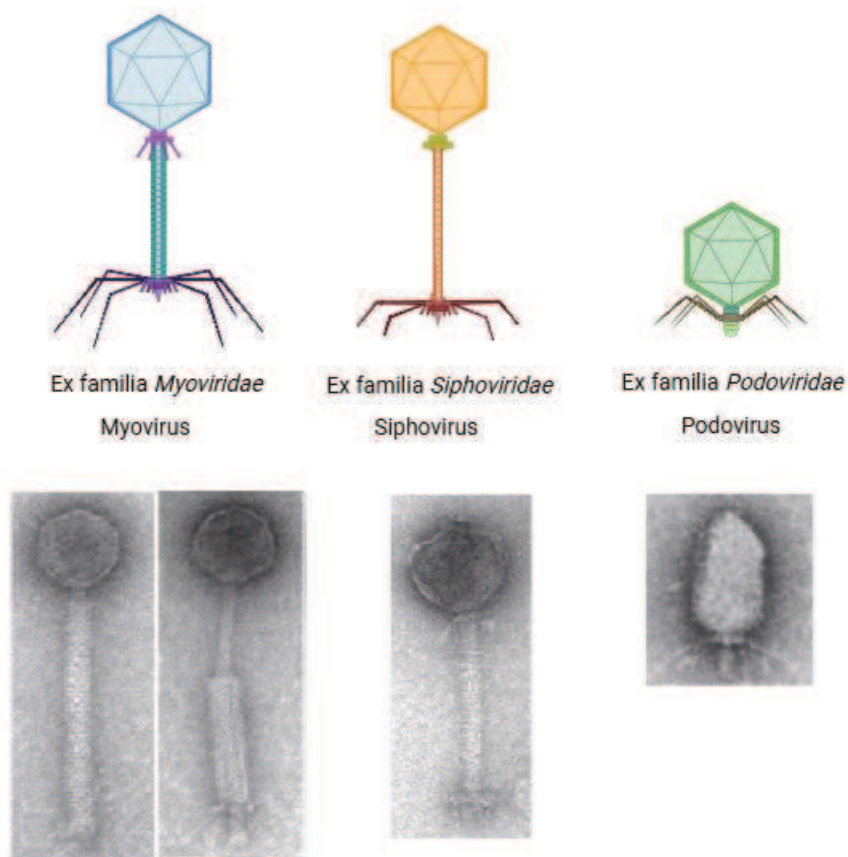
Los bacteriófagos pueden medir en promedio entre 50 y 200 nm, aunque pueden encontrarse partículas virales más pequeñas o de mayor tamaño al mencionado (Richter et al., 2018). Los fagos también muestran una diversidad genómica extraordinaria, siendo el tamaño promedio del genoma de  $62,5 \pm 46,8$  kb, aunque se han reportado fagos con un tamaño que oscila desde 2435 pares de bases (pb) hasta el caso de los “fagos Jumbo” ( $> 200$  kb) (Dion et al., 2020). La mayoría de los fagos están constituidos por una cabeza, estructura proteica que contiene en su interior al material genético, y una cola (fagos con cola). La cola puede variar en longitud, y en algunos casos, estar recubierta por una vaina. Además, puede ser contráctil y su unión a la cápside puede estar mediada (o no) por un collar. El componente encargado del anclaje del fago a la cepa sensible es la placa basal, la cual realiza el anclaje mediante la presencia de fibras (Capra et al., 2018) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Morfología básica de los bacteriófagos.

De acuerdo a su morfología, los fagos solían clasificarse en tres familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* (Figura 1.2). Los fagos pertenecientes a la ex familia *Myoviridae* poseen una cola contráctil, mientras que los pertenecientes a la ex familia *Siphoviridae* presentan una cola larga no contráctil y los pertenecientes a la ex

familia *Podoviridae* se caracterizan por poseer colas cortas no contráctiles (H.-W. Ackermann, 2009; Mahony et al., 2019). Por otro lado, las cápsides también pueden presentar diferencias: pueden ser de forma prolata o icosaédrica, presentar diferentes tamaños y composición de proteínas. Tanto la cápside como la cola están formadas por proteínas, y la cápside contiene en su interior al material genético, el cual puede ser ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN), de simple o doble cadena, siendo lo más común ADN lineal de cadena doble (Dion et al., 2020).



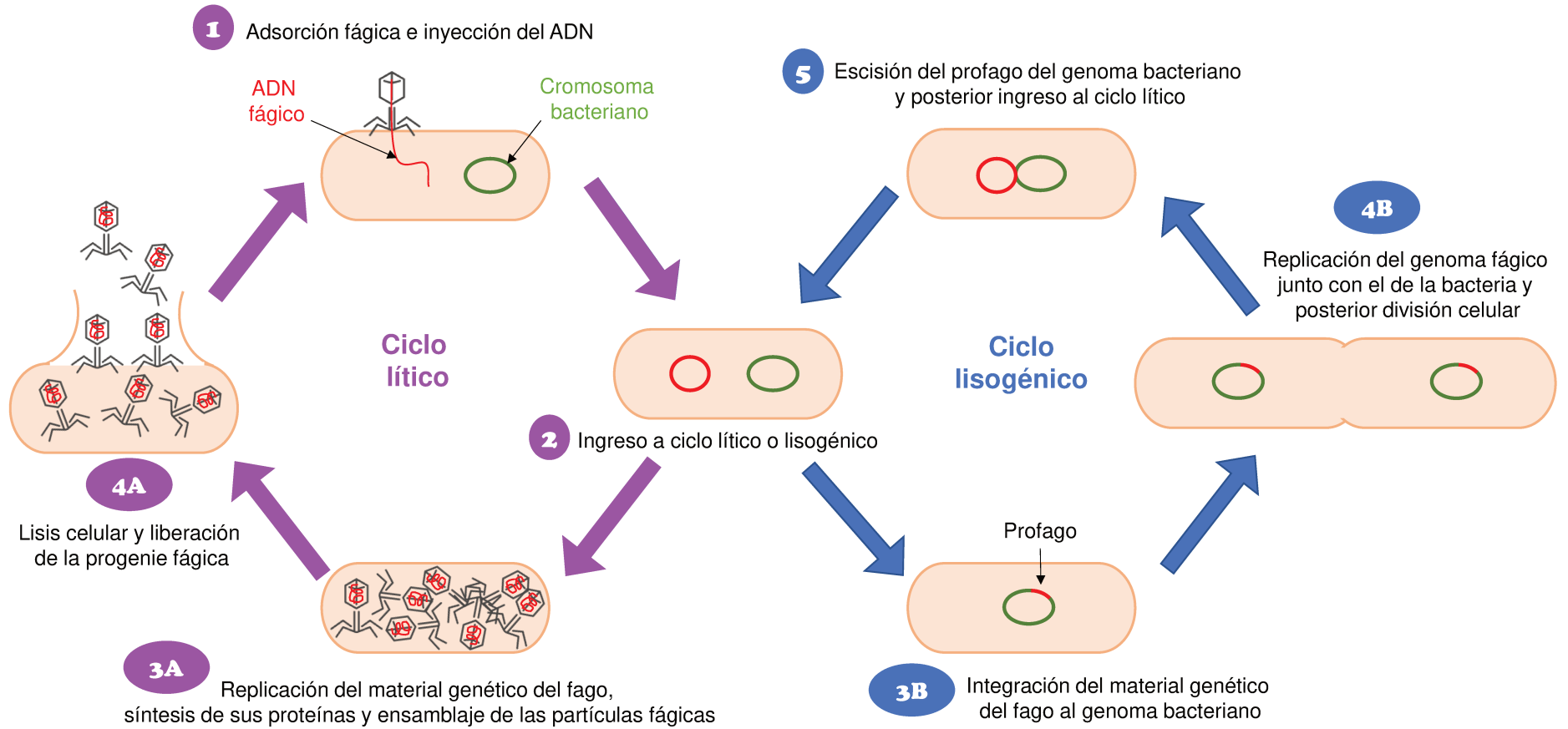
**Figura 1.2.** Clasificación de los fagos según su morfología junto a micrografías electrónicas de los fagos Lgal (infectivo de *Lb. gasseri*, myovirus) con su cola extendida y contraída, P335 (infectivo de *L. lactis*, siphovirus) y P026 (infectivo de *L. lactis*, podovirus). Las micrografías fueron obtenidas de Deveau et al. (2006) e Ismail et al. (2009).

En los últimos años se ha planteado que la clasificación de los virus en las familias *Myoviridae*, *Shipoviridae* y *Podoviridae*, considerando únicamente su morfología, no resultaba completamente adecuada. Por este motivo, se propuso una nueva clasificación, basada además en los genomas fágicos, que reflejan de manera más adecuada la diversidad y la relación genómica entre los fagos. De esta manera, el

Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), decidió eliminar las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, como así también el orden *Caudovirales*. Este último fue reemplazado por la clase *Caudoviricetes* para agrupar a todos los virus bacterianos y arqueanos que presenten cola, cápside icosaédrica y ADN de doble cadena (Turner et al., 2023). Actualmente, para referirse a los virus según su morfología es posible emplear los términos “podovirus”, “myovirus” y “siphovirus”, relacionados con las antiguas familias, pero sin un significado taxonómico formal (Turner et al., 2023).

### 1.3.2. Ciclos de multiplicación de los fagos

Según su ciclo de multiplicación, los bacteriófagos pueden clasificarse en fagos virulentos o líticos y en fagos temperados. Para multiplicarse, los primeros llevan adelante el ciclo lítico, es decir que luego de infectar su cepa sensible se multiplican dentro de ella y producen la lisis de la misma, liberando así la progenie viral producida al exterior de la bacteria (Figura 1.3). En cambio, los fagos temperados pueden multiplicarse a través del ciclo lítico o del ciclo lisogénico. En este último ciclo, el fago es capaz, luego de infectar a la bacteria, de integrar su ADN en el genoma bacteriano, a través de una combinación sitio-específica. El fago en este estado se denomina profago, y es capaz de replicarse junto al genoma bacteriano, permaneciendo latente, sin provocar la lisis celular (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Ciclos de multiplicación de los fagos.

#### 1.3.2.1. Ciclo lítico

El primer paso en este ciclo consiste en la adsorción específica del fago a la célula sensible a través de su cola. Para que este evento ocurra, es necesaria la presencia de receptores fágicos de distinta naturaleza presentes en la pared celular de la cepa sensible, tales como proteínas y carbohidratos. El reconocimiento de estos receptores está mediado por la placa basal, las espículas y las fibras, que son estructuras que se encuentran ubicadas en el extremo de la cola del fago. Es frecuente que en primer lugar el fago se una a los carbohidratos presentes en la superficie bacteriana mediante una unión reversible y que a continuación se produzca una unión irreversible que involucra las proteínas de la membrana celular (Capra et al., 2018). La eficiencia y la velocidad de adsorción son parámetros importantes que pueden variar de un sistema fago-cepa sensible a otro, dependiendo de factores externos (temperatura, pH del medio, etc.) y del estado fisiológico de la cepa huésped.

Luego de que se produzca la unión irreversible en la etapa de adsorción, el genoma fágico se inyecta, pasando a través de su cola, e ingresa a la célula hospedadora. La partícula fágica carente de ADN, denominada fantasma, permanecerá unida en la superficie bacteriana. Este proceso generalmente requiere energía celular proveniente de células intactas (ATP) y depende de la maquinaria de síntesis de proteínas de la cepa sensible (Capra et al., 2018). Si bien está establecido que los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son, la mayoría de las veces, indispensables para que el ciclo lítico se realice eficientemente (más específicamente las etapas de adsorción e inyección), los mecanismos de acción de estos cationes son diversos. Una vez dentro de la célula bacteriana, el ADN fágico puede expresarse y replicarse. El paso inicial en esta etapa implica el reconocimiento de promotores de fagos por parte de la ARN polimerasa de la cepa hospedadora, lo que conduce a la transcripción de genes tempranos. Los productos de estos genes pueden proteger el genoma del fago y reestructurar al huésped acuerdo a las necesidades del fago. A menudo, se transcribe un conjunto de genes de expresión intermedia, sintetizando el nuevo ADN del fago, seguido de un conjunto de genes tardíos que codifican proteínas estructurales y la proteína lisina, fundamental para la última etapa del ciclo lítico (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021; Capra et al., 2018). Luego de que se produce la síntesis de las macromoléculas, los componentes del fago son ensamblados y el ADN es empaquetado en las cápsides. Durante la etapa de empaquetamiento o previo a la misma, la cápside se expande y se vuelve más estable, con un aumento del volumen interno del ADN. En uno de los vértices de la cápside se encuentra un complejo portal que sirve como punto de partida para el ensamblaje de la cápside, como lugar de acoplamiento para las enzimas de empaquetamiento del ADN, como conducto para el paso del ADN y como

lugar de unión para la cola del fago, que se ensambla por separado (Capra et al., 2018). Las cápsides se unen a las colas y el ciclo lítico se completa cuando la progenie fágica es liberada desde el interior de la célula hospedadora hacia el medio ambiente. En esta etapa participan, de forma conjunta y coordinada, dos enzimas codificadas por el genoma del fago, que se denominan lisina y holina. Las holinas son pequeñas proteínas que se acumulan en la membrana celular bacteriana hasta alcanzar una concentración determinada, a partir de la cual crean poros en la misma, permitiendo que las lisinas accedan a la pared celular, degradándola y causando finalmente la lisis celular (Khan et al., 2023). De esta manera, los viriones liberados podrán encontrar células no infectadas y dar inicio a nuevos ciclos de infección (Capra et al., 2018).

#### 1.3.2.2. Ciclo lisogénico

Las primeras etapas de este ciclo son similares a las descritas para el ciclo lítico, ya que se produce la adsorción del fago a la célula sensible y la posterior inyección del material genético del fago al interior de la célula bacteriana. En este caso, el ADN fágico se integra al genoma bacteriano y permanece en un estado latente, denominado profago, replicándose y transmitiéndose a las próximas generaciones de la célula sensible durante la multiplicación celular (Capra et al., 2018), denominándose a la cepa que contiene al profago como cepa lisógena. El profago puede existir dentro del genoma de la bacteria en una o múltiples copias, y le confiere a la bacteria huésped cierta resistencia o inmunidad frente al ataque de fagos que estén relacionados (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021).

Este estado de lisogenia puede permanecer durante un tiempo indeterminado, hasta que, por algún factor externo o de forma espontánea, el fago inicia un ciclo de vida lítico, momento en el cual escindirá su material genético del genoma bacteriano y comenzará la replicación del mismo, siguiendo el ciclo de multiplicación lítico. Entre las condiciones que pueden inducir la escisión del profago se pueden mencionar a la mitomicina C como el agente químico inductor por excelencia (Mercanti et al., 2011), la radiación ultravioleta, fluctuaciones en la temperatura, el pH o en la presión osmótica, presencia de antibióticos o incluso falta de algunos nutrientes. Sin embargo, también existen inducciones espontáneas, sin un factor aparente que las desencadene (Capra et al., 2018). En un principio, un fago proveniente de una cepa lisógena no infectará a la cepa que le dio origen, ya que la misma es resistente a esta infección, pero sí es capaz de infectar otras cepas. Sin embargo, recientemente se ha observado la infección lítica de una cepa por parte de fagos temperados liberados a partir de la misma cepa (Capra et al., 2018). Como consecuencia, es esencial evitar el uso de cepas lisógenas en cultivos iniciadores, ya que, en caso de liberarse los profagos contenidos en dichas

cepas, se podría producir la lisis celular durante los procesos fermentativos, ocasionando graves problemas tecnológicos y económicos (Pujato et al., 2019).

#### **1.4. Infecciones fágicas en la industria láctea**

Como se explicó anteriormente, los fagos son virus que infectan bacterias y utilizan el material genético y la maquinaria biosintética de la célula infectada para multiplicarse. En la industria láctea, las BAL cumplen funciones fundamentales para llevar adelante los procesos fermentativos. Por este motivo, las infecciones fágicas representan un problema significativo y persistente. Se estima que entre un 0,1 y un 10 % de las fermentaciones lácteas fallan durante el proceso debido a la presencia de fagos (Moineau y Lévesque, 2005). Estas fallas ocasionadas por las infecciones fágicas resultan en la potencial pérdida de la producción, productos de baja calidad y malgasto de ingredientes, lo que genera grandes pérdidas económicas para el sector industrial (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021).

##### **1.4.1. Fuentes de ingreso de fagos a las industrias lácteas**

La leche cruda que ingresa a las plantas de procesamiento constituye la principal fuente de ingreso de fagos a los ambientes industriales, ya sea como viriones o profagos en cepas de BAL salvajes (Fernández et al., 2017). Las concentraciones fágicas en la leche cruda varían entre  $10^1$  y  $10^4$  UFP/ml (Moineau y Lévesque, 2005). La fluidez de la leche posiblemente contribuye a la dispersión de los viriones y a una posible proliferación de los mismos en caso de encontrar éstos una cepa sensible a la cual infectar. Más aún, se ha encontrado una gran diversidad de fagos en la leche, debida probablemente a la mezcla de leche cruda proveniente de diversos orígenes (Moineau y Lévesque, 2005). Al analizar muestras de leche cruda recolectada de tambos españoles, se observó que el 10 % de las muestras contenía fagos infectivos de lactococos (Madera et al., 2004). Más aún, al analizar muestras de leche empleadas para la producción de yogur en una industria española, se detectó material genético de fagos infectivos de lactococos y estreptococos en un 37 % de ellas (del Rio et al., 2007).

Algunos autores han informado que la mayoría de los fagos infectivos de BAL son capaces de resistir las condiciones de pasteurización normalmente aplicadas a la leche cruda en los procesos de fabricación, e incluso tratamientos más intensos (Briggiler Marcó et al., 2019; Capra et al., 2013; Wagner et al., 2017). Como consecuencia, los fagos que resisten los tratamientos térmicos permaneciendo infectivos en la leche podrían propagarse durante las etapas de fermentación si encuentran una cepa sensible a la cual infectar, alcanzando altas concentraciones en los productos finales y sus subproductos y posiblemente causando retrasos o completa

inhibición del proceso fermentativo. Por otro lado, las soluciones de salmuera empleadas en la industria quesera para la etapa de salado también pueden contener elevadas concentraciones de fagos ( $10^8$  UFP/ml, Atamer et al., 2009, 2011), pudiendo contribuir a la diseminación de los mismos por la planta. La principal vía de diseminación de los fagos dentro de la industria láctea es la presencia de bioaerosoles, que son producidos por salpicaduras de líquido, movimiento del personal o la manipulación de equipos y/o leche cruda contaminados con partículas fágicas (Fernández et al., 2017), pudiendo alcanzar concentraciones entre  $10^2$  UFP/m<sup>3</sup> a  $10^8$  UFP/m<sup>3</sup> en distintas áreas de plantas queseras, como fue documentado para fagos de lactococos (Neve et al., 1995). Asimismo, Colombo et al. (2018) reportaron que en los bioaerosoles de las plantas lácteas se encuentran fagos capaces de infectar a las especies bacterianas usadas para los procesos fermentativos de dichas plantas.

Además, las diversas superficies de trabajo también son una potencial fuente de contaminación de bacteriófagos en los procesos productivos, posiblemente subestimada. Por ejemplo, Verreault et al. (2011) detectaron material genético fágico en diversas superficies de trabajo como equipos, tuberías, pisos, paredes, escaleras, manijas de puertas, mesas de oficina y materiales de limpieza. Estos datos reafirman la necesidad de reforzar medidas de sanitización en todos los ambientes y superficies de las plantas de elaboración.

Otra fuente de ingreso de los fagos en la industria láctea son las cepas de BAL lisógenas. Como se explicó anteriormente, la bacteria lisógena contiene al profago, el genoma fágico integrado al bacteriano, que, por algún factor externo o de forma espontánea, puede iniciar el ciclo lítico, escindiendo su material genético del genoma bacteriano y continuando con su multiplicación, produciendo la lisis bacteriana y posterior liberación de los viriones. Por este motivo, la ausencia de cepas lisógenas entre las de los cultivos iniciadores debería ser verificada. En este sentido, algunos autores han encontrado que la lisogenia es muy común entre cepas pertenecientes a las especies bacterianas que comúnmente son empleadas como cultivos probióticos (Zaburlin et al., 2017).

Finalmente, los subproductos lácteos reciclados son también una potencial fuente de ingreso de los fagos a la industria láctea. Como ejemplo es posible mencionar el suero de quesería, en el cual la concentración de los bacteriófagos puede alcanzar hasta  $10^9$  UFP/ml, pudiendo pasar luego a formar parte de los aerosoles diseminándose por toda la planta (Atamer et al., 2013; Lavelle et al., 2018). En los últimos años se ha propuesto el aprovechamiento de los componentes de los subproductos lácteos (proteínas, lactosa, entre otros) como el suero de quesería. En particular, diversas tecnologías de membrana son aplicadas para recuperar y concentrar las proteínas de

suero a partir del suero de quesería, obteniendo productos como los Concentrados de Proteínas de Suero (*Whey Protein Concentrate*, WPC, por sus siglas en inglés). Los mismos suelen ser adicionados durante la elaboración de quesos y leches fermentadas para aumentar el rendimiento del proceso, como así también mejorar su calidad nutricional (aumentando el contenido proteico), la textura o calidad de los productos elaborados (Masotti et al., 2017). Sin embargo, se ha reportado que estos productos pueden contener elevada carga fágica como fue demostrado por Wagner et al. (2017). Específicamente, Briggiler Marcó et al. (2022) encontraron la presencia de fagos infectivos de cepas comerciales de *St. thermophilus* en concentraciones de hasta  $10^5$  UFP/g en muestras comerciales de WPC en Argentina. Por lo tanto, se debe tener en cuenta que a través de la adición de estos productos como ingredientes, se podrían estar incorporando fagos a las líneas de fermentación, lo que constituye una potencial fuente de ingreso a considerar (Samtlebe et al., 2017).

#### 1.4.2. Infecciones fágicas en procesos productivos de la industria láctea

En la industria láctea fermentativa se presentan diversos escenarios en relación a la frecuencia de infecciones fágicas. Por un lado, en el proceso de producción de leches fermentadas y yogur, la leche es sometida a un calentamiento que implica una mayor temperatura (90 °C) que en el caso de la industria quesera, lo que contribuye considerablemente a reducir la carga fágica de la materia prima. Además, el proceso de elaboración se realiza en tanques cerrados, lo cual lo convierte en un proceso relativamente aséptico, con ausencia de drenaje y circulación de suero. Esto hace que la frecuencia de infecciones fágicas resulte baja. En este caso, los posibles lugares de ingreso de fagos al proceso productivo son principalmente los cultivos iniciadores conteniendo cepas lisógenas y la eventual ruptura de barreras físicas tales como válvulas, cañerías o tanques que facilitarían la contaminación del proceso con fagos y otros microorganismos (A. del L. Quiberoni y Reinheimer, 2012).

Por el contrario, en la industria quesera las infecciones fágicas son más frecuentes ya que, por un lado, se realiza un calentamiento suave de la leche (pero que asegure su pasteurización) para evitar desnaturalizar proteínas y la consecuente reducción del rendimiento del proceso, por lo que una gran proporción de fagos presentes inicialmente en la materia prima permanecerían infectivos luego de esta etapa (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021). Adicionalmente, el proceso de producción de queso involucra numerosas etapas, en las cuales los operarios emplean numerosos utensilios, que pueden constituir fuentes de contaminación. En estas etapas se produce la separación de suero (conteniendo el 90 % de la carga fágica del proceso) y con su manipulación, la consecuente generación de los bioaerosoles, que son la principal vía de diseminación de los fagos en la planta productiva (Wagner et al., 2017).

Finalmente, los procesos de elaboración de productos lácteos probióticos son altamente controlados, tanto desde el punto de vista microbiológico como tecnológico, debido a las importantes inversiones realizadas en el área de investigación y desarrollo (I+D) para la identificación y caracterización de cepas con efectos probióticos que se incluirán en estos productos. En este contexto, resulta fundamental que los procesos productivos que emplean dichas cepas se lleven a cabo sin inconvenientes. Cabe mencionar que la lisogenia está ampliamente distribuida en cepas del género *Lactocaseibacillus*, género extensamente usado por sus características probióticas, como se mencionó previamente, por lo que constituyen la principal fuente de ingreso de bacteriófagos en estos procesos (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021; Zaburlin et al., 2017). En consecuencia, las infecciones fágicas suelen ocurrir con elevada frecuencia generando graves problemas y mayores pérdidas económicas en comparación con el resto de los productos lácteos. Esto se debe a la elevada inversión requerida para demostrar las propiedades probióticas de las cepas, así como al tiempo, los costos y la dificultad asociados a la identificación de cepas con características similares que puedan utilizarse como reemplazo de aquellas sensibles a fagos (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021).

### **1.5. Fagos infectivos de bacterias del ácido láctico**

El género *Lactococcus* y la especie *St. thermophilus* son los más utilizados en la industria láctea mundial, motivo por el cual la mayoría de los fagos aislados y caracterizados a nivel global son infectivos de estas bacterias.

Los bacteriófagos que infectan al género *Lactococcus* representan un desafío significativo para la industria láctea, debido a su impacto sobre la actividad de los cultivos iniciadores, que pertenecen mayormente a las especies *L. lactis* y *L. cremoris*. A pesar de que el rango de hospedadores (conjunto de cepas que un fago puede infectar) para estos fagos es generalmente estrecho, ciertos fagos son capaces de infectar múltiples cepas y especies dentro del mismo género. En base a su morfología y composición genómica, los fagos de *Lactococcus* se pueden clasificar en once grupos, esto es 936, c2, P335, 1358, P087, P034, 949, 1706, KSY1, Q54 y 16. Desde una perspectiva taxonómica anterior, los fagos pertenecientes a los grupos 936, P335, 1358, c2, P087 y 949 se agrupan dentro de la entonces familia *Siphoviridae*, mientras que los grupos P034 y KSY1 forman parte de la ex familia *Podoviridae* (Capra et al., 2018).

Sin embargo, la mayoría de los aislamientos fágicos obtenidos de procesos fermentativos industriales se concentran predominantemente en tres grupos (Hille et al., 2024):

- Grupo 936: Actualmente denominado género *Skunavirus*, es el grupo más

frecuente y dominante (Capra et al., 2018; Jolicoeur et al., 2023). Sus fagos son exclusivamente virulentos (líticos) y poseen genomas de aproximadamente 30 kb, caracterizados por una organización en módulos genéticos altamente conservados (Mahony et al., 2019).

- Grupo P335: Constituye un grupo notablemente diverso, que incluye tanto fagos virulentos como temperados (Hille et al., 2024). La heterogeneidad genética de este grupo puede estar relacionada con eventos de recombinación entre fagos virulentos y los profagos presentes en las células bacterianas, contribuyendo a la variabilidad de su composición genética (Mahony et al., 2019).
- Grupo c2: Actualmente denominado género *Ceduovirus*. Al igual que el grupo 936, está compuesto enteramente por fagos virulentos. Sus genomas, con un tamaño de 22 kb, comparten un 80 % de identidad a nivel de nucleótidos. Los fagos del grupo c2 muestran una especificidad de hospedador muy amplia en comparación con los otros grupos. Esta característica se debe a su dependencia de la proteína PIP (Proteína de Infección Fágica), un receptor de tipo proteico que, junto con carbohidratos, es esencial para la infección. La conservación de la proteína PIP entre las cepas bacterianas del género *Lactococcus* facilita este amplio espectro de infección (Mahony et al., 2019). A pesar de haber sido una causa de problemas graves en décadas anteriores, la frecuencia de aislamiento de fagos del grupo c2 ha disminuido en la actualidad. Esto podría atribuirse, por un lado, a la adquisición de resistencia bacteriana, ocasionada por mutaciones y/o deleciones en el gen que codifica la proteína PIP, las cuales pueden conferir resistencia a la cepa bacteriana al eliminar o modificar el receptor crucial para la unión fágica, pero también a la elevada sensibilidad térmica evidenciada para estos fagos (Mahony et al., 2019).

Los bacteriófagos aislados de *St. thermophilus* se han clasificado históricamente dentro de la entonces familia *Siphoviridae*. Hasta hace aproximadamente quince años, la taxonomía reconocía principalmente dos grupos filogenéticos basados en el mecanismo de empaquetamiento del ADN y el perfil de proteínas estructurales mayores: grupo *cos* y grupo *pac*. Los fagos pertenecientes al grupo *cos* (actualmente clasificados como género *Moineauvirus*) son exclusivamente virulentos y se caracterizan por presentar extremos cohesivos en su genoma. Poseen dos proteínas estructurales mayores distintivas (con pesos moleculares de 32 y 27 kDa, respectivamente). En cambio, los fagos pertenecientes al grupo *pac* (actualmente clasificados como género *Brussowvirus* (Capra et al., 2018)) pueden ser fagos virulentos o temperados, presentando tres proteínas estructurales mayores (con pesos moleculares de 43, 25 y

15 kDa) sin extremos cohesivos (Mahony et al., 2019). Estos dos grupos representan la mayoría de los fagos de *St. thermophilus* aislados hasta la fecha, con una frecuencia de aislamiento del 65 % para *Moineauvirus* y del 25 % para *Brussowvirus* (Hille et al., 2024).

Sin embargo, se han identificado grupos adicionales, lo que demuestra una diversidad genómica y morfológica más amplia de lo previamente reconocido. Entre estos nuevos grupos se puede mencionar al género *Vansinderenvirus*, representado por el fago 5093 (Mills et al., 2011). Este fago se caracteriza por ser virulento y exhibir diferencias significativas, tanto morfológicas como genómicas, con los grupos *Moineauvirus* y *Brussowvirus*, ya que presenta una placa basal que incluye fibras con extremos globulares y una elevada homología con profagos de especies de estreptococos no relacionados con la industria láctea, sugiriendo un origen o transferencia genética con ambientes microbianos distintos (Mills et al., 2011). Por otro lado, es posible mencionar al grupo 987 (perteneciente al género *Piorkowskivirus*), cuyos fagos se distinguen por tener colas de menor longitud en comparación con los fagos de los grupos *Moineauvirus* y *Brussowvirus* (McDonnell et al., 2016). Asimismo, estos fagos exhiben una placa basal con características morfológicas similares a las observadas en los fagos del grupo P335 del género *Lactococcus* y se han detectado estructuras genéticas que sugieren la ocurrencia de eventos de recombinación genética entre fagos de *St. thermophilus* y aquellos pertenecientes al grupo P335 de *Lactococcus* (Hille et al., 2024). Finalmente, Philippe et al. (2020) propusieron la creación de un quinto grupo, denominado P738, tras el aislamiento independiente de dos fagos, P738 y D446 (en Senegal y Alemania, respectivamente), ambos a partir de productos lácteos. Estos fagos muestran una alta similitud genética entre sí, pero una baja similitud con los fagos de *St. thermophilus* de los otros grupos conocidos. De hecho, estos fagos exhiben una fuerte relación genética con el profago T12 de *St. pyogenes*, un estreptococo no láctico. Esta similitud con fagos de especies estreptocócicas distintas sugiere que su aparición en el ambiente lácteo es un evento reciente (Philippe et al., 2020).

La extensa diversidad taxonómica dentro del género *Lactobacillus* y los géneros reclasificados relacionados (*Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*) se correlaciona directamente con la gran diversidad filogenética observada en los bacteriófagos que infectan a estas bacterias (Capra et al., 2018). La clasificación inicial de estos fagos se ha basado típicamente en la especie a la que infectan, la morfología fágica y su rango de hospedadores. La mayoría de los fagos aislados históricamente de *Lactobacillus* se incluyen en la entonces familia *Siphoviridae*, un número menor pertenece a *Myoviridae*, y una minoría se clasifica como *Podoviridae*.

En el caso particular de los fagos que infectan a *Lb. delbrueckii*, se ha establecido

una clasificación más detallada basada en la secuencia genómica, formada por cuatro grupos principales: a, b (actualmente perteneciente al género *Cequinquavirus*), c, y d (actualmente perteneciente al género *Lidleunavirus*). Los grupos a y c han sido los mejor caracterizados históricamente a nivel molecular y funcional (Hille et al., 2024), mientras que últimamente se ha incrementado la frecuencia de aislamiento de los fagos del grupo b.

Para el resto de las especies del género *Lactobacillus* no existe actualmente un sistema de clasificación como el establecido para *Lb. delbrueckii*. En estos casos, la clasificación se mantiene en los niveles taxonómicos superiores, limitándose principalmente a la morfología viriónica (ex familias *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae*) o a análisis comparativos de sus secuencias genómicas, sin haberse definido grupos de relevancia de manera consistente hasta el momento.

Los bacteriófagos que infectan al género *Leuconostoc* han sido aislados predominantemente de fermentaciones de la industria láctea, aunque su presencia también se ha documentado en una variedad de productos de origen vegetal fermentados, como el kimchi, el chucrut y el café (Hille et al., 2024).

En función del rango de hospedadores, es posible definir dos grupos principales: el grupo I, compuesto por fagos que infectan cepas de *Leuc. mesenteroides*, y el grupo II, integrado por fagos que infectan cepas de *Leuc. pseudomesenteroides* (Capra et al., 2018). Sin embargo, es importante señalar que, aunque el rango de hospedadores es un criterio de clasificación útil, se ha reportado que algunos fagos pueden infectar a ambas especies con diferentes eficiencias de plaqueo (Pujato et al., 2017).

Todos los fagos infectivos de *Leuconostoc* reportados hasta el momento pertenecen a la familia *Siphoviridae*, distinguiéndose principalmente por variaciones morfológicas en los apéndices de su placa basal. En base a esto, los fagos del grupo I se subdividen en los grupos Ia, con apéndices globulares y grupo Ib, con apéndices extendidos con configuración en forma de "Y".

Los fagos pertenecientes al grupo II son más diversos y se dividen en cuatro subgrupos basados en características morfológicas del virión (IIa, IIb, IIc, IId). De manera general, la estructura de la placa basal de los fagos del grupo II es consistentemente más pequeña que la observada en los fagos del grupo I. El grupo IIa se caracteriza por la presencia de una estructura de collar ubicada inmediatamente debajo de la cápside, mientras que el grupo IIb se distingue por la ausencia de dicha estructura de collar. Por otro lado, el grupo IIc presenta apéndices "esponjosas" en la placa basal y el grupo IId exhibe estrías inusuales a lo largo de la cola.

Finalmente, los fagos que infectan a *Leuc. lactis* no han sido frecuentemente

aislados. Esta baja tasa de detección se atribuye, probablemente, a la limitada utilización de esta especie bacteriana en las fermentaciones a escala industrial (Capra et al., 2018).

#### 1.5.1. Fagos estudiados

Como consecuencia de la estrecha relación que el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL – CONICET) mantiene con la industria láctea, a lo largo de los años se aislaron más de 500 fagos a partir de muestras de quesos, yogur, WPC y productos probióticos, enviadas por el sector industrial y que habían evidenciado problemas en sus procesos fermentativos. Para llevar adelante las experiencias de esta tesis doctoral, se seleccionaron al menos un fago de cada especie relevante de la industria láctea argentina de la fagoteca del INLAIN. En el caso de no contar con fagos infectivos de dichas especies entre los aislados, se seleccionaron fagos de colección para llevar adelante el estudio. Todos los fagos investigados en esta tesis poseen colas largas y no contráctiles (ex familia *Siphoviridae*). La mayoría de ellos fueron secuenciados y caracterizados a través de estudios de estabilidad frente a condiciones ambientales, según su morfología, resistencia a tratamientos térmicos y químicos, caracterización de la etapa de adsorción, su rango de hospedadores, obtención de mutantes fagorresistentes, sus receptores fágicos, entre otros. Los fagos ensayados se indican a continuación.

- Fagos 892-LB y 009-ML, infectivos de las cepas de colección *Lb. helveticus* CNRZ 892 y ATCC 15009, respectivamente, fueron aislados en el INLAIN en el año 2019, a partir de muestras de WPC utilizadas por industrias lácteas locales.
- Fago 832-B1, infectivo de la cepa *Lb. helveticus* CNRZ 892, pertenece a la colección CNRZ (Francia).
- Fago BYM, infectivo de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V. Es un fago autóctono, aislado en el año 1997 en el INLAIN, a partir de una muestra defectuosa de yogur (A. Quiberoni et al., 2003).
- Fago Ib<sub>3</sub>, infectivo de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LB-Ib<sub>3</sub>, aislado en el INLAIN en el año 2000, a partir de una muestra defectuosa de yogur (A. Quiberoni et al., 2003).
- Fago Cb1/204, es un fago temperado, es decir que, a diferencia de todos los fagos incluidos en este estudio, sigue el ciclo lisogénico de multiplicación. Este fago fue inducido con mitomicina C a partir de la cepa lisógena Cb1, una cepa comercial usada en Argentina para la elaboración de yogur, y fue capaz de dar placas de lisis sobre la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 204. Esta última, es una cepa salvaje aislada a partir de suero fermento usado para la elaboración de queso Provolone en Italia (Suárez, Zago, et al., 2008). Este fago, además, tiene

la particularidad de poseer una cápside prolata, a diferencia del resto que presentaron cápside icosaédrica (Suárez, Zago, et al., 2008).

- Fago J-1, infectivo de la cepa *Lc. casei* ATCC 27139, perteneciente a la colección ATCC (EEUU).
- Fago MLC-A, infectivo de la cepa *Lc. paracasei* A, que fue aislado en el INLAIN a partir de una muestra defectuosa de un producto lácteo probiótico (Capra et al., 2006).
- Fago ATCC 8014-B1, infectivo de la cepa *Lp. plantarum* ATCC 8014 y perteneciente a la colección ATCC (EEUU). De ahora en adelante este fago también será denominado “8014-B1”.
- Fago 0BJ, infectivo de la cepa *St. thermophilus* JB-15, aislado a partir de una muestra de suero de queso Cuartirolo en el INLAIN en el año 1995 (A. Quiberoni et al., 2000).
- Fago M1-G1b y M13-G1b, infectivos de la cepa *St. thermophilus* G1b, aislados en el INLAIN a partir de muestras de WPC. Asimismo, estos fagos pertenecen al grupo 5093 (género *Vansinderenvirus*), uno de los grupos genéticos más recientemente reportados (Briggiler Marcó et al., 2022).
- Fagos Ln-9, infectivo de la cepa *Leuc. mesenteroides* L79-1, y fago LDG, infectivo de la cepa *Leuc. pseudomesenteroides* R707, fueron aislados en el INLAIN a partir de suero presente en un molde de quesería empleado en la producción de queso azul (Pujato et al., 2014).
- Fagos CHD y QF9, ambos infectivos de la cepa *L. lactis* Cl2 y aislados en el INLAIN a partir de muestras de suero de queso Dambo y Fymbo, respectivamente (Suárez, Moineau, et al., 2008).

### **1.6. Estrategias para reducir la frecuencia de infecciones fágicas**

Debido a los potenciales problemas que pueden provocar las infecciones fágicas en los ambientes industriales, es necesario prevenir dichas infecciones mediante la aplicación de estrategias tendientes a reducir la carga fágica, como así también estudiar nuevas alternativas. Cabe destacar que los fagos son ubicuos en las industrias lácteas, ya que están presentes en todos los ambientes donde haya bacterias. Por este motivo, su completa erradicación es imposible y el objetivo de las tecnologías es el de mantener la concentración de fagos por debajo del nivel considerado de riesgo ( $10^4$  UFP/ml, (Moineau y Lévesque, 2005)) de tal manera de que los cultivos lácticos empleados en los procesos fermentativos puedan llevar a cabo sus funciones de manera adecuada (Neve et al., 1994). Algunas de las estrategias de control existentes se listan a continuación.

### 1.6.1. Tratamiento térmico a la materia prima

El objetivo principal de los tratamientos térmicos aplicados a la materia prima es la inactivación de microorganismos patógenos y/o alterantes, pero indirectamente pueden contribuir también a disminuir la concentración fágica. La eficiencia del tratamiento térmico dependerá de la población microbiana y diversidad fágica presente en la materia prima y del nivel inicial de contaminación. Se ha observado que los fagos infectivos de BAL, en general, son resistentes a los tratamientos térmicos de pasteurización (63 °C por 30 min (LTLT, *low temperature, long time*) o 72 °C por 15 s (HTST, *high temperature, short time*)) (Briggiler Marcó et al., 2019; Fernández et al., 2017) e incluso a tratamientos más enérgicos, entre los que se pueden mencionar 85 °C por 30 min (Murphy et al., 2014), 80 – 97 °C por 5 min (Atamer et al., 2009), 90 °C por 15 – 20 min (Atamer et al., 2009; Atamer y Hinrichs, 2010; Capra et al., 2013). Además, los componentes de la leche, principalmente las proteínas, pueden proteger al fago durante el tratamiento térmico, lo que dificulta su inactivación (Atamer et al., 2010). Previamente se mencionó que la carga fágica inicial en la leche se encontraba entre  $10^1$  y  $10^4$  UFP/ml (Moineau y Lévesque, 2005). Si estos fagos que se encuentran en la materia prima no son inactivados totalmente por los tratamientos térmicos, éstos quedan infectivos y pueden multiplicarse si encuentran cepas sensibles entre las que componen el fermento, poniendo en riesgo la correcta realización de los procesos fermentativos.

### 1.6.2. Higiene y diseño de la planta

El diseño de la planta será dependiente del proceso a desarrollar en la misma, pero, siempre que sea posible, es recomendable que las áreas donde se desarrollen las etapas finales del proceso estén separadas de aquellas en las cuales se manipula la materia prima, para evitar posibles contaminaciones. Como ejemplos, los tanques que contienen suero de quesería y deshechos, que pueden contener elevada concentración de fagos y otros contaminantes, deberían encontrarse físicamente alejados de los espacios de preparación de los cultivos iniciadores y los tanques de fermentación. De esta manera se minimiza el riesgo de contaminación cruzada, lo que debe ser considerado al diseñar una planta de producción (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021). Además, el acceso a las áreas productivas debería contar con un espacio de sanitización de manos y calzado del personal (Pujato et al., 2019).

En relación con la desinfección de superficies, al diseñar una planta se debe tener en cuenta la facilidad de limpieza y desinfección de los equipos, herramientas y suelos. Es necesario aplicar un programa de limpieza estricto para los equipos utilizados en la fabricación antes y después de su uso, con el fin de mantener bajos los niveles de fagos y reducir su propagación (Briggiler Marcó et al., 2012). La limpieza *in situ* (*Clean*

*in Place*, CIP) en las líneas de producción es el primer paso de los programas de desinfección que se aplican habitualmente en las industrias lácteas, con el objetivo de eliminar los contaminantes orgánicos y microbiológicos. Concretamente, este paso es importante ya que los compuestos orgánicos pueden reducir la eficacia de los desinfectantes, por ello resulta necesario removerlos antes de aplicar los productos para desinfección. A continuación, es necesario aplicar un desinfectante adecuado, efectivo para la inactivación fágica, en las superficies, los equipos y el suelo para completar el proceso de desinfección (Campagna et al., 2014). Los desinfectantes y biocidas empleados tradicionalmente en la industria láctea y los laboratorios (como el ácido peracético, los alcoholes y el hipoclorito de sodio) se han analizado para determinar su capacidad de inactivación de los fagos lácteos, obteniendo comportamientos diversos, dependiendo tanto del producto químico utilizado como del fago estudiado. Según los resultados obtenidos, el ácido peracético (0,15 % v/v) mostró la mayor eficacia para la reducción de fagos, produciendo una inactivación completa de suspensiones de fagos de alto título en menos de 5 min para la mayoría de los fagos infectivos de BAL investigados (Briggiler Marcó et al., 2019; Murphy et al., 2017). De acuerdo a lo reportado para un fago infectivo de *Pseudomonas aeruginosa*, esta inactivación es producida por alteraciones estructurales en la cápside del fago y la escisión completa del ácido nucleico (J. -Y. Maillard et al., 1996a, 1996b). De manera similar, el hipoclorito de sodio mostró buenos resultados en relación con la inactivación de fagos, pero, en general, a concentraciones elevadas y no permitidas en la industria alimentaria (superiores a 200 ppm) o que requieren un tiempo de contacto prolongado (entre 6 a 60 min, dependiendo del fago) (Briggiler Marcó et al., 2019; Murphy et al., 2017; Pujato et al., 2014). Con respecto a su mecanismo de acción, el hipoclorito de sodio provocó la agregación de las proteínas de la cola de un fago de *Ps. aeruginosa* con alteraciones estructurales de la cápside y la posible liberación del ácido nucleico del fago (J.-Y. Maillard et al., 1998).

En general, los alcoholes (etanol e isopropanol) redujeron solo parcialmente los títulos de suspensiones de fagos y se contabilizó un gran número de partículas viables tras los tratamientos (Briggiler Marcó et al., 2009; Campagna et al., 2014; Mercanti et al., 2012), siendo el isopropanol menos eficaz en la reducción de fagos que el etanol (Briggiler Marcó et al., 2019). Sin embargo, el etanol en concentraciones del 75 % y del 100 % logró la destrucción total de algunos fagos en 45 min (Briggiler Marcó et al., 2019; Ebrecht et al., 2010; Pujato et al., 2014). Teniendo en cuenta los resultados reportados en bibliografía, el etanol podría utilizarse en laboratorios para la desinfección de superficies en combinación con otro biocida, con el fin de mejorar la eficacia de la limpieza.

En los últimos años han surgido “nuevos” agentes biocidas, tales como compuestos de amonio cuaternario, peroximonosulfato de potasio y compuestos catiónicos y anfóteros. Se ha demostrado una capacidad variada de estos biocidas para reducir la infectividad fágica, que dependió del fago a inactivar (Campagna et al., 2014; Mercanti et al., 2012; Murphy et al., 2014; Pujato et al., 2014), pero en general fueron capaces de producir una disminución significativa del número de partículas fágicas. Además de la acción de los componentes activos que se encuentran en estos productos, la inactivación fágica podría producirse por el pH extremo (inferior a 2 o superior a 12) evidenciado por estos biocidas (Pujato et al., 2014).

A su vez, la eficiencia de la higiene de la planta dependerá del nivel inicial de la población fágica, ya que será más difícil lograr niveles de concentración fágica aceptables partiendo de una concentración inicial mayor, del fago que se desee inactivar y del sanitizante empleado para llevar adelante la higiene de la planta.

#### 1.6.3. Rotación de cultivos

La rotación de cultivos involucra el empleo de un fermento en los procesos productivos durante un tiempo tal que evite que los fagos que puedan infectar sus cepas alcancen concentraciones consideradas riesgosas para la correcta realización del proceso fermentativo. Luego de ese tiempo, el fermento es reemplazado por otro que presente similares características tecnológicas, pero con un perfil de sensibilidad a fagos diferente (Briggiler Marcó et al., 2012; Pujato et al., 2019). La desventaja de esta práctica es que a largo plazo se tendrá una cantidad muy grande y variada de fagos. Además, a veces es difícil encontrar cepas con propiedades tecnológicas semejantes pero que no estén relacionadas en cuanto a su sensibilidad fágica (Moineau y Lévesque, 2005). Por otro lado, no es posible aplicar esta técnica en cultivos probióticos, ya que los efectos benéficos en la salud son estudiados y demostrados para una cepa específica, con lo cual no resulta tan sencillo reemplazarla por otra cepa con características similares (Capra et al., 2018). Por último, se debe evitar incluir cepas lisógenas en los fermentos, que podrían liberar espontáneamente fagos durante las fermentaciones.

#### 1.6.4. Empleo de cepas con fagorresistencia mejorada

Las cepas de BAL pueden presentar distintos mecanismos de fagorresistencia que pueden actuar sobre diferentes etapas del ciclo lítico del fago y que, como su nombre lo indica, las hacen más resistentes frente a las infecciones fágicas (Pujato et al., 2019). Entre estos mecanismos se pueden mencionar las interferencias en la adsorción fágica, el bloqueo de la inyección del ADN fágico a la célula, sistemas de restricción/modificación, la infección abortiva (Abi) y sistemas CRISPR-Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (Capra et al., 2018). En particular, los

loci CRISPR suelen consistir en secuencias cortas y altamente conservadas de ADN repetidas, separadas por secuencias variables denominadas espaciadores. Este sistema se basa en que, tras exponer cepas sensibles a fagos virulentos, las cepas son capaces de integrar nuevos espaciadores derivados del genoma del fago en una matriz de repeticiones y espaciadores (CRISPR) que constituye la memoria del sistema, generando un fenotipo resistente a los fagos. CRISPR, junto con los genes asociados a CRISPR (Cas), constituyen el sistema inmunitario CRISPR-Cas (Capra et al., 2018; Hynes et al., 2016). La integración de cepas con estas características en los cultivos iniciadores incrementa la resistencia a la infección por fagos, lo que contribuye a la robustez y eficiencia del proceso fermentativo, asegurando así la calidad y consistencia de los productos industriales obtenidos (Pujato et al., 2021).

Los genes que codifican estos mecanismos de defensa naturales pueden estar codificados en cromosomas o plásmidos. En este último caso, y si los plásmidos son fácilmente transferibles por conjugación, pueden implementarse como estrategia para mejorar las cepas de BAL para uso comercial. Esta estrategia se ha utilizado para mejorar la resistencia a los fagos de las cepas que componen cultivos iniciadores lácteos (Briggiler Marcó et al., 2012; Samson y Moineau, 2013). Sin embargo, existen algunas limitaciones para su aplicación, tales como la incapacidad de algunas cepas de adquirir ADN extraño, la incompatibilidad entre plásmidos y la estabilidad de los plásmidos incorporados (Moineau y Lévesque, 2005). Finalmente, se puede utilizar la ingeniería genética para la obtención de estas cepas. Sin embargo, la falta de una legislación favorable y el concepto de los consumidores sobre Organismos Genéticamente Modificados (OMG) hace difícil la aplicación industrial de estas cepas (Fernández et al., 2017).

A pesar del progreso logrado en la reducción de la carga fágica mediante la aplicación de estas estrategias de desinfección, los fagos continúan representando un riesgo significativo en la industria láctea (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021). Por este motivo, se continúan estudiando diversas estrategias para intentar dar solución al problema de las infecciones fágicas, principalmente de aquellas cuyo blanco de acción sean los fagos depositados en superficies o presentes en bioaerosoles. Como se mencionó previamente, los bioaerosoles pueden contener concentraciones fágicas de hasta  $10^8$  UFP/m<sup>3</sup> y representan la principal vía de diseminación de partículas fágicas por los ambientes industriales, por lo que resulta fundamental reducir su carga fágica y evitar su esparcimiento. En este sentido, los procesos avanzados de oxidación constituyen una posible alternativa. Estos procesos han sido ampliamente empleados como una alternativa para la desinfección de aire y agua, habiendo mucha información disponible sobre la aplicación de estos procesos para la inactivación de virus y bacterias

(Chalatsi-Diamanti et al., 2025; Correa et al., 2020; Dubuis et al., 2020; Flores et al., 2024; Guo et al., 2022; Kokkinos et al., 2021; Kong et al., 2021; L. Liu et al., 2022; Sagir et al., 2021), pero poca información disponible sobre la inactivación de fagos infectivos de BAL. Nuestro grupo de trabajo ha estudiado los procesos avanzados de oxidación, tales como fotocatálisis (UV-A y  $\text{TiO}_2$  como fotocatalizador) y ozono (Briggiler Marcó et al., 2009, 2011, 2018, 2021; Lloréns, 2024) y, mediante su aplicación, se han obtenido resultados prometedores para la inactivación fágica. Sin embargo, a partir del comportamiento fago-dependiente reportado en todos estos trabajos, resulta necesario estudiar la respuesta de los fagos de interés frente a otras tecnologías de inactivación propuestas basadas en procesos fotoquímicos y avanzados de oxidación.

### **1.7. Procesos avanzados de oxidación**

Los procesos avanzados de oxidación (PAOs), han emergido como un método de desinfección alternativo, eficiente y amigable con el medio ambiente para controlar la calidad microbiológica del agua, el aire y algunas matrices alimenticias. Estas tecnologías están basadas en la formación instantánea *in situ* de especies oxidantes altamente reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) que cumplen las funciones de desinfección y degradación de diversos contaminantes orgánicos (Giannakis et al., 2017; Marjanovic et al., 2018; Shabat-Hadas et al., 2017). Estas ROS se caracterizan por no ser selectivas en el compuesto a oxidar (Galeano et al., 2019; Kokkinos et al., 2020). El principal agente oxidante producido es el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), que es el segundo oxidante más poderoso, luego del flúor. Sin embargo, en los PAOs también se pueden producir otras ROS, tales como los radicales hidroperoxilos ( $\text{HO}_2\cdot$ ), el radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y radical sulfato ( $\text{SO}_4\cdot^-$ ), entre otros (Giannakis et al., 2017; J. Wang y Wang, 2020). La generación de los radicales para los distintos PAOs está relacionada con el tipo de proceso y con los diversos factores que intervienen en cada uno de ellos. Por ejemplo, en el proceso Foto-Fenton, los radicales hidroxilos se producen por la escisión homolítica del enlace O-O del peróxido de hidrógeno al ser irradiado con luz ultravioleta (Shabat-Hadas et al., 2017), mientras que en la fotocatálisis se produce mediante la reacción del anión hidróxido con el hueco generado al ser excitado el fotocatalizador (Gao et al., 2025).

Se ha demostrado el potencial de desinfección de los PAOs frente a un amplio rango de microorganismos (protozoo, bacterias, mohos, levaduras) y virus, principalmente a través de la acción de ROS, las cuales oxidan distintos tipos de moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Kokkinos et al., 2021). Específicamente las ROS pueden accionar en distintos niveles de los ácidos nucleicos,

ya sea cambiando los nucleótidos, rompiendo el puente fosfodiéster, cambiando la estructura tridimensional, fomentando la formación de dímeros de pirimidina y afectando la replicación del genoma (Galeano et al., 2019). Tanto el tipo de microorganismo o virus a inactivar, como las condiciones en las que éstos se encuentren son factores críticos en la desinfección (Mattle et al., 2015).

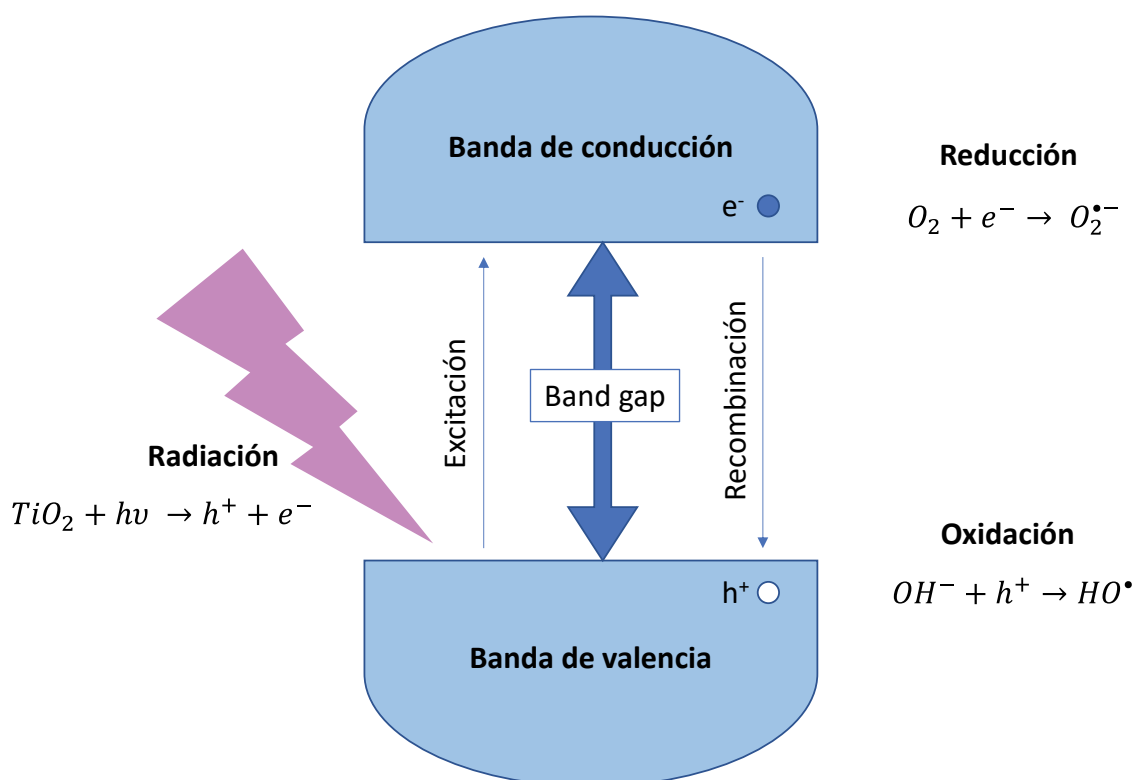
Entre los procesos avanzados de oxidación es posible encontrar procesos basados en la aplicación de ozono, oxidación electroquímica, sonólisis, peróxido de hidrógeno, fotocatálisis heterogénea, reacciones tipo Fenton, entre otros (Kokkinos et al., 2021) y diversas combinaciones de estos procesos, que pueden mejorar su eficiencia (Gao et al., 2025; Guo et al., 2022; Kokkinos et al., 2021). Actualmente, la fotocatálisis heterogénea domina las tecnologías de los PAOs, debido a su amplia aplicabilidad, facilidad de operación y eficiencia energética (Gao et al., 2025).

Entre los mencionados procesos avanzados de oxidación se seleccionaron, para realizar la presente tesis, la fotocatálisis, y su variante con pintura fotocatalítica, como así también el proceso fotoquímico con radiación UV-C, con el objetivo de estudiar la inactivación de fagos infectivos de BAL. Estos procesos se detallan a continuación.

#### 1.7.1. Fotocatálisis

La fotocatálisis heterogénea puede ser definida como *“un proceso catalítico durante el cual se producen una o más etapas de reacción por medio de pares electrón-hueco fotogenerados sobre la superficie de materiales semiconductores iluminados por luz con la energía adecuada”* (Palmisano y Sclafani, 1997). Es decir que, al exponer materiales semiconductores a radiación ultravioleta o visible, se producen regiones activadas en la superficie de dichos materiales en las que se producen reacciones redox, aprovechando la formación de electrones y huecos en su red cristalina. En general, los productos del ciclo redox producen radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Elmolla y Chaudhuri, 2010; Vaitsis et al., 2020). Este proceso presenta una doble naturaleza, la cual implica la capacidad de excitar los materiales semiconductores al mismo tiempo que altera el estado físico de los reactivos a una velocidad significativa. La teoría de bandas explica las formas de cuantificar esta capacidad en términos de energía de banda prohibida (*band gap*). En el momento en que los materiales semiconductores se exponen a la radiación, la energía fotónica emitida por la radiación es absorbida por un electrón de la banda de valencia, lo que crea un par electrón-hueco y provoca su excitación a la banda de conducción (Figura 1.4). Para que sea posible la generación del par electrón-hueco, es necesario que los fotones que lleguen al catalizador posean una energía mayor a la requerida para superar el *band gap*, excitando así al electrón desde la banda de valencia hacia la de conducción. Las ecuaciones que rigen el proceso fotocatalítico son las Ecuaciones (1.1-1.3), donde se observa la formación del par electrón-hueco por la

acción de la radiación sobre el catalizador (Ec. 1.1), y la posterior generación de los radicales libres (Ec. 1.2 y 1.3).



**Figura 1.4.** Esquema del mecanismo de generación de radicales libres en fotocatalisis.

Los materiales semiconductores deben poseer ciertas características para ser empleados como fotocatalizadores, tales como ser fáciles de producir y de utilizar, ser fotocatalíticamente estables, catalizar reacciones de manera eficiente, poder activarse por luz UV o visible, ser tanto química como biológicamente inertes y no presentar costo elevado ni riesgos para el medio ambiente o los seres humanos (Ibhadon y Fitzpatrick, 2013). Entre los semiconductores más utilizados para este fin es posible mencionar a ZnS, SnO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, WO<sub>3</sub>, CdS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CdO, Cu<sub>2</sub>O, CdSe, AlSb, CdTe y GaAs (Pandis et al., 2022). Estos materiales tienen distintas energías de *band gap*, que es la energía necesaria para iniciar el proceso de foto-oxidación. Es decir que, al utilizar un

material con menor energía de *band gap*, será necesaria una menor energía de radiación para iniciar el proceso.

Dada su gran estabilidad, bajo costo y no toxicidad, el  $\text{TiO}_2$  es uno de los fotocatalizadores más ampliamente empleados en los procesos fotocatalíticos (Pandis et al., 2022). En la naturaleza, el dióxido de titanio puede encontrarse en tres formas cristalinas: rutilo, anatasa y brookita, siendo las dos primeras variedades producidas comercialmente. La variedad anatasa presenta propiedades fotocatalíticas y cumple con la mayoría de los requisitos deseables para los fotocatalizadores previamente mencionados (Eddy et al., 2023; Katal et al., 2020).

Debido a su energía de *band gap* (320 eV, (Ameta y Ameta, 2018)) es necesario irradiar el  $\text{TiO}_2$  con radiación UV para producir su activación, lo cual reduce las aplicaciones de este fotocatalizador, ya que es necesario disponer de una fuente de radiación que emita a dichas longitudes de onda. Por este motivo se han desarrollado diversas modificaciones para reducir el *band gap* del  $\text{TiO}_2$  y que sea posible, de esta manera, extender su utilización en el espectro de luz visible, para utilizar de mejor manera la radiación solar (que posee mayor proporción de radiación visible que radiación UV) o la iluminación de ambientes interiores para activar el proceso (Banerjee et al., 2014; Daghrir et al., 2013; Martha et al., 2015). El dióxido de titanio puede ser modificado mediante diversas estrategias como son el dopado del fotocatalizador con diversos metales nobles, de transición, de tierras raras, o aniones no-metálicos (C, N, I o S, por ejemplo), el co-dopado del catalizador, que involucra a dos elementos, cuyas combinaciones pueden ser metal-metal (Cr/Ta, por ejemplo), metal-no metal (Fe/N, por ejemplo), o no metal-no metal (C/N, por ejemplo), el acople con colorantes orgánicos e inorgánicos (rosa de bengala, por ejemplo) y el acople del  $\text{TiO}_2$  con otros semiconductores ( $\text{CdS}$ ,  $\text{FeO}_3$ ,  $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ,  $\text{SnO}_2$ , como algunos ejemplos) (Banerjee et al., 2014; Daghrir et al., 2013; Martha et al., 2015).

La fotocatálisis es ampliamente utilizada para el tratamiento de aguas residuales, aprovechando la superficie del catalizador para eliminar los contaminantes de la forma más eficaz posible. Es el proceso avanzado de oxidación más utilizado para la degradación de contaminantes del agua debido a sus bajos costos de operación, siendo una técnica muy eficaz y respetuosa con el medio ambiente, en comparación con otros procesos avanzados de oxidación, ya que los subproductos generados no representan un efecto nocivo para el medioambiente (Chalatsi-Diamanti et al., 2025; Pandis et al., 2022). Por otro lado, la fotocatálisis también resulta una tecnología adecuada para la desinfección de agua (Achouri et al., 2021; Habibi-Yangjeh et al., 2020; Kokkinos et al., 2021; Reddy et al., 2017), aire (Flores et al., 2024; L. Liu et al., 2022; Lu et al., 2021) y distintas superficies y equipos, resultando relevante su aplicación en hospitales, en la

búsqueda de disminuir los decesos asociados a las infecciones intrahospitalarias causadas por diversos patógenos (Byrne et al., 2015).

La eficiencia de los procedimientos se atribuye principalmente a los catalizadores utilizados y a los sistemas de irradiación, pero depende a su vez de la configuración de los sistemas fotocatalíticos y sus condiciones de operación. En los procesos que involucran radiación, la emisión de luz puede tener una doble función, actuando como fuente de energía para iniciar el proceso catalítico y desinfectando, al mismo tiempo, de manera fotoquímica (Pandis et al., 2022). Como se mencionó anteriormente, el semiconductor más comúnmente empleado como fotocatalizador es el  $\text{TiO}_2$ , que, debido a su energía de *band gap*, presenta una gran absorción de radiación en el espectro UV-A ( $\lambda = 340 - 400 \text{ nm}$ ) (Pandis et al., 2022). Tal es así que la fotocatálisis es generalmente aplicada empleando  $\text{TiO}_2$  como catalizador bajo radiación UV-A, y ha sido demostrada como efectiva para la inactivación de diferentes patógenos como virus, bacterias y mohos (Chalatsi-Diamanti et al., 2025; Foster et al., 2011; Kokkinos et al., 2021). Por ejemplo, Achouri et al. (2021) estudiaron la inactivación de *Ps. aeruginosa* mediante fotocatálisis ( $\text{TiO}_2$ , UV-A) para la desinfección de aguas, obteniendo una reducción de 4 órdenes log en 1 h. Por otro lado, Krishnan et al. (2023) investigaron la inactivación del moho *Fusarium equiseti*, también con fotocatálisis ( $\text{TiO}_2$ , UV-A), y reportaron una inhibición en el crecimiento del moho del 50 % luego de tratarlo por 56 h. Cheng et al. (2019) también estudiaron la inactivación del bacteriófago f2 (infectivo de *Escherichia coli*) empleando nanofibras de  $\text{TiO}_2$  dopado con cobre bajo radiación visible, logrando una reducción del 100 % en 2 h. De manera similar, J. Lee et al. (2025) investigaron la inactivación del bacteriófago PhiX174 (infectivo de *E. coli*), empleando como fotocatalizador nanobarras de  $\text{TiO}_2$  dopado con cobre bajo radiación visible, obteniendo una tasa de reducción en los títulos fágicos de 0,42 órdenes log/min. Específicamente en relación a fagos de bacterias lácticas, Kakita Y. et al. (2000) observaron una inactivación del 99,9 % luego de 24 h de tratamiento para el fago PL-1 (infectivo de *Lc. casei*) presente en medio acuoso, empleando fotocatálisis. Además, Lu et al. (2021) estudiaron la inactivación de *E. coli* en forma de bioaerosol para desinfección de aire, utilizando como fotocatalizador una combinación de  $\text{TiO}_2$  y MXene, depositados sobre una espuma de poliuretano, logrando una eficiencia de inactivación de 2,5 órdenes log bajo radiación UV-A. Finalmente, Dunlop et al. (2010) investigaron la inactivación de cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro, cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina, *P. aeruginosa* y esporos de *Clostridium difficile*, logrando reducciones de 3 órdenes log en 80 min para las bacterias y 2,6 órdenes log en el mismo tiempo para los esporos.

### 1.7.1.1. Pinturas fotocatalíticas

Una aplicación más reciente de los procesos avanzados de oxidación es el desarrollo de materiales de construcción que contienen fotocatalizadores para la purificación y desinfección del aire, como es el caso de las pinturas fotocatalíticas (Ghosh et al., 2021; Gopalan et al., 2020). Las pinturas son empleadas mundialmente como terminación de superficies en ambientes interiores y para proteger las paredes de agentes dañinos. La utilidad de este material puede ser mejorada mediante la adición de un fotocatalizador, el cual puede otorgarle nuevas funcionalidades tales como auto-limpieza, inactivación de microorganismos y purificación de aire (Amorim et al., 2018; De Amorim et al., 2019).

Entre los fotocatalizadores empleados para formular las pinturas se encuentra el dióxido de titanio. Como se mencionó anteriormente, debido al elevado valor de *band gap* del  $\text{TiO}_2$ , para poder activar el fotocatalizador es necesario irradiarlo con radiación UV-A, lo cual reduce sus aplicaciones. En los últimos años se han desarrollado diversas modificaciones con el objetivo de reducir dicha energía de *band gap* y de esta manera extender el rango de absorción de longitud de onda del catalizador al espectro visible (400-700 nm), evitando el uso de lámparas especiales como las UV, ya que los propios sistemas de iluminación de los ambientes que emiten radiación en el espectro visible, con escasa disponibilidad de radiación UV, serían suficientes para lograr la activación del catalizador, logrando así aumentar la sustentabilidad energética de esta tecnología. Uno de los catalizadores basados en  $\text{TiO}_2$  dopado con carbono disponibles comercialmente es el KRONOClean 7000, caracterizado en detalle por otros autores (Arimi et al., 2019; Tobaldi et al., 2015). Este catalizador fue reportado como un material anatasa bimodal, presentando un área específica de  $251 \text{ m}^2/\text{g}$  y un tamaño de partícula mayormente de 4 nm, pero con una pequeña fracción entre 12 y 15 nm. Estos autores confirmaron la absorción en el rango visible por parte del catalizador modificado a través de un análisis UV-Vis, mientras que la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) mostró que un compuesto de carbono aromático es el que da origen a dicha absorción.

Una pintura fotocatalítica formulada con  $\text{TiO}_2$  dopado con carbono fue estudiada por García et al. (2025); Salvadores, Alfano, et al. (2020b, 2020a); Salvadores, Reli, et al. (2020) y Zacarías et al. (2018) para la degradación de compuestos químicos (acetaldehído, óxido nítrico y tolueno) y la inactivación de mohos ambientales. En dichos estudios, la pintura fue caracterizada a través de mediciones de finura de molienda, propiedades ópticas, composición superficial con análisis XPS y microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). Por otro lado, también se determinaron las propiedades espectrales ópticas de los recubrimientos (reflectancia difusiva y

transmitancia). Con respecto a la estabilidad fotocatalítica y la adhesión al soporte de la pintura formulada, no se detectó desactivación del catalizador luego de más de 140 h de reacción para la oxidación de acetaldehído (Salvadores, Alfano, et al., 2020b) y no se observó pérdida de material tras el lavado con agua o la aplicación de una tensión de cizalla suave.

### **1.8. Radiación UV-C**

La radiación UV-C ( $\lambda = 200 - 280 \text{ nm}$ ) es una tecnología establecida y ampliamente utilizada para la inactivación de un gran espectro de microorganismos y virus (Ansari et al., 2019; Gabriel, Ballesteros, et al., 2018; Schiavano et al., 2018). Es una estrategia de inactivación no-térmica, siendo un método físico reconocido por su eficacia germicida con potencial para controlar microorganismos patógenos y otros microorganismos causantes de deterioro en alimentos (Beauchamp y Lacroix, 2012; López-Malo y Palou, 2005). Desde hace varios años ha sido una tecnología ampliamente empleada para desinfectar el aire en hospitales, plantas de procesamiento de alimentos, elaboración de productos farmacéuticos y otras áreas donde la descontaminación microbiana es relevante (Menzies et al., 1999). La radiación UV-C es capaz de penetrar hasta el interior de células bacterianas y partículas virales y, debido a los procesos fotoquímicos, puede destruir ácidos nucleicos y proteínas, afectando de esta manera la habilidad de multiplicación (Reed, 2010). El material genético de las partículas fágicas es un fuerte absorbente de la radiación UV-C (Lytle y Sagripanti, 2005), presentando su máxima absorción a la longitud de onda de 260 nm (Tseng y Li, 2005), mientras que las proteínas también absorben radiación, pero en menor proporción que los ácidos nucleicos (Eischeid y Linden, 2011; Mayer et al., 2015; Nuanualsuwan y Cliver, 2003). La radiación UV es eficaz tanto contra virus de ARN como contra los de ADN, y la sensibilidad de los virus frente a la radiación UV está fuertemente relacionada con la longitud del genoma (Lytle y Sagripanti, 2005). Las pirimidinas presentes en el ADN pueden absorber fuertemente la luz UV y, tras la radiación, la secuencia de ADN en la que se unen dos de estas bases puede formar dímeros de pirimidina (timina y citosina para los virus de ADN, uracilo y citosina para los virus de ARN (Kong et al., 2021)). Estos dímeros pueden alterar la estructura de doble hélice en el caso del ADN e interferir en su duplicación, provocando de esta manera que los virus dejen de ser infectivos (Tseng y Li, 2005).

Entre las ventajas que presenta esta tecnología se pueden mencionar el mínimo uso de la energía eléctrica, bajo mantenimiento y bajos costos de instalación, como así también un tratamiento suave sobre la muestra irradiada, sin provocar alteraciones en la misma (Delorme et al., 2020). Tal es así que existen equipos de desinfección

disponibles comercialmente para la esterilización de aire y superficies que son basados en esta tecnología (<https://www.lighting.philips.com.ar/productos/uv-c>, <https://ecoviox.com>; <https://www.fiberli.com.tr/Upload/Urun/Dokuman/Fiberli-MOMI100%28EN%29.pdf>).

Por ejemplo, la empresa Ecoviox, fundada por el empresario argentino Juan Pablo Siri, ofrece a la comunidad equipos de desinfección de aire que combinan distintas tecnologías de inactivación, en función del uso que le quiera otorgar el cliente (<https://ecoviox.com>). El equipo más completo ofrecido por la empresa presenta la combinación de cuatro elementos de eficacia comprobable en materia de desinfección, como lo son el filtro HEPA con carbón activado, lámparas UV-C, ionizadores y generadores de ozono. El dispositivo toma el aire del ambiente a través de una turbina y lo esteriliza mediante el empleo de filtros HEPA y carbón activado, sumados a una lámpara UV-C que elimina los virus y bacterias que pudieran traspasar el sistema de filtros. Luego, el aire es tratado con un ionizador y ozono y es devuelto al ambiente.

La empresa ofrece también equipos de menores dimensiones (“compactos”) que utilizan las tecnologías previamente descriptas, pensados para ser transportados en bolsos y mochilas, capaces de desinfectar pequeños espacios como por ejemplo la cabina de un vehículo. Además, comercializa dispositivos adaptados para su colocación en medios de transporte públicos, tales como colectivos y trenes. Finalmente, también cuentan con productos “Grado médico”, con el objetivo de prevenir y controlar infecciones intrahospitalarias. Específicamente, este equipo fue eficiente para lograr una caída en el 85 % en las infecciones intrahospitalarias en el Hospital de Clínicas (Universidad de Buenos Aires (<https://ecoviox.com>)).

Al comparar la radiación UV-A (empleada en fotocátalisis) con la radiación UV-C, se observa que la primera presenta una longitud de onda de trabajo mayor ( $\lambda = 340 - 400 \text{ nm}$ ) y es menos eficiente en materia de desinfección ya que las longitudes de onda más cortas emiten fotones más energéticos (L. Liu et al., 2022; Lu et al., 2021), por lo cual es necesario utilizarla en presencia de un catalizador para mejorar su eficiencia, como en el caso de la fotocátalisis. Sin embargo, así como la radiación UV-C es muy eficiente en la eliminación de microorganismos, también puede resultar perjudicial para el personal que se encuentra expuesto a la misma y es necesario tener cuidados más estrictos. La exposición a este tipo de radiación durante períodos prolongados de tiempo puede causar graves daños en el sentido de la vista, dañando la retina y ocasionando quemaduras en la córnea (fotoqueratitis), pudiendo incluso generar cataratas. Además, puede dañar también la piel, causando eritema y, potencialmente, cáncer de piel, ya que la radiación UV-C modifica directamente las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos de todos los sistemas biológicos, incluidos

los seres humanos (MacKie, 2006; Milonova et al., 2016; Reed, 2010; Sengillo et al., 2020; Tavares et al., 2023). Para evitar estas lesiones en piel y ojos, se recomienda no mirar directamente las lámparas UV, aun utilizando lentes de protección, y no exponer partes del cuerpo a la radiación emitida por los equipos de desinfección.

En bibliografía, algunos autores han demostrado la efectividad de la radiación UV-C para la inactivación de fagos infectivos de BAL. Entre ellos se puede mencionar el trabajo de Vitzilaiou et al. (2022), quienes estudiaron la inactivación de los fagos virulentos P680 y P008, pertenecientes al grupo 936 e infectivos de *L. lactis* subsp. *diacetylactis* F7/2. En estos ensayos, los fagos fueron suspendidos tanto en suero de yogur como en agua y fueron posteriormente irradiados en un dispositivo (PearlLab Beam™, AquiSense Technologies, EEUU), que puede emplear lámparas LEDs de distintas longitudes de onda (UV-A, UV-B y UV-C).

Por otro lado, Schubert, Hock, et al. (2023) estudiaron la inactivación en medio líquido del fago P008, infectivo de *L. lactis* subsp. *diacetylactis* F7/2, pero en esta oportunidad el fago se encontraba suspendido en leche entera (1,5 y 3,5 % de materia grasa), leche descremada (< 0,1 % de materia grasa), suero de queso muzzarella y suero de quesería filtrado, con filtros de 0,1 µm y 60 nm. Estos ensayos fueron realizados en distintas escalas y en dispositivos con distintas configuraciones. En primer lugar, se empleó la cámara de irradiación UV BS-02 (Opsytec Dr. Gröbel GmbH, Alemania), en un sistema batch escala laboratorio. Luego, se realizaron ensayos en un reactor continuo de película delgada, también de escala laboratorio. Finalmente, los ensayos se llevaron adelante en el reactor de flujo continuo AQD-ST1 (SterilAir AG, Suiza). En este caso, el reactor empleado fue de escala técnica, con un volumen de reacción 10 veces mayor que el correspondiente al reactor anterior.

Cabe destacar que los estudios antes mencionados fueron realizados en medio líquido, principalmente como una estrategia para la obtención de suero de quesería libre de partículas fágicas. En cambio, en esta tesis se plantea la inactivación de fagos de BAL en ambientes industriales, donde los fagos se encuentran depositados en superficies y también presentes como bioaerosoles, con el objetivo de mejorar la sanitización de la planta y asegurar el correcto desarrollo de los procesos fermentativos.

### **1.9. Influencia de diversas condiciones en la inactivación fágica**

Las tecnologías de inactivación previamente mencionadas, principalmente basadas en procesos avanzados de oxidación, pueden verse fuertemente influenciadas por algunas condiciones, tanto ambientales como de operación, afectando al proceso de inactivación de microorganismos y virus o de degradación de contaminantes. Por

este motivo, resulta necesario estudiar el efecto de estas condiciones en la inactivación fágica al emplear este tipo de tecnologías.

Uno de los factores que puede influir en la inactivación fágica vía procesos avanzados de oxidación es la humedad relativa del ambiente. Por un lado, en un proceso fotocatalítico, las moléculas de agua pueden ocupar los sitios libres de la superficie del catalizador (Samarghandi et al., 2014), lo cual resultaría contraproducente para el proceso fotocatalítico ya que se produciría una competencia de adsorción sobre la superficie entre la entidad a inactivar y la molécula de agua. Por otro lado, un mínimo nivel de humedad es necesario para asegurar la presencia de agua como principal fuente de generación de radicales hidroxilos. Si bien la influencia de la humedad relativa en la inactivación de fagos infectivos de BAL no se ha demostrado aún, algunos autores han estudiado el efecto de este parámetro en la inactivación de otros microorganismos y virus, reportando diferentes comportamientos. Por ejemplo, Yu et al. (2008) encontraron una mejora en la eficiencia de remoción fotocatalítica para el fago  $\lambda$  vir al pasar de una humedad relativa del 30 % a una de 50 %, mientras que al pasar de 50 a 70 % no se observó modificación en las eficiencias de remoción. Los autores realizaron el mismo ensayo para cepas de *E. coli* y *Candida famata* y reportaron un comportamiento semejante al del fago  $\lambda$  vir. En cambio, L. Liu et al. (2022) observaron una disminución en la eficiencia de inactivación del fago MS2, infectivo de *E. coli*, al aumentar la humedad relativa desde 30 a 95 % al ser tratado con fotocátalisis ( $\text{TiO}_2/\text{MXene}$ ,  $\lambda = 365$  nm).

Otro factor a considerar es el medio de suspensión en el cual se encuentra suspendido el fago durante los ensayos. Como se mencionó previamente, la leche cruda es una de las principales fuentes de ingreso de los fagos a las plantas lácteas, pudiendo contener concentraciones de hasta  $10^4$  UFP/ml (Moineau y Lévesque, 2005)). Además, los fagos pueden alcanzar concentraciones de hasta  $10^9$  UFP/ml en el suero de quesería obtenido durante las elaboraciones queseras (Atamer et al., 2013). El desplazamiento por la planta y salpicaduras de estos medios podrían depositar los fagos en estas matrices sobre diversas superficies, convirtiéndose en una fuente de contaminación fágica, pudiendo formar también bioaerosoles, en los cuales pueden alcanzar concentraciones de hasta  $10^8$  UFP/m<sup>3</sup> (Colombo et al., 2018; Neve et al., 1995). Por este motivo, resulta de interés estudiar la inactivación de los fagos al estar suspendidos en estos medios presentes en la industria láctea de manera de conocer su posible influencia sobre las tasas de inactivación. Si el medio de suspensión es agua, la inactivación suele ser más efectiva ya que el medio no absorbe radiación ni contiene materia orgánica que pueda competir con el fago a inactivar (Gómez-López et al., 2021). En cambio, en otras matrices más complejas como suero de quesería o leche, la

efectividad de la radiación UV, por ejemplo, puede disminuir debido a la turbidez del medio y a los sólidos suspendidos en el mismo, que absorben o dispersan la radiación antes de que ésta pueda llegar a las partículas fágicas (Gómez-López et al., 2021; Kosel et al., 2017). El trabajo de Schubert, Biere, et al. (2023) confirma esta influencia del medio de suspensión en la inactivación fágica, ya que los autores reportaron diferencias en la inactivación de fagos infectivos de *L. lactis* bajo radiación UV-C dependiendo de si habían sido suspendidos en agua o en suero de quesería filtrado, lográndose una menor inactivación para los fagos suspendidos en suero al ser tratados con dosis semejantes.

En los PAOs que utilizan una fuente de radiación como parte del proceso, la luz es empleada como proveedora de energía para la formación de radicales (Wan et al., 2019). La radiación incidente excita al átomo en estado fundamental y desencadena la transición desde la banda de valencia a la de conducción (Figura 1.4). Tal es así que la generación de radicales está profundamente influenciada por los parámetros de radiación, incluyendo la longitud de onda y el flujo de radiación incidente, al igual que los procesos fotoquímicos (Bulman et al., 2019; Gao et al., 2025; L. Liu et al., 2022; Nakano et al., 2012).

En general, un mayor flujo de radiación podría proporcionar energía abundante para la ruptura de enlaces de compuestos precursores de radicales o para la excitación del fotocatalizador (Gao et al., 2025). Tian et al. (2020) reportaron un aumento en la producción de radicales reactivos al aumentar la intensidad de radiación en los PAOs basados en UV. De esta manera, se esperaría que un determinado nivel de inactivación sea alcanzado en menor tiempo si se somete a un flujo de radiación mayor. Por otro lado, para el tratamiento con radiación UV-C, la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe (Bunsen y Roscoe, 1857) plantea que una reacción fotoquímica ocasiona el mismo efecto para una determinada dosis energética, sin importar el tiempo en el que dicha dosis sea entregada.

El impacto de la longitud de onda es más complejo, ya que está fuertemente relacionado con la habilidad de absorción de radiación por parte del fotocatalizador (X. Wang et al., 2019). Por ejemplo, el  $\text{TiO}_2$  solo puede absorber efectivamente la radiación UV para generar el par electrón-hueco, a menos que sea previamente modificado como en el caso de la pintura fotocatalítica empleada en esta tesis ( $\text{TiO}_2$  dopado con carbono), donde puede activarse empleando radiación visible.

Además de proveer la energía necesaria para la generación de radicales a través de un semiconductor, la radiación puede ejercer un efecto fotoquímico por sí misma y ocasionar daños en el material genético, provocar estrés oxidativo y supresión de estructuras celulares, dependiendo del microorganismo y de la longitud de onda empleada (Yang et al., 2015). Mientras las radiaciones UV-B y UV-C son fuertemente

absorbidas por el ADN de los microorganismos y virus, provocando un efecto de desinfección, la radiación UV-A no induciría daños en el genoma ya que no produce reacciones fotoquímicas directas en el ADN. Sin embargo, la radiación UV-A genera reactivos intermediarios como las ROS, los cuales pueden dañar las proteínas y ADN microbianos y virales (Song et al., 2019). Tal es así que W. Sun et al. (2023) estudiaron la inactivación de cinco bacterias (*Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 35855, *Staphylococcus aureus* CGMCC 1.2456, *E. coli* CGMCC 1.3373, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) y del bacteriófago Phi 6 con radiación UV a distintas longitudes de onda, y observaron diferencias en las constantes de inactivación y en las dosis de UV necesarias para alcanzar una reducción de 2 órdenes log en su infectividad. Por ejemplo, para el fago Phi 6, la principal causa de inactivación a 265 y 285 nm fue el daño en el genoma (W. Sun et al., 2023).

Por otro lado, las dos fuentes de radiación UV más comúnmente empleadas son las lámparas monocromáticas de baja presión de vapor de mercurio y las lámparas policromáticas de presión media de vapor de mercurio (Vazquez-Bravo et al., 2018). Sin embargo, este tipo de lámparas de mercurio son frágiles, tóxicas y perjudiciales para el medio ambiente. Además, necesitan un tiempo de calentamiento prolongado para alcanzar mediciones de flujo estables, por lo que normalmente son operadas en forma continua, lo que resulta contraproducente para su corta vida útil de entre 10.000 a 18.000 h (Koutchma et al., 2009; Song et al., 2016). En los últimos años se han desarrollado lámparas LEDs (*Light Emitting Diodes*) que pueden emitir también radiación a longitudes de onda menores a las del espectro visible. Comparadas con las lámparas UV convencionales de mercurio, las lámparas LEDs poseen varias ventajas, como ser amigables con el medio ambiente, libres de mercurio, de un diseño robusto y compacto, no precisar tiempos de precalentamiento, poder encenderse y apagarse con frecuencia, poseer una vida útil mayor, cercana a 30.000 h, lo que conlleva a un menor costo a largo plazo (Kneissl et al., 2019; Koutchma et al., 2009; W. Sun et al., 2023). Frente a todas estas ventajas, resulta de interés estudiar si la eficiencia en la inactivación lograda con las lámparas LEDs se asemeja a aquella alcanzada con las lámparas de mercurio, dado que para estas últimas existe más información disponible en bibliografía.

#### **1.10. Combinación de diferentes estrategias de inactivación**

En el caso del tratamiento por radiación UV-C, es posible complementar el efecto fotoquímico, propio de esta longitud de onda (daño en material genético y estructuras celulares, estrés oxidativo) con la adición de un fotocatalizador. De esta manera se produciría la inactivación vía ROS, producidas por la combinación catalizador +

radiación, en conjunto con la vía fotoquímica. Khaiboullina et al. (2021) confirmaron un aumento en la inactivación del virus HCov-NL63 al ser sometido a un tratamiento de radiación UV-C más  $\text{TiO}_2$ , en comparación con un tratamiento semejante en ausencia del catalizador.

La combinación de radiación UV-C con fotocatalizadores no es la única combinación de tecnologías posible. De hecho, la combinación de distintas estrategias generalmente mejora la inactivación alcanzada con cada tecnología por separado. Por ejemplo, la combinación de fotocatálisis con el proceso foto-Fenton logró mejores eficiencias de remoción de contaminantes en tratamiento de efluentes, al mismo tiempo que permitió la regeneración del catalizador y el trabajo en un rango de pH más amplio en comparación al pH óptimo necesario para las reacciones de tipo Fenton (Chalatsi-Diamanti et al., 2025). Por otro lado, la combinación de fotocatálisis con ozono también ofrece ventajas significativas, ya que mejora las limitaciones en la transferencia de materia asociadas a un catalizador fijo ya que el ozono gaseoso puede penetrar hasta lugares más recónditos, mientras que para el catalizador la reacción de inactivación ocurre sobre la superficie del mismo, al mismo tiempo que genera una mayor concentración de radicales hidroxilos (Chalatsi-Diamanti et al., 2025). Adityosulindro et al. (2017) y Naddeo et al. (2015) combinaron los procesos Fenton con ultrasonido para mejorar la remoción de diclofenaco e ibuprofeno en agua destilada y efluentes, alcanzando remociones de hasta 100 %. Sottani et al. (2023) combinaron la radiación UV-C con ozono para reducir las tasas de infecciones intrahospitalarias, logrando reducciones mayores al 99 % luego de la aplicación del tratamiento, para distintos microorganismos tales como *S. aureus*, estafilococos no  $\beta$ -hemolíticos, enterobacterias, *Klebsiella* spp., *Ps. aeruginosa* y *Candida auris*. Particularmente para la inactivación de fagos infectivos de BAL, Schubert, Biere, et al. (2023) combinaron la filtración de membranas con radiación UV-C para reducir la concentración de fagos infectivos de lactococos en suero de quesería, alcanzando reducciones dos veces mayores a aquellas alcanzadas únicamente con filtración. Michel et al. (2021) también combinaron la filtración de membranas con radiación UV-C y con un tratamiento térmico, para reducir la concentración de fagos infectivos de *L. lactis* en suero de quesería, obteniendo resultados prometedores.

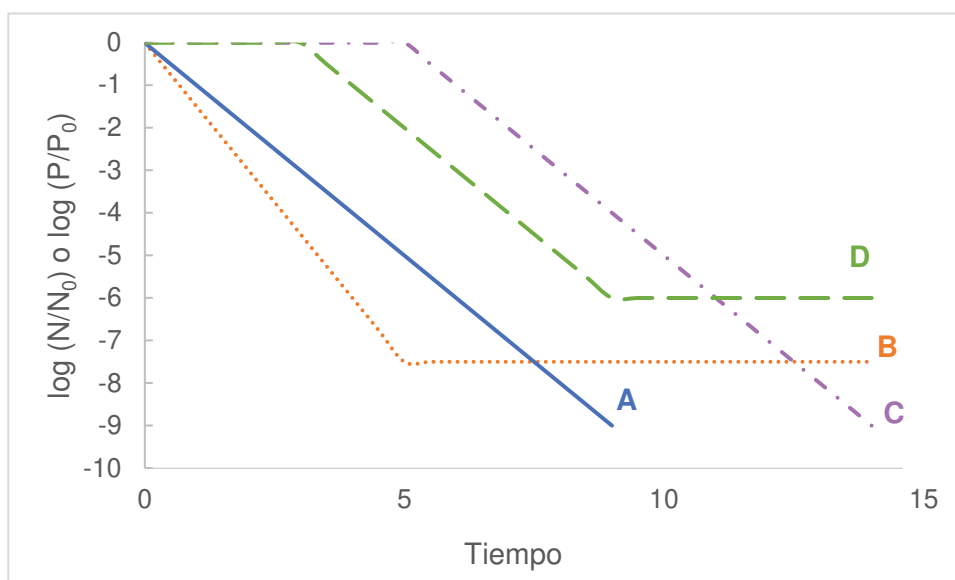
### **1.11. Modelado cinético**

Al analizar las curvas de inactivación de distintos microorganismos, se observa que éstas usualmente presentan cuatro tipos de comportamientos (Figura 1.5) (Xiong et al., 1999):

- **Curva lineal:** este tipo de curvas está basado en la cinética de reacción de primer orden, que indica que la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de los reactivos. Este comportamiento fue observado por ejemplo para los fagos ATCC 15807, 832-B1, 0241, 204, 342, MLC-A, J-1, 0BJ, CHD y QF9 al ser sometidos a un tratamiento fotocatalítico (TiO<sub>2</sub>, UV-A) en Briggiler Marcó et al. (2011).
- **Curva con cola:** en este tipo de curvas se observa una caída lineal, al igual que las anteriores, hasta un cierto nivel de concentración del microorganismo, a partir del cual ésta permanece invariable (efecto de cola). Por ejemplo, esta curva puede manifestarse si algunos microorganismos presentes en la suspensión a inactivar son intrínsecamente más resistentes que otros o están protegidos por diversos factores, tales como células muertas, productos de su destrucción, zonas localizadas con baja actividad del agua, inactivación del agente microbicida, agotamiento del oxígeno, entre otras. De esta manera, estos microorganismos pueden sobrevivir en las condiciones de ensayo o inactivarse a una tasa más lenta. Este comportamiento fue observado por Kim et al. (2017) al tratar los virus MS2, Qβ y ΦX174 con radiación UV-C. A su vez, también se reportó un comportamiento similar en la inactivación térmica de esporos de *Aspergillus niger* (Fujikawa & Itoh, 1996).
- **Curva con hombro:** en estas curvas se observa un “hombro” (fase *lag*) a tiempos cortos de tratamiento, es decir que por un período de tiempo inicial determinado no se produce inactivación, y a continuación sí ocurre la caída lineal de la población microbiana. Este “hombro” puede deberse a varias razones. Por ejemplo, si existen microorganismos agrupados en la suspensión a inactivar, para que no se observe el efecto de hombro sería necesario que todas las células del aglomerado se inactiven a una velocidad mayor que la correspondiente a la multiplicación celular. Por otro lado, si la fase *lag* representa un período en el que las células son capaces de resintetizar un componente vital, la muerte se produce solo cuando la tasa de destrucción supera la tasa de resíntesis. Si la inactivación térmica de los microorganismos es acumulativa en lugar de instantáneamente letal, o si hay múltiples sitios donde puede producirse la inactivación térmica, también se puede observar este efecto de hombro en las curvas de inactivación (Xiong et al., 1999). En la fase *lag*, el cambio en la concentración de microorganismos es muy pequeño, mientras que en la porción lineal de la curva la velocidad de inactivación específica es constante o prácticamente constante. Este comportamiento fue observado por ejemplo para

*C. parapsilosis* BC1 y SC1 al ser sometidos, suspendidos en jugo de calamansi, a radiación UV-C (Gabriel, Manalo, et al., 2018).

- **Curva sigmoideal:** estas curvas combinan los efectos explicados anteriormente, ya que presentan el hombro, la caída lineal en la infectividad y la cola. Curvas de este tipo fueron reportadas en bibliografía para la inactivación de *Listeria innocua* al ser sometida a tratamientos térmicos entre 52,5 °C por 200 min y 65 °C por 2,5 min (Miller et al., 2009).



**Figura 1.5.** Representación gráfica de los cuatro tipos de curvas más observadas para la inactivación de microorganismos: A) curva lineal, B) curva con cola, C) curva con hombro y D) curva sigmoideal.

Estas curvas de inactivación pueden ser ajustadas con modelos matemáticos que dan lugar a una mejor interpretación del proceso de inactivación, como así también permiten explicar o simular los efectos en la inactivación al modificar ciertas condiciones operativas, tales como temperatura, presión, dosis de radiación, pH, humedad relativa, entre otras (H. Chen & Hoover, 2003; Ochoa-Velasco et al., 2018; San Martín et al., 2007).

En bibliografía existen trabajos donde se reportaron estos tipos de comportamiento en la inactivación de distintos microorganismos y virus, para los cuales se ajustaron distintos modelos, mostrando buenos ajustes. Por ejemplo, Kim et al. (2017) utilizaron los modelos Weibull, *Biphasic*, *log linear-tail* y Weibull-tail para modelar las curvas de inactivación obtenidas para los virus MS2, Q $\beta$  y  $\Phi$ X174, infectivos de *E. coli*, al ser sometidos a radiación UV-C. Para los virus MS2 y Q $\beta$ , los modelos Weibull y *Biphasic* fueron los que mejor ajuste presentaron ( $R^2 = 0,97 - 0,99$ ), mientras que el modelo que mejor ajustó las curvas del virus  $\Phi$ X174 fue el de Weibull-tail. Por otro lado, H. Chen & Hoover (2003) estudiaron la inactivación de *Yersina enterocolítica* ATCC

35669 con alta presión hidrostática y ajustaron las curvas obtenidas con los modelos de Weibull, Gompertz y el *log-logistic*, siendo este último el que presentó el mejor ajuste ( $R^2 = 0,946 - 0,982$ ). Además, las bacterias *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, el virus MS2 (infectivo de *E. coli*) y el coronavirus T1UV suspendidos en agua de coco, fueron inactivados siguiendo una cinética de primer orden ( $R^2$  entre 0,95 y 0,98) al ser tratados con radiación UV-C (Bhullar et al., 2018). Por otro lado, Marugán et al. (2008) observaron que la inactivación fotocatalítica ( $\text{TiO}_2$ , UV-A) de suspensiones de *E. coli* K12 (ATCC 23631) siguió una curva sigmoideal. Los autores propusieron un modelo cinético de tres parámetros, basado en la ecuación cinética de Langmuir-Hinshelwood, donde un parámetro representa la velocidad de reacción de las ROS con las bacterias (constante cinética), otro parámetro representa la interacción entre el catalizador y las bacterias (constante de pseudo-adsorción, relevante para el efecto de hombro) y el último parámetro está relacionado con la competencia por las ROS con los productos de oxidación liberados al medio durante la inactivación (coeficiente de inhibición, relevante para el efecto de cola). Este modelo, en el que cada parámetro tiene su significado físico, ajustó satisfactoriamente los resultados obtenidos por los autores, facilitando su interpretación y permitiendo una simple evaluación de la influencia de distintas variables de proceso. De esta manera, los autores sugirieron que el efecto de hombro se produce por un ataque en serie de los radicales hidroxilos a la célula bacteriana, donde no se produce un daño letal instantáneo, sino acumulado.

En la presente tesis, luego de obtener los resultados de la inactivación fágica con distintas tecnologías, resultó de gran utilidad realizar el ajuste de los datos obtenidos con modelos cinéticos. Estos modelos sirven para comprender el comportamiento fágico frente a las distintas tecnologías, como así también para predecir su comportamiento frente a condiciones distintas a las ensayadas para una tecnología determinada. Además, los modelos cinéticos son esenciales para optimizar las condiciones ambientales y de operación de los equipos, a fin de maximizar la inactivación fágica y poder diseñar equipamientos adecuados para su aplicación en escalas mayores, tales como ambientes productivos y/o laboratorios.

# **OBJETIVOS**

## Objetivo General

- Diseñar estrategias basadas en procesos fotoquímicos y avanzados de oxidación para la inactivación de fagos de bacterias lácticas contenidos en bioaerosoles o depositados en superficies, aplicables en el ámbito de industrias lácteas fermentativas. Estas estrategias podrían sumarse a las que actualmente se implementan en los ambientes industriales para disminuir la incidencia de infecciones fágicas.

## Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de una pintura fotocatalítica formulada con  $\text{TiO}_2$  dopado con carbono, tanto bajo radiación visible como bajo radiación UV-A, sobre la inactivación de fagos infectivos de bacterias ácido lácticas.
2. Investigar el efecto de la radiación UV-C sobre la inactivación de fagos infectivos de bacterias ácido lácticas.
3. Analizar la influencia de diversas condiciones sobre las tasas de inactivación fágica y proponer modelos cinéticos que relacionen dicha influencia.
4. Ajustar modelos cinéticos reportados en bibliografía a los resultados obtenidos.
5. Optimizar el funcionamiento de un reactor fotocatalítico ( $\text{TiO}_2$ , radiación UV-A) escala semi-piloto.

# **CAPÍTULO 2 - PINTURA FOTOCATALÍTICA**

## **2.1. Resumen del capítulo**

En el presente capítulo se estudió la inactivación de dieciséis fagos infectivos de BAL empleando una pintura fotocatalítica formulada con dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) dopado con carbono (18 % p/p), irradiada con radiación visible ( $\lambda = 360 - 720 \text{ nm}$ ). Para llevar a cabo estas experiencias, se depositaron y secaron las suspensiones fágicas sobre placas de vidrio borosilicato recubiertas con la pintura. Luego se introdujeron en un reactor fotocatalítico escala laboratorio (80 % de humedad relativa y  $1,35 \times 10^{-7}$  Einstein/(s  $\times$  cm<sup>2</sup>) de flujo de radiación) y se expusieron al tratamiento por un tiempo máximo de 20 h. Paralelamente a los ensayos fotocatalíticos, se realizaron controles – i) con radiación y placas sin recubrir, ii) sin radiación con placas recubiertas con pintura y iii) sin radiación y placas sin recubrir – para analizar tanto el efecto fotoquímico en la inactivación (debido exclusivamente a radiación) como el correspondiente a la presencia de la pintura sola. Se graficaron los resultados obtenidos ( $\log(P)$  vs tiempo) y se observó que todas las curvas de inactivación siguieron una cinética de primer orden respecto a la concentración de fagos, con constantes cinéticas de inactivación aparente entre 0,30 (fago LDG) a 7,52 1/h (fago 892-LB) para los ensayos fotocatalíticos y entre 0,00 (fago M1-G1b) y 1,95 1/h (fago QF9) para los ensayos fotoquímicos. No se observó variación en la infectividad de los fagos durante los experimentos al trabajar con ninguno de los dos controles en oscuridad. También se calcularon las tasas de reducción fágica en órdenes log/h, las cuales variaron entre 0,12 (fago LDG) y 3,11 órdenes log/h (fago 892-LB) para los ensayos fotocatalíticos y entre 0,093 (fago 009-ML) y 0,80 órdenes log/h (fago QF9) para los ensayos fotoquímicos. Las eficiencias fotocatalíticas fotónicas y cuánticas calculadas para los dieciséis fagos variaron entre  $3,00 \times 10^9$  (fagos Ib<sub>3</sub> y Cb1/204) y  $4,06 \times 10^{12}$  UFP/Einstein (fago QF9) para las eficiencias fotónicas y entre  $6,00 \times 10^9$  (fago Cb1/204) y  $9,17 \times 10^{12}$  UFP/Einstein (fago QF9) para las eficiencias cuánticas.

A continuación, se seleccionaron los fagos J-1, infectivo de *Lc. casei*, y M13-G1b, infectivo de *St. thermophilus*, para analizar la influencia de la humedad relativa, el flujo de radiación y la fuente de radiación en la inactivación fágica en presencia de la pintura fotocatalítica. Para ello se seleccionaron tres niveles de humedad relativa (30, 50 y 80 %) y tres niveles de flujo de radiación ( $2,45 \times 10^{-8}$ ,  $7,61 \times 10^{-8}$  y  $1,35 \times 10^{-7}$  Einstein/(s  $\times$  cm<sup>2</sup>)) y se variaron estos parámetros de a uno por vez. Como fuente de radiación alternativa se seleccionaron lámparas de radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400 \text{ nm}$ ). Las curvas de inactivación obtenidas ( $\log(P)$  vs tiempo) en todos los casos siguieron una cinética de inactivación de primer orden respecto a la concentración de fagos. Se observó que, a medida que aumentó la humedad relativa, la tasa de reducción fágica

también se incrementó para ambos fagos, especialmente para los valores elevados de humedad relativa, tanto para los ensayos fotocatalíticos como para los fotoquímicos. De manera similar, se observó que, al reducir el flujo de radiación, las tasas de reducción fágica de ambos fagos también disminuyeron, tanto para los ensayos fotocatalíticos como para los fotoquímicos. Se propuso un modelo cinético que relaciona la constante de inactivación aparente con los parámetros humedad relativa y flujo de radiación, logrando una muy buena correlación entre los valores obtenidos experimentalmente y los predichos por el modelo, con RMSE de 4,43 % para el fago J-1 y 2,98 % para el fago M13-G1b. Al cambiar la fuente de radiación a lámparas UV-A, las reducciones en la infectividad fueron 1,70 (fago J-1) y 2,16 veces (fago M13-G1b) mayores a las obtenidas en presencia de radiación visible. Se observó también que tanto las constantes aparentes de inactivación como las eficiencias fotónica y cuántica fueron mayores, para ambos fagos, al trabajar con radiación UV-A.

Se demostró la eficacia de la pintura fotocatalítica en la inactivación de fagos, como así también la influencia de los parámetros humedad relativa, flujo y fuente de radiación en la inactivación fágica. La aplicación de la pintura en diversas superficies de las industrias lácteas utilizando el propio sistema de iluminación de la planta contribuiría a la reducción de la concentración de fagos en el medio ambiente, disminuyendo así el riesgo de infecciones fágicas. El modelo desarrollado resultaría útil para predecir la inactivación de los fagos bajo diversas combinaciones de niveles de humedad relativa y flujo de radiación cercanas a aquellas encontradas en entornos de industrias lácteas, que podrían resultar diferentes a las ensayadas en este capítulo.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Cepas bacterianas**

Las cepas hospedadoras utilizadas para propagar y cuantificar los fagos estudiados en esta tesis pertenecen a la colección del INLAIN y se mantienen almacenadas a -20 °C y -80 °C en leche descremada reconstituida (10 % p/p, LDR), caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) o caldo M17 (Biokar, Beauvais, Francia) adicionado con un 15 % v/v de glicerol como crioprotector en los últimos dos casos. Para la reactivación de las cepas, se tomó un vial de cada una de ellas, se descongeló e inoculó en 5 ml del medio de cultivo correspondiente, según lo indicado en la Tabla 2.1. Luego de la incubación por 16 h (*overnight*) a la temperatura óptima de desarrollo de la cepa (Tabla 2.1), se realizaron dos subcultivos sucesivos para lograr la reactivación total. Una vez reactivadas las cepas, se chequeó su pureza mediante estrías en medio de cultivo (MRS o M17, Tabla 2.1) agarizado (1,2 % p/v de agar bacteriológico), con incubación en microaerofilia a la temperatura correspondiente durante 48 h. A continuación, se observaron las colonias desarrolladas macroscópica (homogeneidad y morfología de las colonias) y microscópicamente (morfología celular) con microscopio trinocular con contraste de fases Jenamed 2 (Carl Zeiss-Jena, 100X). Como *stocks* de uso diario, los cultivos fueron almacenados a 4 °C, y se realizaron subcultivos periódicamente (2 – 3 semanas) a fin de mantener las cepas activas.

### **2.2.2. Bacteriófagos**

En el presente capítulo se estudió la inactivación de dieciséis fagos infectivos de diversas especies de bacterias lácticas con importancia industrial (Tabla 2.1), utilizando una pintura fotocatalítica (formulada con TiO<sub>2</sub> dopado con carbono) bajo radiación típica de ambientes interiores ( $\lambda = 360 - 720$  nm). Como se mencionó previamente, la mayoría de estos fagos fueron aislados en nuestro instituto a partir de muestras de productos lácteos defectuosos provenientes de diversas industrias lácteas del país. En la Tabla 2.1 se presentan los fagos estudiados en esta tesis con sus correspondientes cepas sensibles. Se detallan también la fuente de aislamiento de los fagos y las condiciones de crecimiento (medio de cultivo, temperatura) bacteriano y de propagación fágica.

**Tabla 2.1.** Bacteriófagos incluidos en este estudio junto a su cepa sensible, fuente de aislamiento y condiciones de incubación.

| Fago                  | Cepa hospedadora                                               | Condiciones de incubación (medio de cultivo, temperatura) | Fuente de aislamiento                | Referencia                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| <b>009-ML</b>         | <i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009                               | MRS, 45 °C                                                | WPC <sup>1</sup>                     | -                               |
| <b>832-B1</b>         | <i>Lb. helveticus</i> CNRZ 892                                 | MRS, 45 °C                                                | Colección CNRZ <sup>2</sup>          | -                               |
| <b>892-LB</b>         | <i>Lb. helveticus</i> CNRZ 892                                 | MRS, 45 °C                                                | WPC                                  | -                               |
| <b>BYM</b>            | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V          | MRS/LDR <sup>3</sup> , 42 °C                              | Yogur                                | (A. Quiberoni et al., 2003)     |
| <b>Cb1/204</b>        | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 204                | MRS/LDR, 42 °C                                            | Fago temperado                       | (Suárez, Zago, et al., 2008)    |
| <b>Ib<sub>3</sub></b> | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> LB-Ib <sub>3</sub> | MRS/LDR, 42 °C                                            | Yogur                                | (A. Quiberoni et al., 2003)     |
| <b>J-1</b>            | <i>Lc. casei</i> ATCC 27139                                    | MRS, 37 °C                                                | Colección ATCC <sup>4</sup>          | -                               |
| <b>MLC-A</b>          | <i>Lc. paracasei</i> A                                         | MRS, 37 °C                                                | Producto lácteo probiótico           | (Capra et al., 2006)            |
| <b>8014-B1</b>        | <i>Lp. plantarum</i> ATCC 8014                                 | MRS, 37 °C                                                | Colección ATCC                       | -                               |
| <b>M1-G1b</b>         | <i>St. thermophilus</i> G1b                                    | M17, 37 °C                                                | WPC                                  | (Briggiler Marcó et al., 2022)  |
| <b>M13-G1b</b>        | <i>St. thermophilus</i> G1b                                    | M17, 37 °C                                                | WPC                                  | (Briggiler Marcó et al., 2022)  |
| <b>0BJ</b>            | <i>St. thermophilus</i> JB15                                   | M17, 37 °C                                                | Suero de quesería (queso Cuartirolo) | (A. Quiberoni et al., 2000)     |
| <b>Ln-9</b>           | <i>Leuc. mesenteroides</i> L79-1                               | MRS, 30 °C                                                | Suero de molde (queso azul)          | (Pujato et al., 2014)           |
| <b>LDG</b>            | <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> R707                          | MRS, 30 °C                                                | Suero de molde (queso azul)          | (Pujato et al., 2014)           |
| <b>CHD</b>            | <i>L. lactis</i> CI2                                           | M17, 30 °C                                                | Suero de quesería (queso Dambo)      | (Suárez, Moineau, et al., 2008) |
| <b>QF9</b>            | <i>L. lactis</i> CI2                                           | M17, 30 °C                                                | Suero de quesería (queso Fymbo)      | (Suárez, Moineau, et al., 2008) |

<sup>1</sup> WPC, Concentrado de Proteína de Suero, por sus siglas en inglés, *Whey Protein Concentrate*.<sup>2</sup> CNRZ, *Centre National de la Recherche Zootechnique* (Francia).<sup>3</sup> LDR, Leche Descremada Reconstituida, preparada al 10 % p/p.<sup>4</sup> ATCC, *American Type Culture Collection* (EEUU).

Se descongeló un vial de cada fago (almacenados a -20 °C y -80 °C) y con su contenido (500 µl) se infectó la cepa sensible correspondiente, recientemente inoculada al 2 % v/v en caldo fresco MRS o M17 (5 ml), suplementado con 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Paralelamente, se preparó otro tubo de 5 ml de caldo MRS o M17 con el cultivo sin infectar (control) para monitorear el normal crecimiento de la cepa hospedadora. Los tubos fueron incubados a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa bacteriana hasta completo desarrollo del tubo control. La reactivación del fago se comprobó observando la lisis total del cultivo (desaparición de la turbidez característica del crecimiento de la cepa hospedadora). Posteriormente, los fagos se filtraron a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro (GVS Filtration Inc., Findlay, Estados Unidos) (Svensson y Christiansson, 1991).

Una vez reactivados los fagos sobre sus cepas sensibles, fueron propagados con el objetivo de incrementar su concentración de acuerdo a Neviani et al. (1992). Para ello, un cultivo de la cepa hospedadora desarrollado previamente por 16 – 18 h se inoculó (2 % v/v) en caldo MRS o M17 (suplementado con 10 mM de CaCl<sub>2</sub>) y el fago correspondiente se adicionó a diferentes dosis infectivas (*multiplicity of infection, m.o.i.*, que es la relación entre la concentración de partículas virales y la concentración de células bacterianas), entre 1 y 10<sup>-3</sup> aproximadamente. Paralelamente, se inoculó un tubo de medio de cultivo con la cepa hospedadora, pero sin el agregado del fago, para monitorear el normal crecimiento de la misma. Los tubos se incubaron a la temperatura de desarrollo de cada cepa (Tabla 2.1) hasta observar la lisis completa del cultivo. El *m.o.i.* seleccionado fue aquel con el cual se obtuvo la lisis completa más tardíamente, asegurando la máxima propagación de las partículas fágicas.

Luego de la lisis celular a la temperatura correspondiente, los fagos propagados fueron filtrados a través de una membrana de diámetro de poro 0,45 µm (GVS Filtration Inc., Findlay, EEUU) para eliminar restos celulares y fueron posteriormente almacenados a 4 °C. La concentración de fagos (título) se determinó a través del método de la doble capa agarizada, que se detalla a continuación, y se expresó como Unidades Formadoras de Placas por ml (UFP/ml) (Svensson y Christiansson, 1991).

### 2.2.3. Titulación de fagos

La determinación de la concentración de una suspensión fágica (título) se realizó mediante el método de la doble capa agarizada, de acuerdo a Svensson y Christiansson (1991).

Para este método se utilizaron cajas de Petri estériles divididas en cuartos, donde en cada cuadrante se depositaron 2,5 ml de agar MRS o M17 según corresponda (caldo MRS o M17 adicionado de agar bacteriológico al 1,2 % m/v), suplementado con CaCl<sub>2</sub> 10 mM y glicina 100 mM.

Se realizaron diluciones decimales del fago en caldo MRS y se colocaron 100 µl de dichas diluciones en tubos de hemólisis, junto a 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M, 50 µl de glicina 1M y 100 µl de la cepa sensible preparada de acuerdo a:

- Para *Lb. helveticus*: 100 µl de un cultivo *overnight* (desarrollado por 16 – 18 h) en MRS, diluido en 5 ml de caldo MRS.
- Para *Lb. delbrueckii*: 1 ml de un cultivo *overnight* en leche descremada reconstituida (LDR), diluido en 5 ml de caldo MRS.
- Para *Lc. casei/ paracasei*: 300 µl de un cultivo *overnight* en MRS, diluido en 5 ml de caldo MRS.
- Para *Lp. plantarum*: 50 µl de un cultivo *overnight* en MRS, diluido en 5 ml de caldo MRS.
- Para *St. thermophilus*: 1 ml de un cultivo *overnight* en LDR, diluido en 5 ml de caldo M17.
- Para *L. lactis*: 1 ml de un cultivo *overnight* en M17, diluido en 5 ml de caldo M17.
- Para *Leuc. mesenteroides/pseudomesenteroides*: se utilizó directamente el cultivo *overnight* sin diluir.

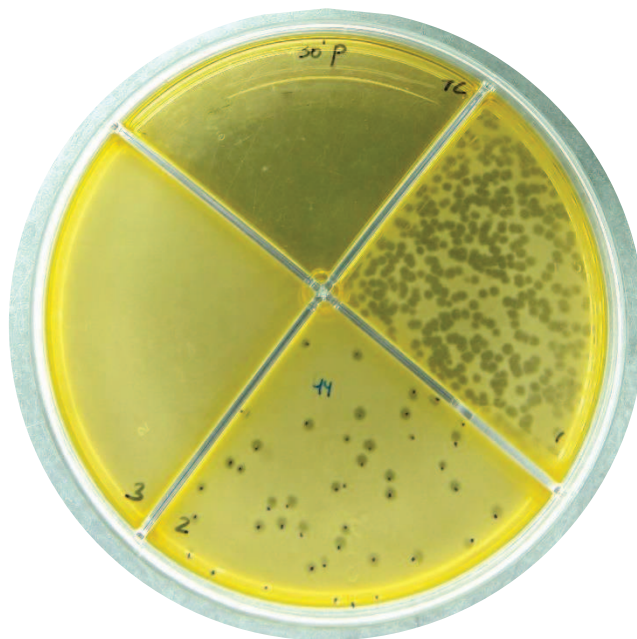
Los tubos de hemólisis fueron adicionados de 1 ml de MRS o M17 *soft agar* (0,6 % m/v de agar bacteriológico, previamente repartidos en tubos de hemólisis) y rápidamente volcados dentro de los cuadrantes de las cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo agarizado, dejando solidificar el medio. Posteriormente, las cajas fueron incubadas a la temperatura de desarrollo correspondiente de cada cepa bacteriana por 16 – 18 h, en microaerofilia.

Al finalizar el tiempo de incubación, se contaron las placas de lisis (zonas de inhibición en el césped bacteriano desarrollado, Figura 2.1) y el título correspondiente se expresó como Unidades Formadoras de Placas (UFP) por mililitro, calculado según la Ecuación (2.1).

$$\text{Título} \left[ \frac{\text{UFP}}{\text{ml}} \right] = n^{\circ} \text{ de placas de lisis [UFP]} \times f_d \times \frac{1000 [\mu\text{l}]}{1 [\text{ml}]} \times \frac{1}{100 [\mu\text{l}]} \quad (2.1)$$

Donde  $f_d$  es el factor de dilución (inversa de la dilución sembrada), correspondiente al cuadrante de la caja de petri donde se realizó el recuento. Para el recuento se seleccionó un cuadrante conteniendo entre 30 y 300 placas de lisis, ya que un mayor número de placas dificultaría su cuantificación porque las mismas se encontrarían muy próximas entre sí (cuadrante superior de la Figura 2.1).

Este procedimiento se realizó para determinar la concentración fágica o título luego de cada propagación y durante cada experiencia.



**Figura 2.1.** Caja de Petri sembrada con diversas diluciones del fago para el recuento de placas de lisis.

#### 2.2.4. Formulación de la pintura fotocatalítica y deposición

La pintura fotocatalítica utilizada en esta tesis fue formulada con agua destilada (30 % p/p),  $\text{TiO}_2$  anatasa dopado con carbono modificado (KRONOClean 7000, 18 % p/p), carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ , Cicarelli, 18 % p/p), resina polimérica (BASF Acronal RS 723, 33,4 % p/p) y agente dispersante (BASF Dispex AA 4146, 0,6 % p/p), en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, UNL – CONICET) (Salvadores, 2017; Salvadores, Alfano, et al., 2020b; Salvadores, Reli, et al., 2020). Cada uno de estos componentes en la pintura cumple una función específica:

- En una pintura convencional, el  $\text{TiO}_2$  aporta poder cubriente y contribuye a la tonalidad blanca de las pinturas (pigmento). En esta tesis, se utilizó  $\text{TiO}_2$  anatasa dopado con carbono, el cual, además de estas funciones en la pintura convencional, posee propiedades fotocatalíticas.
- El  $\text{CaCO}_3$  se utilizó como carga de la pintura. Este componente está relacionado con la viscosidad y la fluidez de la pintura líquida y, una vez que ésta fue aplicada y se encuentra seca, le aporta propiedades relacionadas al poder cubriente, al acabado superficial, permeabilidad y porosidad.
- La resina polimérica liga los diversos componentes de la pintura entre sí, así como también con el medio aplicado durante el proceso de curado.
- El agente dispersante minimiza la formación de conglomerados de partículas durante el proceso de elaboración de la pintura, a fin de obtener una pintura

más homogénea, favoreciendo su posterior aplicación. Además, la formación de conglomerados en la pintura fotocatalítica podría resultar en que el  $\text{TiO}_2$  quede rodeado de partículas de carbonato de calcio, no quedando disponible para producir la reacción.

Para la preparación de las pinturas se colocaron las proporciones antes mencionadas de agua destilada y agente dispersante en un vaso de precipitado y se agitaron a 300 rpm con un agitador mecánico. Continuando con la agitación, se agregó el  $\text{TiO}_2$  y posteriormente el  $\text{CaCO}_3$  para completar la matriz sólida. Finalmente, se agregó la resina polimérica para ligar todos los componentes de la pintura.

La pintura fue depositada sobre placas de vidrio borosilicato de un tamaño de 3 x 7 cm. En primer lugar, las placas fueron lavadas con agua y detergente y luego sumergidas por 24 h en una solución conteniendo alcohol isopropílico (250 ml), hidróxido de potasio (20 g) y agua ultrapura (250 ml). La pintura fue depositada mediante la técnica del *dip coating*, sumergiendo la placa en la pintura fotocatalítica a velocidad controlada (3 cm/min) y retirándola a la misma velocidad constante. Como paso final, las placas recubiertas fueron secadas por 24 h en estufa a 110 °C y expuestas a radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm) por 16 h. Este procedimiento permitió curar la pintura y oxidar posibles compuestos orgánicos que pudieran rodear las partículas del catalizador en la pintura (Marolt et al., 2011; Salvadores, Alfano, et al., 2020b), favoreciendo así la interacción entre el  $\text{TiO}_2$  y las partículas fágicas. Al observar al microscopio de barrido (SEM) la pintura sin iluminación previa y luego de exponerla a radiación visible, se observó que la pintura que no había sido expuesta a radiación presentó muy pocas partículas de catalizador expuestas, a diferencia de la pintura previamente irradiada. A partir de estas imágenes en el microscopio SEM también se observó que la pintura presentó escasas grietas de gran tamaño y ninguna microgrieta (Salvadores, 2017).

Por otro lado, la pintura fotocatalítica de igual formulación a la empleada en esta tesis presentó una finura de molienda de 21  $\mu\text{m}$  al ser medida con un grindómetro, lo cual podría indicar que el  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{CaCO}_3$  forman un conglomerado de partículas (Salvadores, 2017). Al observar la pintura con microscopio óptico, se determinó que el tamaño del aglomerado de partículas en la pintura fue de  $3,63 \pm 1,03$   $\mu\text{m}$ . La cantidad de oxígeno y titanio en la superficie de la pintura fueron determinados por XPS, observando una relación Ti/O superficial igual a 0,015 para el revestimiento de pintura.

La cantidad de pintura depositada fue estimada por diferencia de peso. Las placas de vidrio borosilicato se pesaron antes y después de su recubrimiento con la pintura y proceso de secado. La diferencia entre ambos pesajes correspondió a la cantidad de pintura depositada en cada placa. Este valor se dividió por la superficie total

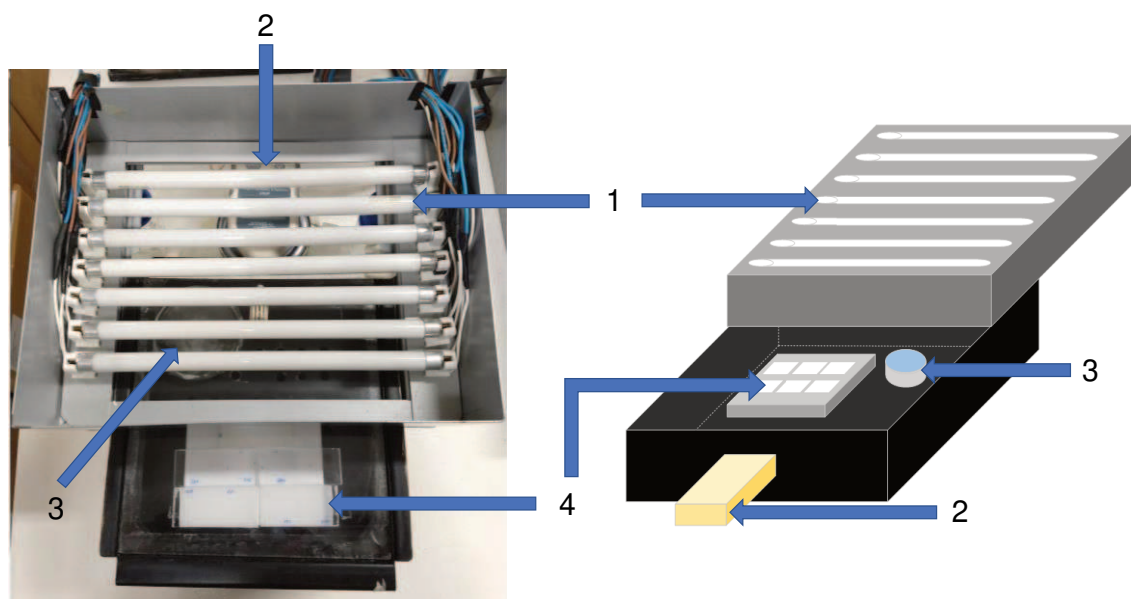
de la placa (ambas caras) y se calculó el valor promedio de pintura depositada por unidad de área a partir de los resultados obtenidos para cada placa.

### 2.2.5. Descripción del reactor utilizado

Los ensayos de inactivación utilizando la pintura fotocatalítica se realizaron en un reactor de laboratorio, diseñado por investigadores pertenecientes al grupo “Ingeniería de Fotorreactores y Tecnologías Ambientales” del INTEC (UNL – CONICET). El reactor está constituido por dos compartimentos separados: una fuente de emisión, formada por siete lámparas y una cámara donde se colocaron las muestras para ser irradiadas. Las lámparas de la fuente de emisión variaron según el ensayo a realizar, pudiendo ser lámparas de radiación visible, típicamente empleadas para iluminar ambientes interiores (VIS,  $\lambda = 360 - 720$  nm, Tubo Fluorescente France F8T5D, China) o lámparas actínicas BL TL 8 W/05 (PHILIPS, Polonia) para emisión de radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm). La parte superior de la cámara de irradiación se mantuvo cerrada con vidrio de borosilicato para mantener la esterilidad y las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) durante los ensayos. A fin de mantener la humedad relativa (HR) en los valores deseados, se utilizaron soluciones saturadas de distintas sales ubicadas en el interior del reactor. La humedad relativa y la temperatura durante los experimentos fueron monitoreadas con un Medidor de Humedad y Temperatura (Termohigrómetro Smart Sensor, Houston, EEUU). Una foto junto a un esquema de este reactor puede observarse en la Figura 2.2.

#### 2.2.5.1. Medición del flujo de radiación y espectro de emisión de lámparas

El flujo de radiación incidente se midió utilizando un radiómetro (IL 1700 Research Radiometer de International Light). El sensor de radiación empleado varió según la lámpara y longitud de onda utilizada para los ensayos. Para la radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm), se empleó el sensor de radiación (SED033 #SED03339470, 400 – 1064 nm), un filtro de paso de banda (F #29411) y un difusor de ojo ancho (W #13971). Mientras que para medir el flujo de radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm), se utilizó el sensor UV SED005/WBS320/W (250 – 400 nm). Las mediciones se realizaron ubicando el sensor en distintas posiciones del reactor, al nivel donde se ubicaron placas recubiertas conteniendo la suspensión fágica a tratar durante las experiencias. El factor de sensibilidad a la respuesta del pico de irradiancia (PIR) para el sensor SED033 fue de  $1,246 \times 10^{-2} \text{ A}\times\text{cm}^2/\text{W}$ , mientras que para el sensor SED005 fue de  $8,83 \times 10^{-4} \text{ A}\times\text{cm}^2/\text{W}$ . Por otro lado, la emisión espectral de las lámparas empleadas (visibles y UV-A) fue determinada utilizando un espectrómetro portátil (Ocean Optics USB 2000+UV-Vis-ES).

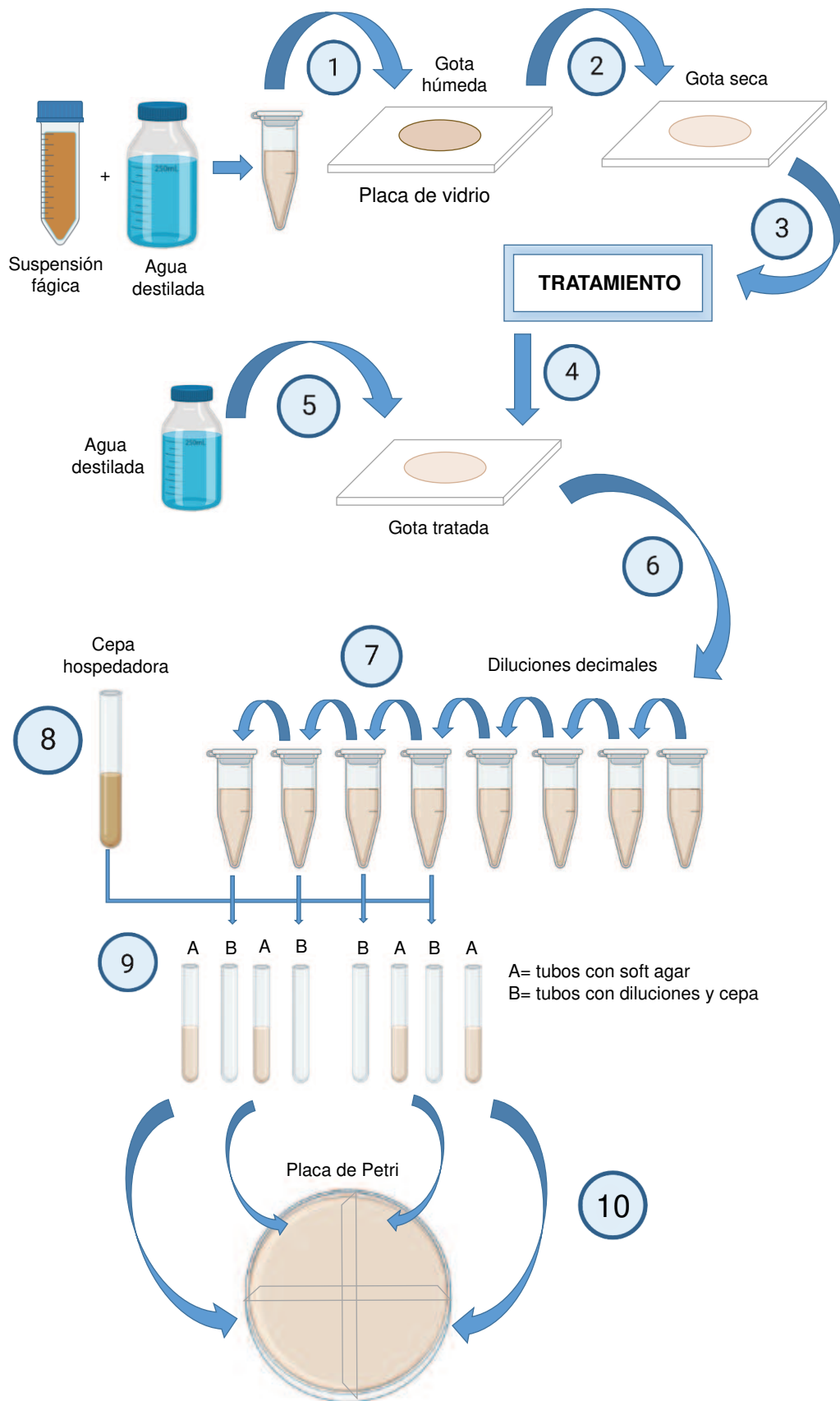


**Figura 2.2.** Foto y esquema del reactor escala laboratorio utilizado. 1) Sistema de iluminación, 2) Termohigrómetro, 3) Recipiente con sal saturada para mantener la humedad relativa constante y 4) Placas de vidrio borosilicato recubiertas con pintura.

#### 2.2.6. Ensayos de inactivación fágica sobre pintura fotocatalítica

Los ensayos de inactivación de los dieciséis fagos seleccionados fueron realizados en el reactor escala laboratorio descrito en la Sección 2.2.3.

Las suspensiones fágicas fueron diluidas en agua destilada estéril hasta una concentración final de  $10^6 - 10^7$  UFP/ml, con el objetivo de remover compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo utilizado para la propagación fágica que pudieran interferir en el proceso de inactivación. Posteriormente, se depositaron 20  $\mu$ l de estas diluciones en las placas de vidrio borosilicato recubiertas con la pintura fotocatalítica. Las placas se colocaron en un ambiente estéril y oscuro hasta que la gota se secó completamente (aproximadamente 30 min). Luego, las placas se ubicaron en el interior de la cámara y fueron sometidas a radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm) por un tiempo total de 20 h. Se tomaron muestras a tiempos predeterminados, lavando las placas con 70  $\mu$ l de agua destilada estéril para recuperar así las partículas fágicas tratadas en un medio líquido. Luego, la enumeración fágica se llevó a cabo por el método de la doble capa agarizada, realizando y sembrando las diluciones decimales del fago correspondiente (Svensson y Christiansson, 1991). En la Figura 2.3. se muestra un esquema detallado del procedimiento seguido para la preparación de la placa conteniendo la suspensión fágica, toma de muestra y cuantificación de las partículas fágicas, de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.2.3.



**Figura 2.3.** Esquema del procedimiento utilizado para los ensayos de inactivación fágica utilizando una pintura fotocatalítica. La placa de vidrio sobre la cual se deposita la gota en el paso 1 puede estar recubierta o no, dependiendo del ensayo realizado.

Además de realizar los ensayos utilizando placas recubiertas con la pintura fotocatalítica y bajo radiación visible, se llevaron a cabo los estudios que se describen a continuación en cada una de las distintas experiencias realizadas, como controles:

- Control i: se utilizaron placas de vidrio borosilicato sin recubrir con la pintura sobre las que se depositó la suspensión fágica. Las placas fueron introducidas en el reactor y sometidas a radiación visible ( $\lambda = 360 - 720 \text{ nm}$ ) por un tiempo total de 20 h.
- Control ii: se utilizaron placas de vidrio borosilicato recubiertas con la pintura sobre las que se depositó la suspensión fágica. Las placas fueron introducidas en el reactor por un tiempo total de 20 h en ausencia de radiación.
- Control iii: se utilizaron placas de vidrio borosilicato sin recubrir sobre las que se depositó la suspensión fágica. Las placas fueron introducidas en el reactor por un tiempo total de 20 h en ausencia de radiación (control de inactivación en oscuridad sin pintura).

Todos los ensayos se realizaron a temperatura (30 °C) y humedad relativa constante (80 % HR) dentro de la cámara. La humedad relativa se mantuvo en el valor indicado mediante una solución saturada de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ubicada también dentro de la cámara.

#### 2.2.7. Variación de condiciones ambientales y fuentes de radiación

Para llevar a cabo estos estudios, se seleccionaron dos de los dieciséis fagos estudiados previamente con la pintura fotocatalítica, en base al comportamiento evidenciado. Estos fagos fueron J-1, infectivo de *Lc. casei* ATCC 27139 y el fago M13-G1b, infectivo de *St. thermophilus* G1b.

En todas las experiencias se realizaron ensayos en condiciones semejantes a las realizadas en la Sección 2.2.6. Es decir, las suspensiones de los fagos mencionados se diluyeron en agua destilada estéril (concentración final de  $10^6 - 10^7 \text{ UFP/ml}$ ), se depositaron y dejaron secar sobre las placas de vidrio borosilicato con y sin pintura. Posteriormente, se introdujeron en el reactor fotocatalítico (Sección 2.2.5), trabajando con 80 % de humedad relativa en su interior y recibieron un flujo de radiación visible ( $\lambda = 360 - 720 \text{ nm}$ ) de  $3,03 \times 10^{-2} \text{ W/cm}^2$  (100 % radiación). A continuación, se fueron variando condiciones de operación tales como humedad relativa, flujo de radiación incidente y fuente de radiación, de a una a la vez, para analizar el efecto de las mismas sobre la inactivación fágica, según se explica a continuación.

#### 2.2.7.1. Variación de la humedad relativa

Se ensayaron dos niveles de humedad relativa adicionales a la de 80 %, esto es 30 % y 50 %, manteniendo el flujo de radiación constante en 100 % ( $\lambda = 360 - 720$  nm). Los valores de humedad relativa se alcanzaron colocando distintas soluciones sobresaturadas de sales dentro de la cámara del reactor. Para el valor de 30 %, se utilizó una sal sobresaturada de cloruro de magnesio, mientras que para el valor de 50 %, se utilizó nitrato de magnesio. La humedad relativa fue controlada con un termohigrómetro (SmartSensor, Houston, EEUU). Los ensayos se realizaron durante un tiempo máximo de 16 h, seleccionando el valor adecuado para cada ensayo de acuerdo a la sensibilidad del fago estudiado. A tiempos predeterminados, se tomaron muestras realizando la enumeración de las partículas fágicas de acuerdo al método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991).

Se realizaron ensayos similares, para todos los niveles de humedad (30, 50 y 80 %), utilizando placas de vidrio borosilicato sin recubrimiento y sometidas a radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm) para analizar el efecto de la humedad ambiente en la inactivación de los fagos en el Control i (sin pintura, con radiación).

#### 2.2.7.2. Variación del flujo de radiación

Se analizaron dos niveles de radiación adicionales al de 100 %, manteniendo el valor de humedad relativa constante en un valor de 80 %. El flujo de radiación fue regulado utilizando filtros ópticos con diferentes transmitancias (18 % y 56 %) que se colocaron entre las lámparas y las muestras a tratar. Los ensayos se realizaron durante un tiempo total de 6 h. A tiempos predeterminados, se tomaron muestras realizando la enumeración de las partículas fágicas de acuerdo al método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991).

Se realizaron ensayos similares utilizando placas de vidrio borosilicato sin recubrimiento y sometidas a los tres flujos de radiación visible (18, 56 y 100 %,  $\lambda = 360 - 720$  nm), para analizar el efecto del nivel de la radiación en la inactivación de los fagos en los ensayos correspondientes al Control i.

#### 2.2.7.3. Variación de la fuente de radiación

Se realizaron ensayos bajo radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm) con el objetivo de estudiar la inactivación fágica empleando una fuente de radiación de mayor energía a la anteriormente estudiada. Se emplearon lámparas UV-A (lámparas actínicas BL TL 8 W/05, PHILIPS, Polonia), con 100 % de flujo de radiación (en este caso de  $6,60 \times 10^{-3}$  W/cm<sup>2</sup>) y 80 % de humedad relativa dentro de la cámara por un tiempo total de 4 h. A tiempos predeterminados, se tomaron muestras para cuantificar las partículas fágicas de acuerdo al método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991).

De la misma manera, se realizaron ensayos control utilizando placas de vidrio borosilicato sin recubrimiento y sometidas a radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm) con un 100 % de flujo de radiación, para analizar el efecto de la longitud de onda de radiación en la inactivación de los fagos obtenida con los ensayos del Control i.

## 2.2.8. Cálculos teóricos

### 2.2.8.1. Cálculo de las constantes de inactivación

Aplicando un balance de fagos a lo largo del tiempo y considerando una inactivación de primer orden respecto a la concentración de fagos, se obtiene la Ecuación (2.2), cuya solución es la Ecuación (2.3) (Horie et al., 1996) o su equivalente Ecuación (2.3').

$$\frac{dP}{dt} = -k \times P \quad (2.2)$$

$$P = P_0 \times \exp(-k \times t) \quad (2.3)$$

$$\log P = \log P_0 - \frac{k \times t}{\ln 10} \quad (2.3')$$

Donde  $P$  [UFP/ml] son las unidades formadoras de placa por unidad de volumen a tiempo  $t$ ,  $P_0$  [UFP/ml] son las unidades formadoras de placa iniciales por unidad de volumen,  $k$  [1/h] es la constante cinética aparente que puede ser  $k_T$ ,  $k_{control\ i}$ ,  $k_{control\ ii}$  o  $k_{reactor}$ , según los datos del ensayo que se estén ajustando y  $t$  [h] el tiempo de irradiación.

Los resultados obtenidos durante los ensayos de inactivación, expresados como  $\log(P)$  (en unidades de UFP/ml) se graficaron en función del tiempo, y se ajustaron los parámetros cinéticos mediante la Ecuación (2.3'), aplicando una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

En particular, la constante cinética aparente total ( $k_T$ ) puede ser desagregada en una constante cinética fotocatalítica ( $k_{ph}$ ) y una constante cinética no fotocatalítica ( $k_{nph}$ ), como se muestra en la Ecuación (2.4).

$$k_T = k_{ph} + k_{nph} \quad (2.4)$$

Donde  $k_{nph}$  representa el efecto no fotocatalítico, es decir, la pérdida de infectividad de los fagos provocada por factores distintos a la fotocatálisis como ser el efecto únicamente de la radiación debido a un efecto fotoquímico (sin pintura,  $k_{light}$ ) y el efecto de la oscuridad tanto en presencia de pintura ( $k_{coating}$ ) como ausencia de la misma ( $k_{reactor}$ ) (Ecuación 2.5).

$$k_{nph} = k_{light} + k_{coating} + k_{reactor} \quad (2.5)$$

Para conocer la influencia de estos efectos no fotocatalíticos por separado, los valores obtenidos durante la conducción de los ensayos en presencia de radiación y

ausencia de pintura (Control i) así como también en ausencia de radiación y presencia de pintura (Control ii) y en ausencia de radiación y ausencia de pintura (Control iii) fueron ajustados con la Ecuación (2.3') obteniendo las constantes  $k_{control\ i}$  (Control i),  $k_{control\ ii}$  (Control ii) y  $k_{reactor}$  (Control iii). A su vez, la constante  $k_{light}$  es el resultado de la diferencia entre las constantes  $k_{control\ i}$  y  $k_{reactor}$  (Ecuación 2.6), y la constante  $k_{coating}$  es el resultado de la resta de las constantes  $k_{control\ ii}$  y  $k_{reactor}$  (Ecuación 2.7).

$$k_{light} = k_{control\ i} - k_{reactor} \quad (2.6)$$

$$k_{coating} = k_{control\ ii} - k_{reactor} \quad (2.7)$$

Al sumar las constantes  $k_{light}$ ,  $k_{coating}$  y  $k_{reactor}$ , se obtuvo la constante no fotocatalítica ( $k_{nph}$ ) (Ecuación 2.5) y finalmente la constante cinética fotocatalítica ( $k_{ph}$ ) que se calculó por diferencia entre  $k_T$  (estimada a partir del ensayo con pintura fotocatalítica y radiación) y  $k_{nph}$ , de acuerdo a la Ecuación (2.4).

Las desviaciones estándar de los valores de  $k_{light}$ ,  $k_{coating}$ ,  $k_{nph}$  y  $k_{ph}$  fueron calculados según la propagación de errores para una suma o resta, según se indica en la Ecuación (2.8).

$$\sigma = \sqrt{\sigma_A^2 + \sigma_B^2 + \dots + \sigma_n^2} \quad (2.8)$$

#### 2.2.8.2. Cálculo de las eficiencias fotónica y cuántica

Para evaluar el rendimiento de la inactivación de los fagos en relación a la energía radiante consumida, se calcularon dos tipos de eficiencias de inactivación fotocatalítica, esto es, la eficiencia fotónica y la eficiencia cuántica. Estas eficiencias se calcularon tanto para los ensayos conducidos en presencia de radiación típica de ambientes interiores como para aquellos llevados a cabo en presencia de radiación UV-A.

La eficiencia de inactivación fotónica se define de acuerdo a la Ecuación (2.9) y representa la relación entre la velocidad de inactivación aparente y el flujo de radiación incidente promedio sobre el recubrimiento de la pintura fotocatalítica.

$$\eta_{ph} = \frac{(-dUFP/dt)}{\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} \times A_{irr}} \quad (2.9)$$

La eficiencia de inactivación cuántica se define en la Ecuación (2.10) y representa la relación entre la velocidad de inactivación aparente y la tasa de radiación absorbida por el catalizador en la película de pintura.

$$\eta_{qu} = \frac{(-dUFP/dt)}{\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}} \times A_{irr}} \quad (2.10)$$

En estas dos últimas ecuaciones,  $\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}}$  es el flujo neto de radiación total incidente promedio sobre el recubrimiento de la pintura fotocatalítica,  $\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}}$  es la velocidad promedio local superficial de absorción de fotones (LSRPA, por sus siglas en inglés) por parte del  $\text{TiO}_2$  contenido en la película de pintura y  $A_{irr}$  es el área superficial recubierta por la pintura fotocatalítica.

Para obtener los numeradores de las Ecuaciones (2.9) y (2.10), se puede calcular un valor promediado en el tiempo de la velocidad de inactivación a través de la Ecuación (2.11).

$$\left. \frac{-dUFP}{dt} \right|_{\Delta t=t-0} = \frac{\int_0^t P(t) \times V dt}{\int_0^t dt} = \frac{UFP|_{t=0} \times (1 - \exp(-k_T \times t))}{t} \quad (2.11)$$

Donde  $P(t)$  está dado por la solución del balance de fagos en el tiempo (Ecuación 2.3) y  $UFP|_{t=0}$  son las unidades formadoras de placa iniciales que se obtiene a través del producto de la intersección de la Ecuación (2.3) con el eje “y” ( $P_0$ ) y el volumen de la suspensión fágica  $V$  depositada en la placa recubierta (20  $\mu\text{l}$ ).

Los denominadores de las Ecuaciones (2.9) y (2.10) se pueden calcular siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. En el caso de la eficiencia fotónica, el flujo neto de radiación total incidente promedio se mide utilizando un radiómetro con el sensor correspondiente a la longitud de onda que se desea medir, de acuerdo a la Sección 2.2.5.1. En cambio, para el cálculo de la eficiencia cuántica, la LSRPA espectral puede ser calculada realizando un balance de energía de radiación, basado en los flujos netos de radiación, de acuerdo a la Ecuación (2.12).

$$e_{\lambda}^{a,s}(\underline{x}) = q_{f,in,\lambda}(\underline{x}) - q_{f,tr,\lambda}(\underline{x}) - q_{f,rf,\lambda}(\underline{x}) \quad (2.12)$$

Donde  $q_{f,in,\lambda}(\underline{x})$  es el flujo local de radiación incidente, es decir el que alcanza la superficie de la pintura fotocatalítica,  $q_{f,tr,\lambda}(\underline{x})$  es el flujo local de radiación transmitido por la superficie de la pintura y  $q_{f,rf,\lambda}(\underline{x})$  es el flujo local de radiación reflejado por la superficie fotocatalítica.

Considerando que el flujo de radiación incidente es en su mayoría uniforme sobre la superficie fotocatalítica, se puede obtener la velocidad superficial local de absorción de fotones (LSRPA) espectral promediada en el área irradiada ( $A_{irr}$ ) de acuerdo a la Ecuación (2.13).

$$\langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{A_{irr}} = \alpha_{TiO_2,\lambda} \times \langle q_{f,in,\lambda} \rangle_{A_{irr}} \quad (2.13)$$

Donde  $\alpha_{TiO_2,\lambda}$  es la fracción de energía absorbida por el  $\text{TiO}_2$  en la pintura a la longitud de onda  $\lambda$ . Este parámetro puede ser calculado a partir de las propiedades ópticas de la pintura fotocatalítica y las propiedades ópticas de la pintura sin el catalizador ( $\text{TiO}_2$ ) (Salvadores, Alfano, et al., 2020b) (Ecuación 2.14).

$$\alpha_{TiO_2, \lambda} = \alpha_f - \alpha_{f-NoTiO_2} \quad (2.14)$$

Donde  $\alpha_f$  y  $\alpha_{f-NoTiO_2}$  son las fracciones de radiación absorbida de la pintura formulada con y sin  $TiO_2$ , respectivamente, a una longitud de onda determinada.

Dado que la fuente de luz empleada tiene una emisión espectral, es necesario integrar la Ecuación (2.13) a lo largo del espectro de longitudes de onda (Ecuación 2.15) para obtener la LSRPA total.

$$\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}} = \int_{\lambda} \frac{E_{\lambda}}{E_T} \times \alpha_{TiO_2, \lambda} \times \langle q_{f,in, \lambda} \rangle_{A_{irr}} d\lambda \quad (2.15)$$

Donde  $\frac{E_{\lambda}}{E_T}$  es la emisión espectral relativa de las lámparas, que se determina utilizando un espectrómetro portátil (Ocean Optics USB 2000 + UV – VIS – ES) según lo descrito en la Sección 2.2.5.1.

Resolviendo el balance de radiación en la pintura, la fracción de energía absorbida ( $\alpha_f$ ) puede ser calculada como se muestra en la Ecuación (2.16) (Siegel y Howell, 2002).

$$\alpha_f = 1 - T_f - R_f \quad (2.16)$$

Donde  $R_f$  es la reflectancia difusiva y  $T_f$  es la transmitancia difusiva de la película de pintura, que pueden ser estimadas con mediciones experimentales de transmitancia difusiva y reflectancia del sistema pintura-soporte-pintura ( $T_{fssf}$  y  $R_{fssf}$ ) y de la placa soporte sin pintura ( $T_s$  y  $R_s$ ) (Ecuaciones 2.17 y 2.18). Estos parámetros fueron determinados experimentalmente mediante un espectrofotómetro con una esfera integradora (Ballari et al., 2016; Zacarías et al., 2012) y aplicando las ecuaciones desarrolladas en Ballari et al. (2016) con el método de balance de flujo de radiación neta en un sistema de tres capas.

$$R_f = \frac{R_{fssf} \times T_s - T_{fssf} \times R_s}{T_{fssf} \times T_s^2 - T_{fssf} \times R_s^2 + T_s} \quad (2.17)$$

$$T_f = \sqrt{\frac{(R_{fssf} - R_f) \times \left[ 1 - R_f \times \left( R_s + \frac{T_s^2 \times R_f}{1 - R_s \times R_f} \right) \right]}{R_s + \frac{T_s^2 \times R_f}{1 - R_s \times R_f}}} \quad (2.18)$$

Conociendo los valores de estas propiedades ópticas es posible obtener la velocidad superficial promedio de absorción de fotones  $\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}}$  (Ecuaciones 2.13 a 2.18) y con ella, la eficiencia cuántica (Ecuación 2.10).

### 2.2.8.3. Modelo cinético empírico

Con el fin de analizar la influencia de las principales condiciones ambientales sobre la eficiencia de inactivación de los fagos se propuso un modelo cinético empírico que considera el efecto de la humedad relativa y del flujo de radiación incidente en la inactivación de los fagos seleccionados (J-1 y M13-G1b) utilizando la pintura fotocatalítica.

Se consideró inactivación fotoquímica para los fagos inactivados durante los ensayos realizados sobre placas sin recubrir con la pintura y en presencia de radiación. Por otro lado, para los ensayos llevados a cabo en presencia de la pintura y de radiación se consideraron los fenómenos fotoquímico y fotocatalítico en conjunto. Se propuso una cinética de inactivación de primer orden con respecto a la concentración de fagos, con la constante de inactivación dependiente del flujo de radiación incidente y de la humedad relativa (Ecuación 2.19).

$$r = -k(\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}}, HR) \times P \quad (2.19)$$

Donde  $r \left[ \frac{UFP}{ml \times h} \right]$  representa la velocidad de inactivación por efecto fotoquímico o fotocatalítico, y  $k$  [1/h] representa la constante de inactivación aparente, para las placas sin recubrir y cubiertas con la pintura, según corresponda. Esta constante es función del flujo de radiación incidente ( $q_{f,in}$  [W/cm<sup>2</sup>]) y de la humedad relativa ( $HR$  [%]).  $P$  representa las unidades formadoras de placas por unidad de volumen [UFP/ml].

Resolviendo un balance de masa para la concentración fágica a lo largo del tiempo, aplicando las cinéticas propuestas en la Ecuación (2.19), se obtiene la Ecuación (2.20), similar a la Ecuación (2.3), pero considerando la dependencia de la constante de inactivación  $k$  con el flujo de radiación y la humedad relativa. Por lo tanto, en estas ecuaciones, el número de fagos por unidad de volumen dependerá de la humedad relativa, del flujo de radiación incidente que alcanza la superficie de la placa, del número inicial de fagos presentes al comienzo del ensayo y del tiempo de tratamiento.

$$P = P_0 \times \exp(-k(\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}}, HR) \times t) \quad (2.20)$$

Donde  $P$  [UFP/ml] representa las unidades formadoras de placas en los ensayos con placas sin recubrir o recubiertas,  $P_0$  [UFP/ml] son las unidades formadoras de placas iniciales por unidad de volumen y  $t$  es el tiempo de irradiación [h].

Finalmente, se propuso una dependencia empírica de las constantes de inactivación (para placas cubiertas y sin recubrir) con el flujo de radiación incidente (función potencial) y la humedad relativa (modelo logístico) (Ecuación 2.21).

$$k(\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}}, HR) = \frac{-k_1 \times \langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}}^{k_2}}{1 + \exp(-k_4 \times (C_w - k_3))} \quad (2.21)$$

Donde  $C_w$  es la concentración de agua en la fase gaseosa [ $mol_{agua}/m_{aire}^3$ ], que es proporcional a la humedad relativa en cada ensayo.  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  y  $k_4$  son parámetros cinéticos a ser determinados utilizando los resultados de los ensayos experimentales de inactivación, obtenidos con placas cubiertas y sin recubrir, bajo diferentes flujos de radiación y humedades relativas. Específicamente,  $k_1$  es la constante cinética de proporcionalidad pre-potencia,  $k_2$  representa el orden de reacción teniendo en cuenta el flujo de radiación incidente,  $k_3$  representa el punto medio de la función logística y  $k_4$  representa la pendiente de la curva de la función logística. Reemplazando la Ecuación (2.21) en la (2.20), resulta la Ecuación (2.22).

$$P = P_0 \times \exp\left(\frac{-k_1 \times \langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}}^{k_2} \times t}{1 + \exp(-k_4 \times (C_w - k_3))}\right) \quad (2.22)$$

Para obtener los parámetros cinéticos, se utilizó un optimizador de parámetro no lineal, el cual aplica el método del gradiente reducido generalizado, minimizando el error cuadrático medio (RMSE por sus siglas en inglés, Ecuación (2.23)) entre los resultados experimentales y las predicciones del modelo.

$$RMSE (\%) = \sqrt{\frac{\sum_1^n \left( \frac{\log(P_{exp}) - \log(P_{mod})}{\log(P_{exp})} \right)^2}{n}} \times 100 \quad (2.23)$$

Donde  $P_{exp}$  y  $P_{mod}$  son la concentración fágica experimental y la predicha por el modelo teórico, respectivamente, y  $n$  es el número de muestras estudiadas de todos los ensayos.

En primer lugar, se regresionaron los parámetros para los ensayos realizados con placas sin recubrir con la pintura y luego se procedió de manera similar para obtener los mismos parámetros para los ensayos de inactivación fotocatalítica, es decir cuando se utilizaron las placas recubiertas con la pintura, en presencia de radiación en ambos casos.

### 2.2.9. Análisis estadístico

Todas las experiencias se realizaron por triplicado en ensayos independientes. Los datos fueron analizados con el modelo de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía utilizando el software R, con un error típico ( $\alpha$ ) de 5 %. Todos los supuestos del modelo (independencia de las observaciones, normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas, (Walpole et al., 2012)) fueron verificados. Las comparaciones entre reducciones log por unidad de tiempo o entre las constantes de inactivación se realizaron con el Test de Tukey, el cual permite la formación de intervalos de confianza del  $100 \times (1-\alpha) \%$  simultáneos para todas las comparaciones por pares, buscando detectar una diferencia significativa entre las medias  $i$  y  $j$  ( $i \neq j$ ) (Walpole et al., 2012).

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Deposición de pinturas

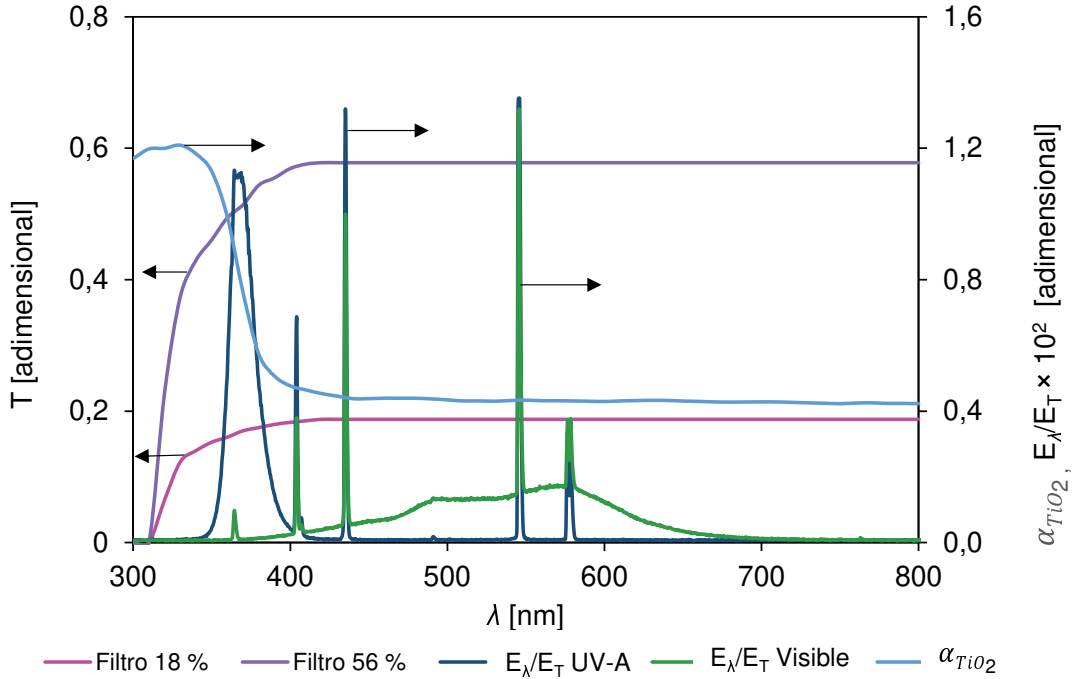
La cantidad de pintura depositada por unidad de área en las placas fue determinada por un promedio en la diferencia de pesada entre las placas sin recubrir y las placas recubiertas con pintura. Posteriormente se dividió por la superficie total de la placa (ambas caras), resultando en un valor de  $2,04 \pm 0,22 \text{ mg/cm}^2$ .

Como se mencionó en materiales y métodos, el  $\text{TiO}_2$  se encuentra en una concentración de 18 % p/p en la pintura antes de su deposición. Sin embargo, para determinar la cantidad de  $\text{TiO}_2$  presente realmente en la pintura fotocatalítica una vez depositada y secada, es necesario considerar que el agua presente en la pintura se evaporará completamente durante el secado, modificando la proporción de los sólidos presentes. Como se describió en la Sección 2.2.4, la pintura fue formulada con 30 % p/p de agua destilada. Por otro lado, la resina polimérica tiene 48 % p/p de sólidos y se incorporó en la formulación de la pintura en una proporción de 33,4 % p/p, por lo que le otorgaría realmente a la pintura una concentración de 16,03 % p/p de sólidos y 17,37 % p/p de agua. Teniendo en cuenta lo expuesto se concluye que, de cada 100 g de pintura, solo 52,63 g serán sólidos y el resto será agua (30 % p/p de agua destilada y 17,37 % p/p del agua proveniente de la resina). Esta agua se evaporará durante el proceso de secado. Por lo tanto, si la concentración de  $\text{TiO}_2$  en la pintura antes de su deposición es de 18 % p/p y 100 g de pintura sin secar se corresponden con 52,63 g de pintura seca (su cantidad de sólidos), la pintura depositada y secada tendrá finalmente una concentración de 34,20 g de  $\text{TiO}_2$  por cada 100 g de pintura seca presente en la placa. Este resultado multiplicado por la cantidad de pintura depositada en las placas, que surgió a partir de la diferencia de pesada anteriormente mencionada, resultó en una carga de  $\text{TiO}_2$  presente en las placas igual a  $0,697 \pm 0,075 \text{ mg/cm}^2$ .

### 2.3.2. Campo de radiación en el fotorreactor

En primer lugar, se expondrán los resultados obtenidos al trabajar con lámparas de radiación visible (VIS,  $\lambda = 360 - 720 \text{ nm}$ ), que comúnmente son empleadas para iluminar ambientes interiores. Utilizando el radiómetro IL 1700 Research Radiometer (*International Light*) con el sensor de radiación SED033 #SED03339470 y siguiendo procedimiento descrito en la Sección 2.2.5.1, el valor promedio del flujo de radiación neto incidente resultó en  $\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} = 3,03 \times 10^{-2} \text{ W/cm}^2$  con una desviación relativa estándar de 0,73 %. Transformando Watts en Einstein por segundo y considerando la emisión espectral  $\left( \frac{E_\lambda}{E_T} \right)$  de las lámparas de radiación visible (Figura 2.4), el valor resultante es  $\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} = 1,35 \times 10^{-7} \text{ Einstein/(s} \times \text{cm}^2)$ . En la Figura 2.4 también se

muestran las transmitancias de los filtros empleados para las experiencias variando el flujo de radiación incidente.



**Figura 2.4.** Fracción espectral de energía absorbida por el  $\text{TiO}_2$  contenido en la película de pintura ( $\alpha_{\text{TiO}_2}$ ), distribución espectral de emisión de las lámparas ( $\frac{E_\lambda}{E_T}$ ) de radiación visible y de las lámparas UV-A y transmitancias de los filtros empleados para las experiencias variando el flujo de radiación.

La fracción de radiación absorbida por unidad de peso de pintura depositada y por unidad de área superficial recubierta,  $\alpha_{\text{TiO}_2, \lambda}^*$ , fue determinada en función de la longitud de onda ( $\lambda$ ) en (Salvadores, Reli, et al., 2020), aplicando las Ecuaciones (2.14) y (2.16) a (2.18) y utilizando información experimental de la transmitancia difusiva y mediciones de reflectancia del soporte recubierto con pintura y del soporte sin recubrir (Salvadores, Reli, et al., 2020). Estos valores de  $\alpha_{\text{TiO}_2, \lambda}^*$  fueron multiplicados por la cantidad de pintura depositada por unidad de área, que fue obtenida por diferencia de peso de las placas utilizadas en esta tesis ( $2,04 \pm 0,22 \text{ mg/cm}^2$ ), resultando en un valor de  $\alpha_{\text{TiO}_2, \lambda}$  adimensional que se muestra en la Figura 2.4.

La velocidad local superficial de absorción de fotones (LSRPA) espectral fue calculada de acuerdo a la Ecuación (2.13). Integrando en todas las longitudes de onda emitidas por las lámparas según la Ecuación (2.15), la LSRPA total resultó en  $6,04 \times 10^{-8} \text{ Einstein/(s} \times \text{cm}^2\text{)}$ .

Con respecto a la radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400 \text{ nm}$ ), el valor promedio del flujo de radiación neto incidente determinado experimentalmente para este tipo de lámparas

fue de  $\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} = 6,60 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ , con una desviación estándar relativa de 0,21 %. Considerando la emisión espectral  $\left(\frac{E_\lambda}{E_T}\right)$  de las lámparas UV-A (Figura 2.4), el valor resultante del flujo de radiación expresando las unidades de energía en Einstein es  $\langle q_{in} \rangle_{A_{irr}} = 2,29 \times 10^{-8} \text{ Einstein/(s} \times \text{cm}^2)$ . Con la Ecuación (2.13) se calculó la LSRPA espectral para las lámparas UV-A. Empleando  $\alpha_{TiO_2}$  y la emisión espectral  $\left(\frac{E_\lambda}{E_T}\right)$  de las lámparas UV-A de acuerdo a la Ecuación (2.15), la LSRPA total resultó en  $1,54 \times 10^{-8} \text{ Einstein/(s} \times \text{cm}^2)$ .

### 2.3.3. Ensayos de inactivación fágica

Como se explicó anteriormente, los ensayos de inactivación de los dieciséis fagos fueron realizados en un reactor escala laboratorio irradiado con luz visible, a humedad relativa y temperatura controladas (80 % y 30 °C).

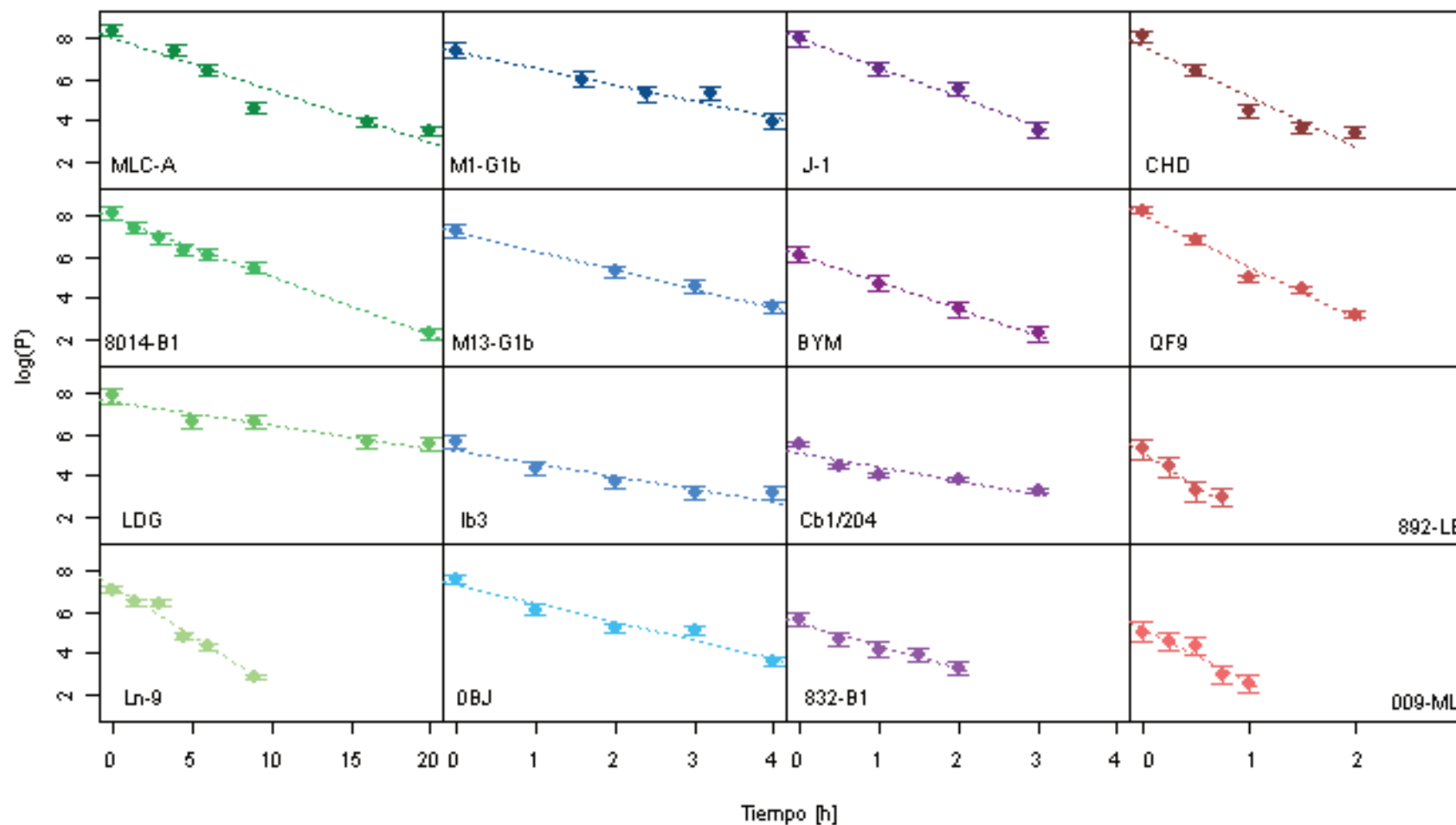
En primer lugar, se debe considerar que el proceso de deposición y secado de los fagos sobre las placas de vidrio recubiertas con pintura puede producir reducciones en los títulos al ser posteriormente recuperados para su titulación, en comparación con los originalmente depositados. Para la mayoría de los fagos, se recuperó aproximadamente la misma cantidad de partículas fágicas que se habían depositado (entre  $1,0 \times 10^6 \text{ UFP/ml}$  y  $1,0 \times 10^7 \text{ UFP/ml}$ ), mientras que los fagos BYM, 892-LB, 832-B1, 009-ML, Ib<sub>3</sub> y Cb1/204 perdieron parte de su infectividad debido al proceso de deposición y secado, alcanzando reducciones de hasta 1,3 órdenes log. Sin embargo, una vez secados, los títulos de todos los fagos permanecieron sin variación luego de 20 h en esas condiciones.

La Figura 2.5 muestra los resultados obtenidos durante los experimentos de inactivación fágica utilizando pintura fotocatalítica en función del tiempo ( $\log(P)$  vs. tiempo), para cada fago ensayado, así como también las regresiones lineales. Cabe aclarar que los resultados experimentales fueron afectados por un factor de dilución de 3,5 para poder compararlos con los obtenidos previamente en ensayos con fotocátalisis prístina (TiO<sub>2</sub> como catalizador y radiación UV-A) en los que se empleó el mismo reactor (Briggiler Marcó et al., 2011). La aplicación de este factor de dilución se debe a que las metodologías de deposición de los fagos sometidos a ambos tratamientos (fotocátalisis prístina y pintura) fueron diferentes, ya que en el trabajo citado la suspensión fágica no se secó sobre la placa de vidrio borosilicato, sino que, luego de ser depositada, se cubrió con otra placa de vidrio y los fagos permanecieron en medio líquido durante el tratamiento de inactivación. Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, en esta tesis se depositaron y secaron 20  $\mu\text{l}$  de cada suspensión fágica sobre las placas y, para poder recuperar los fagos en medio líquido y poder realizar la cuantificación

fágica, fue necesario agregar 70  $\mu$ l de agua destilada estéril. Por este motivo es que se aplicó el factor de corrección 3,5 (70  $\mu$ l / 20  $\mu$ l), con el fin de posibilitar la comparación entre ambos ensayos de manera adecuada.

Según lo esperado, se observó un comportamiento fago-dependiente, ya que la mitad de los fagos (892-LB, 009-ML, CHD, QF9, 832-B1, BYM, J-1 y Cb1/204) fueron completamente inactivados (títulos por debajo del límite de detección, que fue 50 UFP/ml) en tiempos cortos de ensayo (entre 1 y 5 h, Figura 2.5). Debido a la distinta sensibilidad de los fagos al tratamiento con pintura fotocatalítica, los tiempos de los ensayos variaron para cada fago estudiado. Como los datos obtenidos en estos ensayos siguen una cinética de primer orden, las reducciones logradas en el tiempo total del ensayo pueden ser consideradas como la sumatoria de pequeñas reducciones logarítmicas iguales en varios periodos de tiempo equivalentes (en este caso una hora). Para poder realizar una comparación entre las reducciones en los títulos de los distintos fagos estudiados, se calcularon las tasas de reducción fágica [órdenes log/h], que representan las reducciones log obtenidas por unidad de tiempo. Calculando este parámetro es posible observar qué fagos se inactivarían más rápido, conociendo cuáles serían los que presentaron las mayores o menores reducciones logarítmicas por unidad de tiempo.

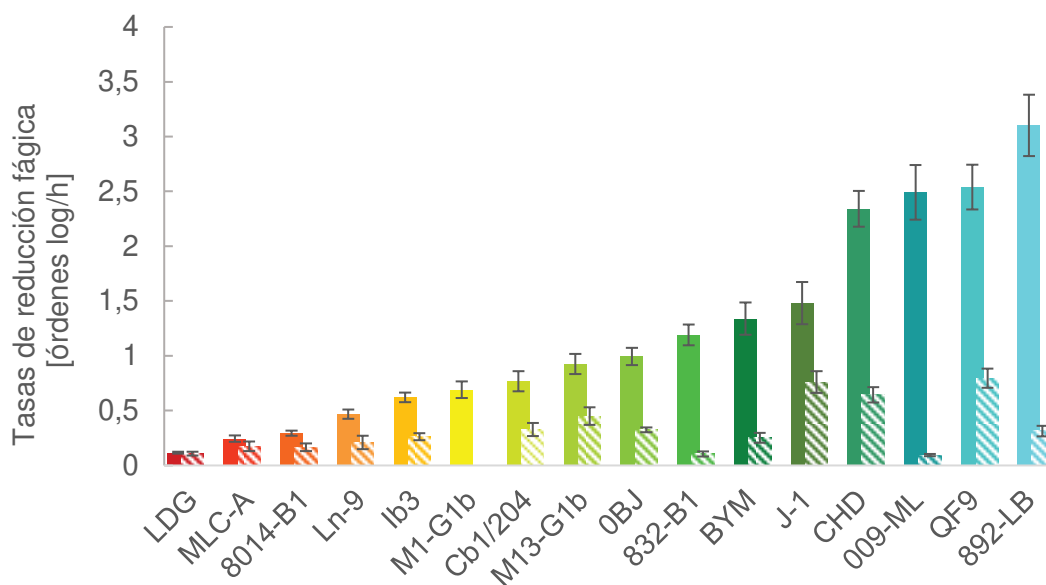
Para los fagos que se inactivaron completamente, las tasas de reducción fágica fueron calculadas como la diferencia entre el primer punto de la curva de inactivación y el último punto de muestreo para el que se detectaron unidades formadoras de placa, ambos afectados por el factor de corrección 3,5, dividido por el tiempo al cual se detectaron las últimas partículas infectivas. Como se mencionó previamente, es posible calcularlos de esta forma ya que los fagos siguen una cinética de inactivación de primer orden, logrando reducciones semejantes en un mismo período de tiempo, en este caso 1 h. Los valores de tasas de reducción fágica se encontraron en el rango entre 0,77 y 3,11 órdenes log/h para los fagos que se inactivaron completamente.



**Figura 2.5.** Inactivación fágica en función del tiempo y regresiones lineales,  $\log(P)$  vs. tiempo, con  $P$  en [UFP/ml], utilizando pintura fotocatalítica bajo radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm). Los ensayos se realizaron a temperatura (30 °C) y humedad relativa (80 %) controladas.

Los fagos restantes (Ib<sub>3</sub>, 0BJ, M1-G1b, M13-G1b, Ln-9, LDG, MLC-A y ATCC 8014-B1) redujeron parcialmente su infectividad con tiempos totales de tratamiento desde 4 a 20 h (Figura 2.5). Estos tiempos de ensayo se seleccionaron en base a la resistencia evidenciada por los fagos frente al tratamiento con la pintura fotocatalítica. Al igual que con los fagos completamente inactivados, para poder realizar una comparación entre las reducciones en los títulos, se calcularon las tasas de reducción fágica en órdenes log/h. Para estos fagos que no fueron completamente inactivados en las condiciones testeadas, las tasas de reducción fágica fueron calculadas como la diferencia entre el primer y el último punto de la curva de inactivación, dividido por el tiempo total de tratamiento. Las tasas de reducción fágica para este grupo de fagos variaron entre 0,12 y 0,99 órdenes log/h.

Los valores de tasas de reducción en órdenes log/h para los dieciséis fagos ensayados se muestran en la Figura 2.6, en orden creciente de acuerdo a su valor.

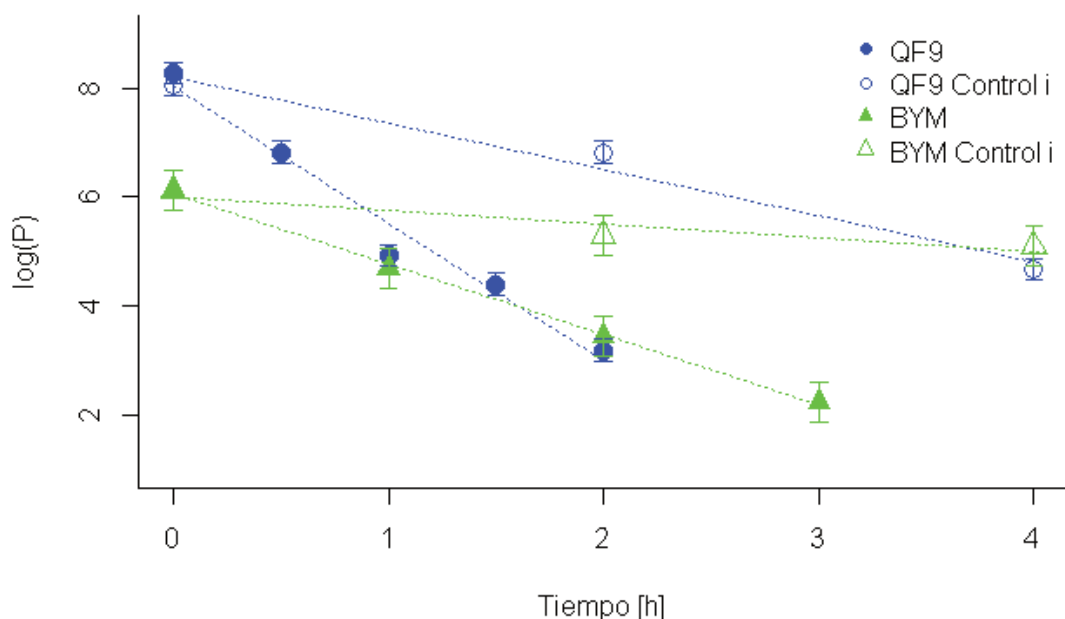


**Figura 2.6.** Tasas de reducción fágica en órdenes logarítmicos por unidad de tiempo [órdenes log/h] utilizando pintura fotocatalítica + radiación visible (barras sólidas) o radiación visible en ausencia de pintura (barras rayadas) para los dieciséis fagos estudiados.

Por otro lado, ninguno de los fagos ensayados en este trabajo fue completamente inactivado al ser depositado sobre placas de vidrio borosilicato sin pintura y en presencia de radiación (radiación sin pintura, Control i). Sin embargo, también se observó un comportamiento fago-dependiente. Solo la infectividad del fago M1-G1b permaneció inalterada cuando fue ensayado bajo las condiciones antes mencionadas, durante 5 h de tratamiento. Por el contrario, los fagos restantes mostraron una variación en la tasa de reducción fágica, que estuvo comprendida entre 0,093 y 0,80

órdenes log/h (barras rayadas en Figura 2.6). Se puede observar que si los fagos se graficaran en forma creciente de acuerdo a las tasas obtenidas en ausencia de pintura y presencia de radiación (Control i) no se ordenarían de la misma manera que la obtenida en presencia de pintura y radiación. En otras palabras, las tasas de reducción fágica representadas por barras rayadas (Control i) no siguen exactamente el mismo orden creciente que el obtenido para las barras sólidas (pintura y radiación), es decir que se evidenció en general una respuesta distinta del fago frente a las dos condiciones ensayadas. Un claro ejemplo de esta diferencia se puede observar con el mencionado fago M1-G1b, que tiene una tasa de reducción fágica nula en los ensayos del Control i mientras que en los ensayos fotocatalíticos presentó una tasa de 0,69 órdenes log/h, encontrándose en una zona intermedia de la Figura 2.6. Otros fagos que demuestran marcadamente esta diferencia en la secuencia de ordenamiento son los fagos 009-ML y 832-B1, los cuales presentaron una alta tasa de reducción fágica al ser tratados con pintura fotocatalítica en presencia de radiación (2,49 y 1,19 órdenes log/h, respectivamente) y una tasa muy baja (0,093 y 0,11 órdenes log/h, respectivamente) al ser tratados con radiación visible en ausencia de pintura. Por el contrario, el fago J-1 fue uno de los fagos que presentó las mayores tasas de reducción fágica en los ensayos del Control i (0,76 órdenes log/h) pero logró una tasa intermedia en los ensayos fotocatalíticos (1,48 órdenes log/h).

En la Figura 2.7 se muestran, como ejemplo, las curvas de inactivación fotocatalítica para los fagos QF9 y BYM, junto a sus respectivas curvas del Control i, observándose diferencias notables entre ambos fagos. Los dos fagos alcanzaron la inactivación completa luego de 3 (fago QF9) y 4 h (fago BYM) de tratamiento fotocatalítico, con tasas de reducción fágica de 2,54 órdenes log/h (fago QF9) y 1,34 órdenes log/h (fago BYM). Sin embargo, en ausencia de pintura y bajo radiación visible (Control i), ninguno de los fagos fue completamente inactivado luego de 4 h de tratamiento. En este sentido, el fago QF9 presentó una tasa de reducción fágica de 0,80 órdenes log/h, mientras que el fago BYM presentó una tasa de 0,25 órdenes log/h.



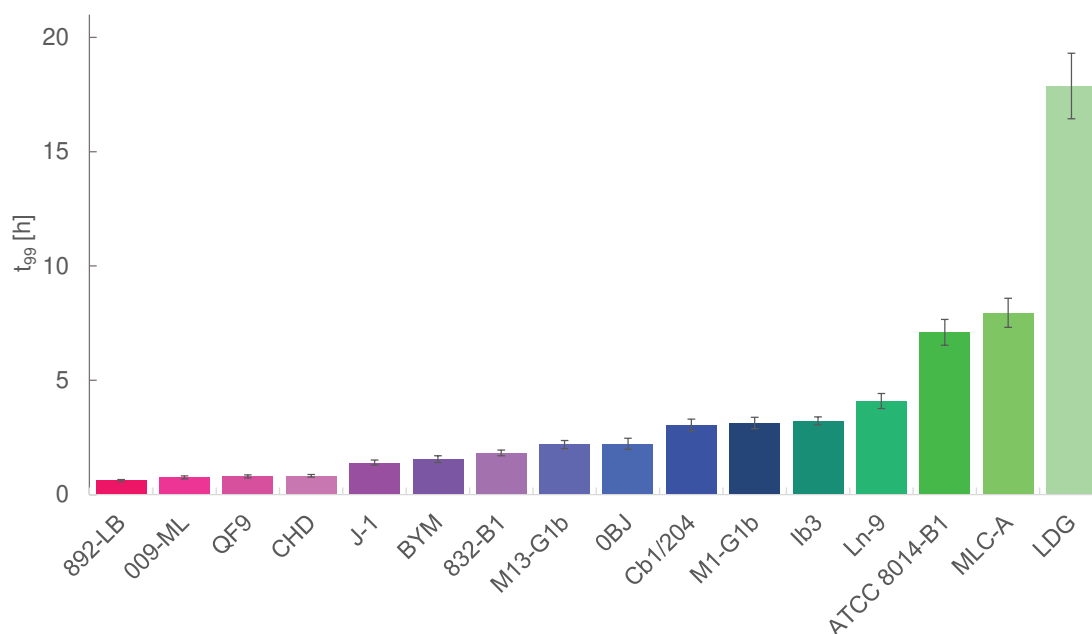
**Figura 2.7.** Inactivación en función del tiempo para los fagos QF9 y BYM en placas recubiertas y sin recubrir (Control i) con pintura fotocatalítica, bajo radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm) y sus regresiones lineales. Los ensayos fueron realizados a humedad relativa (80 %) y temperatura (30 °C) controladas.

Finalmente, en ausencia de radiación y presencia de pintura fotocatalítica (Control ii) no se observó efecto sobre la infectividad fágica para ninguno de los dieciséis fagos estudiados, ya que se obtuvieron títulos similares antes y después del tratamiento. El mismo comportamiento se evidenció, en todos los casos, trabajando con placas de vidrio borosilicato sin recubrir y en oscuridad (Control iii). Por lo tanto, la reducción en la infectividad de los fagos encontrada durante los ensayos conducidos en presencia de radiación y ausencia de pintura (Control i) podría ser atribuida exclusivamente a la presencia de la radiación, lo que representa así una inactivación fotoquímica de los fagos. Este fenómeno se discutirá más adelante, en la Sección 2.3.4.

Otro parámetro que resulta de interés al estudiar la inactivación fágica es el  $t_{99}$ , el cual representa el tiempo necesario para inactivar el 99 % de las partículas fágicas iniciales, es decir, para reducir la infectividad fágica en 2 órdenes log, y se determina a partir de la gráfica de la concentración de partículas fágicas infectivas luego del tratamiento fotocatalítico en función del tiempo ( $\log(P)$  vs. tiempo, Figura 2.5). Estos tiempos fueron calculados para cada uno de los dieciséis fagos incluidos en este estudio y se muestran en la Figura 2.8.

El parámetro  $t_{99}$  está relacionado con la tasa de reducción fágica. Por lo tanto, los fagos 892-LB, 009-ML y QF9, que requirieron los menores tiempos para alcanzar el 99 % de inactivación con valores de 0,6; 0,8 y 0,8 h, respectivamente, mostraron curvas de inactivación con pendientes más pronunciadas que aquellos con mayores valores de

$t_{99}$  (Figura 2.5). Por otro lado, los fagos ATCC 8014-B1, MLC-A y LDG precisaron tiempos más largos para alcanzar el mismo porcentaje de inactivación siendo 7,1; 7,9 y 17,9 h, respectivamente.



**Figura 2.8.** Tiempo necesario para alcanzar un 99 % de inactivación fágica ( $t_{99}$ ) trabajando con pintura fotocatalítica bajo radiación visible.

#### 2.3.4. Cálculo de las constantes de inactivación

Los resultados obtenidos en los ensayos de inactivación fágica ( $\log P$ ) y graficados en función del tiempo fueron regresionados con la Ecuación (2.3') (Figura 2.5), obteniendo una constante cinética aparente total ( $k_T$ ) para cada fago. Esta constante, al igual que el  $t_{99}$ , está relacionada con la tasa de reducción logarítmica de fagos, considerando un modelo cinético de primer orden. Entonces, los fagos con las constantes de mayor valor mostraron una mayor velocidad de inactivación, resultando ser los más sensibles al tratamiento con pintura fotocatalítica y radiación. La Tabla 2.2 muestra los valores de los parámetros de la regresión ( $k_T$ ,  $P_0$  y  $R^2$ ) para cada fago durante los ensayos fotocatalíticos (pintura + radiación) junto a los análisis estadísticos comparando los valores de  $k_T$  y de  $P_0$  para los distintos fagos.

**Tabla 2.2.** Valores de los parámetros de regresión lineal de los ensayos fotocatalíticos (pintura + radiación) para cada fago ensayado. Letras distintas en la columna de  $k_T$  y de  $P_0$  indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

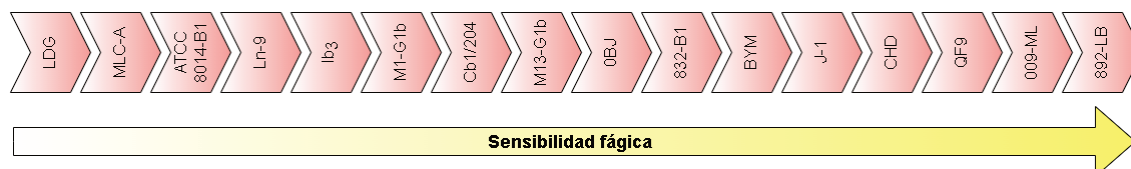
| Fago                  | Pintura + Radiación     |                                  |       |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|-------|
|                       | $k_T$ [1/h]             | $P_0$ [UFP/ml]                   | $R^2$ |
| <b>009-ML</b>         | $6,061 \pm 0,072^g$     | $1,58 \pm 0,03 \times 10^5^a$    | 0,93  |
| <b>832-B1</b>         | $2,53 \pm 0,46^{def}$   | $2,64 \pm 0,48 \times 10^5^a$    | 0,96  |
| <b>892-LB</b>         | $7,52 \pm 0,18^h$       | $1,56 \pm 0,21 \times 10^5^a$    | 0,96  |
| <b>BYM</b>            | $2,97 \pm 0,16^{ef}$    | $1,15 \pm 0,09 \times 10^6^a$    | 0,99  |
| <b>Cb1/204</b>        | $1,51 \pm 0,23^{bcd}$   | $1,17 \pm 0,18 \times 10^5^a$    | 0,84  |
| <b>lb<sub>3</sub></b> | $1,43 \pm 0,42^{bc}$    | $1,70 \pm 0,56 \times 10^5^a$    | 0,88  |
| <b>J-1</b>            | $3,30 \pm 0,30^f$       | $1,07 \pm 0,15 \times 10^8^c$    | 0,98  |
| <b>MLC-A</b>          | $0,579 \pm 0,071^{ab}$  | $9,93 \pm 4,62 \times 10^7^c$    | 0,91  |
| <b>ATCC 8014-B1</b>   | $0,649 \pm 0,074^{ab}$  | $7,11 \pm 1,48 \times 10^7^{bc}$ | 0,99  |
| <b>M1-G1b</b>         | $1,47 \pm 0,15^{bcd}$   | $2,42 \pm 0,34 \times 10^7^{ab}$ | 0,95  |
| <b>M13-G1b</b>        | $2,11 \pm 0,18^{cde}$   | $1,62 \pm 0,28 \times 10^7^a$    | 0,99  |
| <b>0BJ</b>            | $2,07 \pm 0,42^{cde}$   | $2,04 \pm 0,65 \times 10^7^a$    | 0,94  |
| <b>Ln-9</b>           | $1,124 \pm 0,045^{abc}$ | $1,91 \pm 0,14 \times 10^7^a$    | 0,96  |
| <b>LDG</b>            | $0,300 \pm 0,037^a$     | $3,76 \pm 0,68 \times 10^7^{ab}$ | 0,92  |
| <b>CHD</b>            | $5,59 \pm 0,99^g$       | $4,27 \pm 1,25 \times 10^7^{ab}$ | 0,92  |
| <b>QF9</b>            | $5,79 \pm 0,43^g$       | $1,11 \pm 0,33 \times 10^8^c$    | 0,97  |

Considerando estos resultados, los fagos fueron ordenados de acuerdo a su valor creciente de  $k_T$ , es decir, su sensibilidad frente al tratamiento con la pintura fotocatalítica irradiada, como se muestra en la Figura 2.9. Los valores de la constante  $k_T$  variaron en un amplio rango, desde 0,30 a 7,52 1/h. De acuerdo con estos resultados, los fagos más sensibles fueron 892-LB y 009-ML, los cuales se inactivaron completamente en un tiempo menor (1,5 h) y sus constantes aparentes fueron 7,52 y 6,06 1/h, respectivamente. En contraste, los fagos más resistentes fueron LDG y MLC-A, ya que evidenciaron las menores velocidades de inactivación (0,30 y 0,58 1/h, respectivamente). Estos dos fagos fueron estudiados en un tiempo total de 20 h, y ninguno de ellos se inactivó completamente en dicho tiempo, como se discutió previamente. Las constantes aparentes para los fagos restantes se encontraron en el rango entre 0,65 y 5,79 1/h.

El análisis estadístico demostró diferencias significativas en los valores de  $k_T$  y, por lo tanto, en la sensibilidad frente al tratamiento con pintura fotocatalítica y radiación, entre los distintos fagos con un 95 % de nivel de confianza, lo que demuestra también de forma estadística un comportamiento fago-dependiente. En la columna  $k_T$  de la Tabla 2.2 se muestra el análisis estadístico realizado, donde letras distintas indican diferencias significativas entre las medias. Por ejemplo, se puede observar que los cuatro fagos que requirieron los mayores tiempos de tratamiento y mostraron los menores valores de  $k_T$  (LDG, MLC-A, ATCC 8014-B1 y Ln-9) no presentaron diferencias significativas ( $p <$

0,05), mientras que por ejemplo el fago 892-LB presentó un valor de  $k_T$  significativamente diferente al resto de los fagos estudiados, siendo el fago más sensible según los valores de  $k_T$ , como puede observarse en la Figura 2.9.

De igual manera, al realizar el análisis estadístico para los valores de  $P_0$  regresionados (concentraciones iniciales de los fagos) se observa que existen diferencias significativas, con un 95 % de nivel de confianza.



**Figura 2.9.** Fagos ordenados en forma creciente según su sensibilidad fágica obtenida bajo tratamiento con pintura fotocatalítica y radiación visible (según los valores de  $k_T$ ).

Al comparar el ordenamiento de los fagos según sus valores de  $k_T$  (Figura 2.9) y de  $t_{99}$  (Figura 2.8), observamos que siguen un orden muy similar, donde los únicos fagos que invirtieron su lugar en la secuencia fueron los fagos M13-G1b y 0BJ, que mostraron valores parecidos, tanto de  $k_T$  como de  $t_{99}$ . Al analizar las secuencias de ordenamiento, se pueden observar tres grandes grupos: i) los fagos 892-LB, 009-ML, CHD y QF9, ii) los fagos J-1, 832-B1, BYM, 0BJ, M13-G1b, Cb1/204, M1-G1b e lb<sub>3</sub> y iii) los fagos Ln-9, ATCC 8014-B1, MLC-A y LDG. El primer grupo está conformado por los fagos más sensibles, los que se inactivaron más rápidamente y evidenciaron mayores valores de  $k_T$  y menores de  $t_{99}$ . En el segundo grupo los fagos que presentaron un comportamiento intermedio y en el tercero se encuentran los fagos más resistentes, que mostraron los menores valores de  $k_T$  y mayores de  $t_{99}$ , inactivándose más lentamente y precisando un tiempo de tratamiento mayor.

Como con la pintura fotocatalítica la inactivación de los fagos sigue una cinética de primer orden, es esperable que el ordenamiento de los fagos según ambos parámetros ( $k_T$  y  $t_{99}$ ) sea similar, ya que ambos analizan la tasa o velocidad de inactivación, es decir, la pendiente de las curvas. Para el cálculo de  $t_{99}$  se analiza la pendiente sólo en la zona inicial de las curvas, donde se produce la caída del 99 % de infectividad. En cambio, la constante cinética  $k_T$  contempla todos los puntos experimentales de la curva de inactivación, con lo cual los resultados obtenidos calculando ambos parámetros puede provocar cambios leves en el orden en el que se organizarán los fagos de acuerdo a su sensibilidad. Sin embargo, como se puede observar en las Figuras 2.8 y 2.9, los fagos muestran prácticamente la misma secuencia al ser ordenados con ambos parámetros, debido a que siguen una cinética de primer orden a lo largo de toda la curva de inactivación.

Como se mencionó previamente, no se evidenció reducción en los títulos para ninguno de los fagos ensayados en presencia de pintura y ausencia de radiación (Control ii) así como tampoco en ausencia de radiación y de pintura (Control iii). Por lo tanto, los valores de las constantes en oscuridad serían aproximadamente cero ( $k_{control\ ii}$  y  $k_{reactor} \sim 0$ ). Como consecuencia, por la Ecuación 2.7,  $k_{coating} \sim 0$ . De esta manera, la constante no-fotocatalítica representa la inactivación únicamente por efecto fotoquímico ( $k_{control\ i} = k_{light} = k_{nph}$ , de acuerdo a las Ecuaciones 2.5 y 2.6) y puede ser obtenida directamente de la regresión de los datos obtenidos al trabajar con radiación y en ausencia de pintura (Control i). Los valores de la constante no-fotocatalítica (Tabla 2.3) se encontraron en el rango entre 0,00 y 1,05 1/h y un comportamiento fago-dependiente fue a su vez demostrado. El fago M1-G1b no mostró reducción en los títulos en los ensayos del Control i luego de 5 h de tratamiento como se mencionó previamente, siendo nulo el valor de  $k_{nph}$  para este fago. Por el contrario, los fagos J-1 y QF9 evidenciaron los mayores valores de constantes no fotocatalíticas, siendo 1,44 y 1,95 1/h, respectivamente.

Los fagos presentaron diferencias significativas en sus valores de  $k_{nph}$  con un 95 % de nivel de confianza. Este análisis estadístico se muestra en la columna  $k_{nph}$  de la Tabla 2.3, donde distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En esta oportunidad, por ejemplo, se puede observar que el fago QF9 (el más sensible frente al tratamiento fotoquímico) es significativamente diferente al resto de los fagos, con un 95 % de nivel de confianza. Mientras que el fago más resistente frente a este tratamiento (M1-G1b) presentó diferencias significativas con la mayoría de los fagos, a excepción de los fagos 009-ML, 832-B1, MLC-A, ATCC 8014-B1 y LDG ( $p < 0,05$ ).

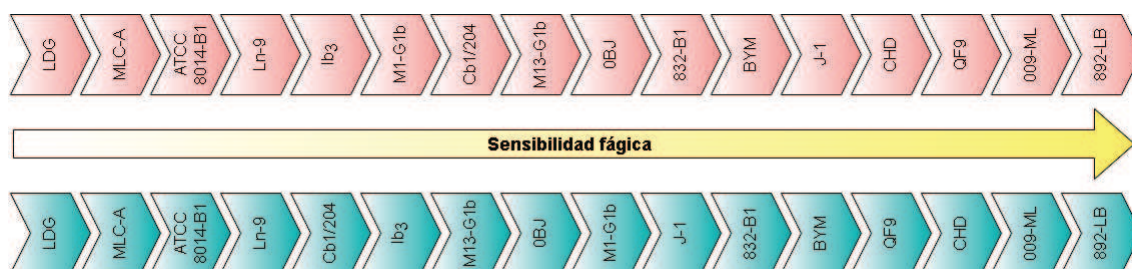
**Tabla 2.3.** Valores de los parámetros de regresión de los ensayos del Control i (radiación sin pintura), para cada fago ensayado. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

| Fago                  | Control i                         |                                           |       |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|-------|
|                       | $k_{nph}$ [1/h]                   | $P_0$ [UFP/ml]                            | $R^2$ |
| <b>009-ML</b>         | $0,219 \pm 0,037$ <sup>ab</sup>   | $2,87 \pm 0,03 \times 10^4$ <sup>a</sup>  | 0,96  |
| <b>832-B1</b>         | $0,24 \pm 0,12$ <sup>ab</sup>     | $1,09 \pm 0,08 \times 10^6$ <sup>a</sup>  | 0,92  |
| <b>892-LB</b>         | $0,72 \pm 0,11$ <sup>cde</sup>    | $2,17 \pm 0,06 \times 10^4$ <sup>a</sup>  | 0,98  |
| <b>BYM</b>            | $0,582 \pm 0,26$ <sup>bcd</sup>   | $1,33 \pm 0,20 \times 10^6$ <sup>a</sup>  | 0,97  |
| <b>Cb1/204</b>        | $0,73 \pm 0,29$ <sup>de</sup>     | $3,50 \pm 0,38 \times 10^5$ <sup>a</sup>  | 0,96  |
| <b>lb<sub>3</sub></b> | $0,606 \pm 0,052$ <sup>bcd</sup>  | $4,27 \pm 0,15 \times 10^5$ <sup>a</sup>  | 0,99  |
| <b>J-1</b>            | $1,440 \pm 0,042$ <sup>f</sup>    | $1,93 \pm 0,03 \times 10^8$ <sup>e</sup>  | 0,99  |
| <b>MLC-A</b>          | $0,402 \pm 0,044$ <sup>abcd</sup> | $2,31 \pm 0,64 \times 10^8$ <sup>e</sup>  | 0,85  |
| <b>ATCC 8014-B1</b>   | $0,328 \pm 0,049$ <sup>abcd</sup> | $1,33 \pm 0,13 \times 10^8$ <sup>d</sup>  | 0,95  |
| <b>M1-G1b</b>         | $0,00 \pm 0,00$ <sup>a</sup>      | $7,14 \pm 0,57 \times 10^7$ <sup>bc</sup> | 0,98  |
| <b>M13-G1b</b>        | $1,0580 \pm 0,0085$ <sup>ef</sup> | $3,12 \pm 0,03 \times 10^7$ <sup>ab</sup> | 0,99  |
| <b>0BJ</b>            | $0,75 \pm 0,19$ <sup>de</sup>     | $3,64 \pm 0,52 \times 10^7$ <sup>ab</sup> | 0,97  |
| <b>Ln-9</b>           | $0,56 \pm 0,11$ <sup>bcd</sup>    | $1,16 \pm 0,59 \times 10^7$ <sup>a</sup>  | 0,55  |
| <b>LDG</b>            | $0,250 \pm 0,012$ <sup>abc</sup>  | $1,96 \pm 0,06 \times 10^8$ <sup>e</sup>  | 0,99  |
| <b>CHD</b>            | $1,42 \pm 0,14$ <sup>f</sup>      | $4,48 \pm 0,40 \times 10^7$ <sup>ab</sup> | 0,99  |
| <b>QF9</b>            | $1,95 \pm 0,37$ <sup>g</sup>      | $1,12 \pm 0,34 \times 10^8$ <sup>d</sup>  | 0,99  |

Las constantes fotocatalíticas  $k_{ph}$  fueron obtenidas por diferencia entre  $k_T$  y  $k_{nph}$  para cada fago, de acuerdo a la Ecuación (2.4) y se muestran en la Tabla 2.4. Esta constante representa exclusivamente el efecto fotocatalítico, sin tener en cuenta el fotoquímico. A pesar de que en la práctica ambos efectos contribuyen a la inactivación simultáneamente, es interesante estudiar los efectos por separado, para así poder analizar el impacto debido exclusivamente a la fotocatálisis en la inactivación fágica. Los valores obtenidos para  $k_{ph}$  se encontraron en el rango entre 6,79 1/h para el fago 892-LB y 0,05 1/h para el fago LDG (Tabla 2.4). Como en el caso de la constante aparente, el mayor valor de  $k_{ph}$  correspondió al fago más sensible a la fotocatálisis propiamente dicha. La Figura 2.10 muestra los fagos ordenados, en esta oportunidad, por sus valores de  $k_{ph}$  (inactivación fotocatalítica). Es remarcable que el fago 892-LB se encuentra al final de la fila en ambas secuencias (Figuras 2.9 y 2.10), lo que indica que fue el fago más sensible en ambos casos (al ser ordenado por  $k_T$  y  $k_{ph}$ ), mientras que el fago LDG se encontró primero en ambas secuencias, siendo el fago más resistente. Sin embargo, se observaron diferencias en la resistencia/sensibilidad de algunos fagos que mostraron valores de las constantes cinéticas intermedios, bajo efectos combinados (fotocatálisis + fotoquímica) o bajo efecto fotocatalítico únicamente, lo que se evidencia por el distinto ordenamiento de los fagos de acuerdo a su sensibilidad, presentados en las Figuras 2.9 y 2.10.

**Tabla 2.4.** Valores de las constantes cinética aparente total, no fotocatalítica y fotocatalítica para cada fago ensayado. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

| Fago            | $k_T$ [1/h]         | $k_{nph}$ [1/h]       | $k_{ph}$ [1/h]    |
|-----------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| 009-ML          | $6,061 \pm 0,072^b$ | $0,219 \pm 0,037^a$   | $5,842 \pm 0,081$ |
| 832-B1          | $2,53 \pm 0,46^b$   | $0,24 \pm 0,12^a$     | $2,29 \pm 0,48$   |
| 892-LB          | $7,52 \pm 0,18^b$   | $0,72 \pm 0,11^a$     | $6,79 \pm 0,21$   |
| BYM             | $2,97 \pm 0,16^b$   | $0,582 \pm 0,26^a$    | $2,39 \pm 0,31$   |
| Cb1/204         | $1,51 \pm 0,23^b$   | $0,73 \pm 0,29^a$     | $0,79 \pm 0,37$   |
| lb <sub>3</sub> | $1,43 \pm 0,42^b$   | $0,606 \pm 0,052^a$   | $0,82 \pm 0,42$   |
| J-1             | $3,30 \pm 0,30^b$   | $1,440 \pm 0,042^a$   | $1,86 \pm 0,30$   |
| MLC-A           | $0,579 \pm 0,071^b$ | $0,402 \pm 0,044^a$   | $0,177 \pm 0,084$ |
| ATCC 8014-B1    | $0,649 \pm 0,074^b$ | $0,328 \pm 0,049^a$   | $0,321 \pm 0,089$ |
| M1-G1b          | $1,47 \pm 0,15^b$   | $0,00 \pm 0,00^a$     | $1,47 \pm 0,15$   |
| M13-G1b         | $2,11 \pm 0,18^b$   | $1,0580 \pm 0,0085^a$ | $1,05 \pm 0,18$   |
| 0BJ             | $2,07 \pm 0,42^b$   | $0,75 \pm 0,19^a$     | $1,32 \pm 0,46$   |
| Ln-9            | $1,124 \pm 0,045^b$ | $0,56 \pm 0,11^a$     | $0,56 \pm 0,12$   |
| LDG             | $0,300 \pm 0,037^a$ | $0,250 \pm 0,012^a$   | $0,050 \pm 0,039$ |
| CHD             | $5,59 \pm 0,99^b$   | $1,42 \pm 0,14^a$     | $4,17 \pm 0,99$   |
| QF9             | $5,79 \pm 0,43^b$   | $1,95 \pm 0,37^a$     | $3,84 \pm 0,57$   |



**Figura 2.10.** Fagos ordenados en forma creciente según su sensibilidad fágica, de acuerdo a  $k_T$  en color rojo (efecto fotocatalítico + fotoquímico en conjunto) o a  $k_{ph}$  en color turquesa (efecto exclusivamente fotocatalítico).

Al realizar el análisis estadístico comparando  $k_T$  y  $k_{nph}$  para cada fago (Tabla 2.4) se puede observar que todos, a excepción del fago LDG, presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Como se mencionó previamente, para estos experimentos,  $k_{nph}$  representó el efecto fotoquímico. Por lo tanto, esto indica que la fotocatálisis (pintura + radiación) tiene un efecto significativo en la inactivación de los fagos, a excepción del fago LDG. Para este último fago, no se observaron diferencias significativas entre  $k_T$  y  $k_{nph}$ , por lo que se podría concluir que el efecto fotoquímico representa la principal fuente de inactivación en presencia de pintura y radiación (Tabla 2.4).

### 2.3.5. Cálculo de las eficiencias de inactivación fotocatalítica

Con el objetivo de comparar distintas estrategias de inactivación fotocatalítica, resulta de interés estimar las eficiencias de inactivación para cada fago, que relacionan la velocidad de inactivación fágica con el flujo de radiación incidente (eficiencia fotónica) o absorbido por el catalizador (eficiencia cuántica). Estos parámetros son útiles al momento de realizar una comparación con otros tratamientos de inactivación fotocatalíticos que utilizan otras configuraciones del dispositivo, con diferentes fuentes de radiación y con diferentes materiales fotoactivos.

Basándonos en las ecuaciones descriptas en la Sección 2.2.7.2 y con los datos obtenidos de los resultados ajustados en la Tabla 2.2, las eficiencias de inactivación fotocatalítica fotónica y cuántica fueron calculadas para los dieciséis fagos estudiados (Tabla 2.5). Se observa que las mayores eficiencias correspondieron al fago QF9 ( $4,06 \times 10^{12}$  UFP/Einstein para la eficiencia fotónica y  $9,17 \times 10^{12}$  UFP/Einstein para eficiencia cuántica), mientras que las eficiencias más bajas fueron evidenciadas para el fago Cb1/204 ( $3,00 \times 10^9$  UFP/Einstein para eficiencia fotónica y  $6,00 \times 10^9$  UFP/Einstein para eficiencia cuántica). Como se puede observar, estos resultados no se corresponden con aquellos obtenidos a través de las constantes de inactivación, los cuales indicaban que el fago 892-LB fue el más sensible y el fago LDG el más resistente. Sin embargo, se puede observar en la Tabla 2.4 que el fago QF9 también mostró un valor alto de  $k_T$  (5,79 1/h), lo que nos indica una marcada sensibilidad por parte de dicho fago y podría explicar su elevada eficiencia de inactivación. En cambio, el fago Cb1/204 pertenece al grupo de valores intermedios de  $k_T$  (1,51 1/h), lejano del valor correspondiente al fago LDG, el más resistente (0,3 1/h). Esto puede ser explicado analizando los distintos valores del parámetro  $P_0$  obtenidos para los diversos fagos. La concentración fágica inicial ( $P_0$ ) es utilizada en la Ecuación (2.11) para calcular la velocidad de inactivación fágica promedio, que luego permite calcular las eficiencias de inactivación (Ecuaciones 2.9 y 2.10). Experimentalmente, el valor de  $P_0$  cambia para los fagos estudiados, debido a cuestiones relacionadas a la técnica microbiológica de titulación en sí, pero principalmente a la imposibilidad de alcanzar títulos similares para todos los fagos luego de su propagación. En particular, algunos fagos no pudieron alcanzar títulos elevados cuando fueron propagados mientras que otros sí lo lograron. Además, hay que considerar la pérdida de infectividad que sufrieron algunos fagos debido al proceso de deposición y secado, que se mencionó previamente. Por esta razón, las concentraciones iniciales de fagos durante los ensayos de inactivación variaron en un amplio rango entre  $10^5$  y  $10^7$  UFP/ml dependiendo el fago, y esto influye directamente en el cálculo de las eficiencias de inactivación y las conclusiones derivadas a partir del análisis de los valores obtenidos.

Al realizar el análisis estadístico para los valores de  $P_0$  regresionados de los distintos fagos, se observó que existían diferencias significativas con un 95 % de nivel de confianza (Tabla 2.2). Como el valor de  $P_0$  está involucrado en el cálculo de las eficiencias (Ecuaciones 2.9 y 2.10), sería adecuado comparar únicamente las eficiencias entre los fagos que no presentaron diferencias significativas en sus valores de  $P_0$ , de modo que este valor no introduzca diferencias en el cálculo de las eficiencias.

**Tabla 2.5.** Eficiencias de inactivación fotónica y cuántica de los dieciséis fagos testeados en presencia de pintura fotocatalítica y radiación visible.

| <b>Fago</b>           | <b><math>\eta_{ph} \times 10^{-12}</math> [UFP/Einstein]</b> | <b><math>\eta_{qu} \times 10^{-12}</math> [UFP/Einstein]</b> |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>009-ML</b>         | 0,012                                                        | 0,026                                                        |
| <b>832-B1</b>         | 0,010                                                        | 0,022                                                        |
| <b>892-LB</b>         | 0,015                                                        | 0,034                                                        |
| <b>BYM</b>            | 0,028                                                        | 0,064                                                        |
| <b>Cb1/204</b>        | 0,003                                                        | 0,006                                                        |
| <b>Ib<sub>3</sub></b> | 0,003                                                        | 0,007                                                        |
| <b>J-1</b>            | 2,617                                                        | 5,904                                                        |
| <b>MLC-A</b>          | 0,365                                                        | 0,823                                                        |
| <b>ATCC 8014-B1</b>   | 0,261                                                        | 0,589                                                        |
| <b>M1-G1b</b>         | 0,355                                                        | 0,800                                                        |
| <b>M13-G1b</b>        | 0,297                                                        | 0,669                                                        |
| <b>0BJ</b>            | 0,374                                                        | 0,843                                                        |
| <b>Ln-9</b>           | 0,156                                                        | 0,352                                                        |
| <b>LDG</b>            | 0,138                                                        | 0,311                                                        |
| <b>CHD</b>            | 1,570                                                        | 3,541                                                        |
| <b>QF9</b>            | 4,063                                                        | 9,167                                                        |

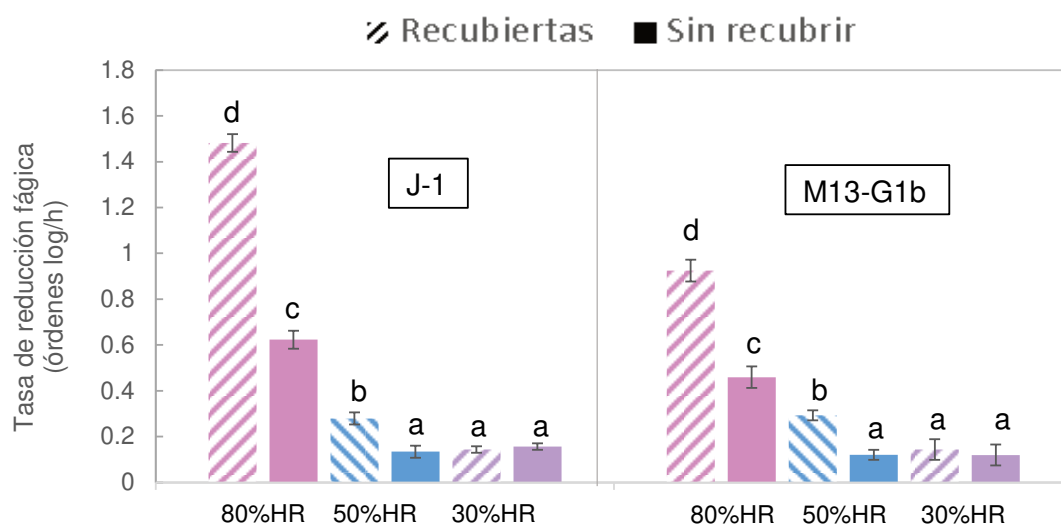
### 2.3.6. Ensayos de inactivación fágica variando condiciones ambientales y fuentes de radiación

#### 2.3.6.1. Influencia de humedad relativa del ambiente

Como se mencionó anteriormente, los fagos J-1 y M13-G1b fueron seleccionados para estudiar la influencia de diversas condiciones sobre las tasas de reducción fágica utilizando la pintura fotocatalítica, debido a sus tasas de inactivación de valor intermedio evidenciadas por los mismos al ser ensayados junto al resto de los dieciséis fagos, en condiciones de 80 % HR y 100 % de radiación. Además, a través del análisis estadístico que se muestra en la Tabla 2.2, se puede observar que los fagos J-1 y M13-G1b presentaron diferencias significativas en sus valores de  $k_T$ , con un 95 % de nivel de confianza.

Se investigó la inactivación de los fagos mencionados ensayando distintos niveles de humedad relativa (30, 50 y 80 %), con un 100 % de radiación visible incidente. Se tomaron muestras a distintos tiempos, determinando el título. Luego, considerando el título del último punto testado, el título inicial y el tiempo total de muestreo, se calculó

la tasa de reducción fágica (órdenes log/h) que se presenta en la Figura 2.11. Como puede observarse la mayor tasa de reducción en el título fágico se obtuvo trabajando con el mayor nivel de humedad relativa (80 %), siendo 1,48 órdenes log/h para el fago J-1 y 0,92 órdenes log/h para el fago M13-G1b. Para un nivel de 50 % HR, la tasa de reducción de los títulos fue menor que para una humedad del 80 %, esto es 0,28 órdenes log/h para el fago J-1 y 0,29 órdenes log/h para M13-G1b. Finalmente, trabajando con el menor nivel de humedad relativa (30 %) se obtuvo la menor tasa de reducción fágica, siendo de 0,14 órdenes log/h para ambos fagos. En este caso, sin embargo, la reducción en la tasa de inactivación comparada a la obtenida con 50 % HR fue menos pronunciada que cuando la humedad relativa disminuyó de 80 a 50 %. Es decir que, a medida que la humedad relativa del ambiente aumentó, la tasa de reducción fágica [órdenes log/h] se incrementó también, especialmente para los valores elevados de humedad relativa testeados.



**Figura 2.11.** Tasas de reducción fágica [órdenes log/h] obtenidas para los fagos J-1 y M13-G1b en presencia de radiación visible y placas sin recubrir (barras sólidas) o recubiertas con pintura fotocatalítica (barras rayadas), variando la humedad relativa (HR, 30 – 80 %), bajo 100 % de radiación. Letras distintas en un mismo recuadro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Se observaron resultados similares cuando los fagos fueron testeados sobre placas sin recubrir con la pintura en presencia de 100 % de flujo de radiación visible y variando la humedad relativa en los tres niveles mencionados. De manera similar, a medida que la humedad relativa disminuyó, la velocidad de inactivación fágica fue también menor. En este caso, trabajando con el máximo nivel de humedad relativa, ambos fagos alcanzaron su mayor tasa de reducción fágica, esto es 0,62 órdenes log/h (fago J-1) y 0,46 órdenes log/h (fago M13-G1b). Por el contrario, a una humedad relativa

del 30 %, los fagos presentaron su menor tasa de reducción, siendo de 0,12 órdenes log/h para ambos fagos. Finalmente, cuando el nivel de humedad relativa fue del 50 %, se observó una tasa de reducción de la infectividad fágica intermedia, con valores de 0,13 órdenes log/h para el fago J-1 y 0,16 órdenes log/h para M13-G1b.

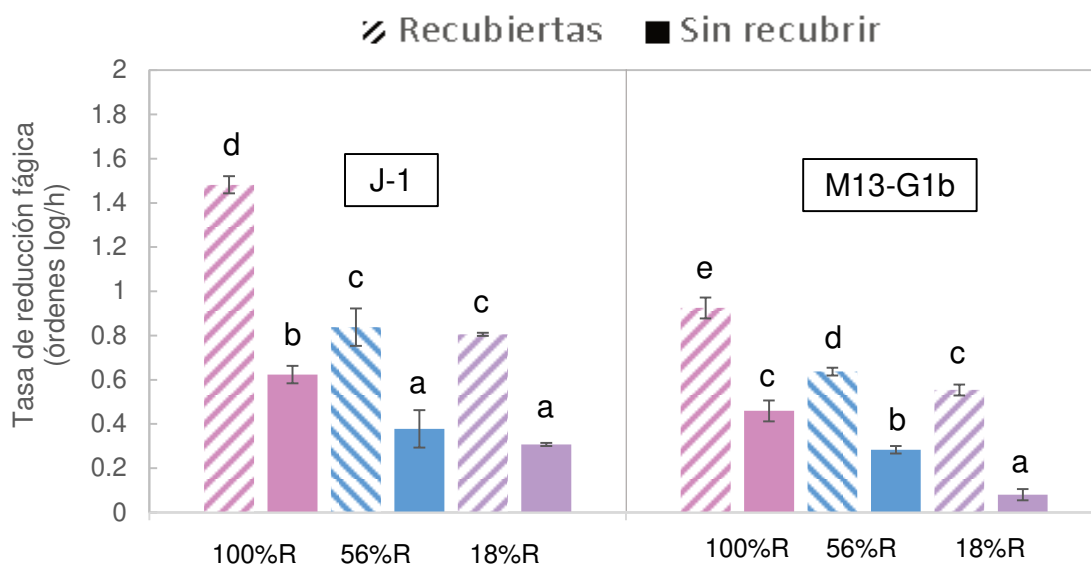
Como se expuso anteriormente en la Sección 2.3.3, no se observó pérdida en la infectividad para ninguno de los dos fagos cuando los mismos fueron ensayados sobre placas recubiertas con la pintura en ausencia de radiación (Control ii) ni en ausencia de pintura y radiación (Control iii) (0 % R, 80 % HR). Esto demuestra que no se produce inactivación fágica si no hay fuente de radiación en el sistema estudiado e indicando también que las reducciones en los títulos observados en ausencia de pintura y presencia de radiación (Control i) corresponden, como ya se mencionó, a un proceso fotoquímico.

El análisis estadístico que se muestra en la Figura 2.11, realizado para cada fago de manera individual en todas las condiciones, demostró diferencias significativas entre todos los niveles de humedad relativa ensayados en el proceso fotocatalítico con un 95 % de nivel de confianza para ambos fagos. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre los niveles 50 y 30 % HR para el proceso fotoquímico, con un 95 % de nivel de confianza. Más aún, se observaron diferencias significativas entre los procesos fotoquímico y fotocatalítico a humedades relativas de 80 y 50 %, considerando un  $p < 0,05$ , a diferencia de la HR de 30 %, analizando las distintas condiciones para cada fago por separado. Estos resultados indican que la humedad relativa es un factor significativo en la tasa de reducción fágica, tanto fotoquímica como fotocatalítica, principalmente a valores de humedad relativa elevados.

Comparando ambos fagos entre sí, se puede observar que, trabajando al mayor nivel de humedad relativa, la tasa de reducción del fago J-1 fue mayor que la del fago M13-G1b, tanto en presencia como ausencia de pinturas, lo que nos indicaría una mayor sensibilidad del fago J-1. Al analizar el siguiente nivel de humedad relativa (50 %), tanto en presencia como en ausencia de pinturas, la tendencia se revierte y el fago M13-G1b fue el que presentó tasas de reducción ligeramente mayores. Finalmente, al analizar el menor nivel de humedad relativa ensayado (30 %) se observaron tasas de reducción similares para ambos fagos. Por lo tanto, a humedades relativas bajas los fagos prácticamente no presentaron diferencias en sus tasas de reducción, y la sensibilidad del fago J-1 en presencia de la pintura fotocatalítica, aumentó con la humedad relativa del ambiente, comparada con la del fago M13-G1b.

### 2.3.6.2. Influencia del flujo de radiación

Se estudió la inactivación fágica utilizando radiación visible en presencia y ausencia de pintura fotocatalítica, evaluando diferentes flujos de radiación (18, 56 y 100 %) y con 80 % de HR, realizando el mismo análisis de los resultados que para la sección anterior. En la Figura 2.4 se observa la transmitancia a distintas longitudes de onda para los diferentes filtros empleados, mediante los cuales se logró variar el flujo de radiación que llega a la placa donde la suspensión fágica está depositada. La tasa de reducción fágica para los distintos flujos es presentada en la Figura 2.12. Según lo esperado, ambos fagos alcanzaron su mayor tasa de reducción (1,48 órdenes log/h para el fago J-1 y 0,92 órdenes log/h para el fago M13-G1b) al trabajar con el mayor nivel de radiación ensayado (100 %). Por el contrario, al evaluar el nivel de radiación más bajo (18 %), los fagos alcanzaron su menor tasa de reducción, siendo 0,80 órdenes log/h para el fago J-1 y 0,55 órdenes log/h para M13-G1b. En presencia de un nivel de radiación del 56 %, se obtuvo una tasa intermedia que resultó de 0,84 órdenes log/h para el fago J-1 y de 0,64 órdenes log/h para M13-G1b.



**Figura 2.12.** Tasas de reducción fágica [órdenes log/h] obtenidas para los fagos J-1 y M13-G1b en presencia de radiación visible y placas sin recubrir (barras sólidas) o recubiertas con pintura fotocatalítica (barras rayadas), variando el flujo de radiación incidente (R, 18 – 100 %) a 80 % HR. Letras distintas en un mismo recuadro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Un comportamiento similar se observó cuando los fagos fueron depositados sobre placas sin recubrir con la pintura y en presencia de los diversos flujos de radiación antes mencionados. En este sentido, a medida que el flujo de radiación disminuyó, la tasa de reducción fágica fue también menor. Cuando se trabajó con el mínimo flujo de

radiación (18 %), se alcanzaron tasas de 0,31 órdenes log/h para el fago J-1 y de 0,08 órdenes log/h para M13-G1b. Por el contrario, un flujo de radiación del 100 % condujo a las mayores tasas de reducción fágica, siendo las mismas de 0,62 órdenes log/h para el fago J-1 y 0,46 órdenes log/h para M13-G1b. Finalmente, cuando el nivel de radiación fue del 56 %, se observó una tasa intermedia, de 0,38 órdenes log/h para el fago J-1 y de 0,28 órdenes log/h para M13-G1b.

Se puede observar que, en todas las condiciones de flujo testeadas, el fago J-1 presentó una tasa de reducción fágica mayor a la del fago M13-G1b, tanto en presencia como ausencia de pinturas. Esto nos indicaría una mayor sensibilidad por parte del fago J-1 al compararlo con el fago M13-G1b.

A partir de la Figura 2.12, se puede observar que el fago J-1 presentó diferencias significativas entre el nivel de 100 % de radiación y los dos niveles restantes al analizar las tasas de reducción fágica obtenidas a partir de los ensayos en presencia de pintura fotocatalítica (barras rayadas), con un 95 % de nivel de confianza. Lo mismo se observó para los resultados del Control i (radiación en ausencia de pintura, barras sólidas), ya que se observaron diferencias significativas en el nivel de 100 % de radiación al compararlo con los resultados de 56 y 18 % de radiación. Esto nos indica que para el fago J-1 el efecto del flujo de radiación es significativo al aumentar desde un flujo intermedio a alto, tanto para los ensayos con pintura fotocatalítica como para los del Control i, no siendo así, en ninguno de los dos ensayos, al pasar de flujos de radiación bajos a intermedios.

Por otro lado, el fago M13-G1b presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las tasas de reducción fágica para todos los niveles de radiación estudiados, tanto para los ensayos con pintura fotocatalítica (barras rayadas) como para los ensayos del Control i (radiación sin pintura fotocatalítica, barras sólidas). Estos resultados nos muestran nuevamente el comportamiento fago-dependiente, ya que para el fago M13-G1b el efecto del flujo de radiación es significativo en todos los niveles de radiación estudiados, con un 95 % de nivel de confianza.

Finalmente, se observaron diferencias significativas con un 95 % de nivel de confianza para ambos fagos al comparar las tasas de reducción fágica obtenidas en presencia y ausencia de la pintura fotocatalítica para un mismo nivel de radiación, en todos los niveles testeados. Esto resalta la mejora obtenida en la inactivación fágica en presencia de la pintura fotocatalítica, al compararla con los ensayos de radiación sin pintura.

Estos resultados indican que el flujo de radiación es un factor significativo en la tasa de reducción fágica, tanto fotoquímica como fotocatalítica, con mayor influencia en los niveles altos de radiación para el fago J-1.

### 2.3.6.3. Influencia de la fuente de radiación

Los fagos J-1 y M13-G1b fueron depositados sobre placas recubiertas con pintura y sometidos a radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm) y se calcularon las tasas de reducción fágica.

Posteriormente se calcularon las constantes de inactivación y las eficiencias de inactivación fotónica y cuántica obtenidas trabajando en estas condiciones a fin de compararlas con las calculadas previamente en presencia de radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm), con el objetivo de conocer la influencia de diversas fuentes de radiación en la inactivación fotocatalítica de los fagos. La distribución espectral de emisión de las lámparas fluorescentes y UV-A se muestran en la Figura 2.4 y los flujos de radiación se reportan en la Sección 2.3.2.

Como se puede observar en la Tabla 2.6, las tasas de reducción fágica obtenidas para ambos fagos trabajando en presencia de pinturas y radiación resultaron mayores en presencia de radiación UV-A, siendo de 2,51 y 1,99 órdenes log/h para los fagos J-1 y M13-G1b, respectivamente, mientras que dichas tasas bajo radiación visible tomaron valores de 1,48 y 0,92 órdenes log/h para los fagos J-1 y M13-G1b, respectivamente. Esto nos indica que las reducciones en la infectividad en presencia de radiación UV-A fueron 1,70 (fago J-1) y 2,16 veces (fago M13-G1b) mayores a las obtenidas en presencia de radiación visible.

Al realizar el análisis estadístico para comparar las tasas de reducción fágica logradas en los ensayos con placas recubiertas con las distintas fuentes de radiación y 100 % R, se observaron diferencias significativas entre las dos fuentes de radiación para ambos fagos, con un 95 % de nivel de confianza (Tabla 2.6).

Para ambos fagos, las constantes de inactivación aparente calculadas con la fuente de radiación UV-A (5,37 1/h para el fago J-1 y 4,92 1/h para el fago M13-G1b) fueron mayores que las obtenidas para la radiación típica de ambientes interiores (VIS,  $\lambda = 360 - 720$  nm) (3,30 1/h para el fago J-1 y 2,11 1/h para el fago M13-G1b), en concordancia con lo observado analizando las tasas de reducción fágica. Como se explicó anteriormente, un mayor valor de la constante aparente de inactivación indica una mayor reducción logarítmica por unidad de tiempo. Por lo que, para ambos fagos, se observó una inactivación fágica más rápida, empleando las pinturas bajo radiación UV-A. Para el fago J-1, el valor de  $k_T$  obtenido en presencia de radiación UV-A fue 1,63 veces mayor que el obtenido al trabajar con radiación visible, mientras que para el fago M13-G1b, el valor de  $k_T$  obtenido en presencia de radiación UV-A fue 2,33 veces mayor que el obtenido al trabajar con radiación visible.

**Tabla 2.6.** Tasas de reducción fágica, títulos iniciales, constantes de inactivación, eficiencias de inactivación fotocatalítica fotónica y cuántica calculadas para las placas recubiertas con pintura bajo fuentes de radiación UV-A y VIS, para los fagos J-1 y M13-G1b (HR = 80 %, R = 100 %). Letras distintas en una misma fila de tasa de reducción fágica indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

|         |                                                     | UV-A                  | VIS                   |
|---------|-----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| J-1     | <b>Tasa de reducción fágica<br/>[órdenes log/h]</b> | $2,519 \pm 0,012^a$   | $1,482 \pm 0,014^b$   |
|         | $P_o$ [UFP/ml]                                      | $1,05 \times 10^7$    | $1,07 \times 10^8$    |
|         | $k_T$ [1/h]                                         | $5,37 \pm 0,85$       | $3,30 \pm 0,26$       |
|         | $R^2$                                               | 0,97                  | 0,99                  |
|         | $\eta_{ph}$ [UFP/Einstein]                          | $8,03 \times 10^{12}$ | $2,62 \times 10^{12}$ |
|         | $\eta_{qu}$ [UFP/Einstein]                          | $1,19 \times 10^{13}$ | $5,90 \times 10^{12}$ |
| M13-G1b | <b>Tasa de reducción fágica<br/>[órdenes log/h]</b> | $1,992 \pm 0,046^a$   | $0,924 \pm 0,047^b$   |
|         | $P_o$ [UFP/ml]                                      | $5,30 \times 10^6$    | $1,62 \times 10^7$    |
|         | $k_T$ [1/h]                                         | $4,92 \pm 0,10$       | $2,11 \pm 0,17$       |
|         | $R^2$                                               | 0,95                  | 0,99                  |
|         | $\eta_{ph}$ [UFP/Einstein]                          | $4,05 \times 10^{12}$ | $2,97 \times 10^{11}$ |
|         | $\eta_{qu}$ [UFP/Einstein]                          | $6,03 \times 10^{12}$ | $6,69 \times 10^{11}$ |

Este comportamiento puede explicarse considerando que la fracción de radiación absorbida por el  $\text{TiO}_2$  es mayor en el rango de longitud de onda correspondiente al UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm, Figura 2.4) generando una mayor cantidad de cargas en la superficie del semiconductor y aumentando su poder oxidante. Esto nos indica que, al utilizar las pinturas bajo radiación UV-A, la inactivación fágica será mayor (reducción logarítmica mayor) y más rápida (mayor  $k_T$ ).

Analizando los parámetros de la Tabla 2.6 ( $k_T$  y reducciones) se observa que, al cambiar la fuente de radiación a UV-A, el fago J-1 continúa presentando la mayor sensibilidad al tratamiento con pintura fotocatalítica y radiación al compararlo con el fago M13-G1b.

Cuando se compararon las eficiencias para ambos sistemas de iluminación, se pudo observar que las eficiencias fotónicas obtenidas trabajando con radiación UV-A fueron  $8,03 \times 10^{12}$  y  $4,05 \times 10^{12}$  UFP/Einstein para los fagos J-1 y M13-G1b respectivamente, mientras que dichas eficiencias bajo radiación visible fueron de  $2,62 \times 10^{12}$  y  $2,97 \times 10^{11}$  UFP/Einstein para los fagos J-1 y M13-G1b, respectivamente. Esto nos indica que las eficiencias fotónicas obtenidas trabajando con radiación UV-A fueron 3,06 (J-1) y 13,64 (M13-G1b) veces mayores que aquellas calculadas con la radiación típica de ambientes interiores. Por otro lado, las eficiencias cuánticas obtenidas bajo radiación UV-A fueron  $1,19 \times 10^{13}$  y  $6,03 \times 10^{12}$  UFP/Einstein para los fagos J-1 y M13-G1b respectivamente, mientras que dichas eficiencias bajo radiación visible fueron de

$5,90 \times 10^{12}$  y  $6,69 \times 10^{11}$  UFP/Einstein para los fagos J-1 y M13-G1b, respectivamente. En este caso, trabajando con radiación UV-A fueron 2,02 (J-1) y 9,01 (M13-G1b) veces mayores que aquellas calculadas bajo radiación visible (Tabla 2.6).

Al igual que en las experiencias anteriores, se realizaron los ensayos del Control i, ya que los Controles ii y iii al ser en oscuridad no provocarían pérdida de infectividad, de acuerdo a los resultados obtenidos y discutidos anteriormente. La Tabla 2.7 muestra los resultados obtenidos para el Control i, empleando ambas fuentes de radiación en ausencia de pinturas. En este caso se observa que las tasas de reducción obtenidas para ambos fagos resultaron mayores en presencia de radiación UV-A, siendo de 1,15 y 1,07 órdenes log/h para los fagos J-1 y M13-G1b, respectivamente, mientras que dichas tasas bajo radiación visible tomaron valores de 0,60 y 0,46 órdenes log/h para los fagos J-1 y M13-G1b, respectivamente. Esto nos indica que las reducciones en la infectividad en presencia de radiación UV-A fueron 1,92 (fago J-1) y 2,33 veces (fago M13-G1b) mayores a las obtenidas en presencia de radiación visible.

Los análisis estadísticos para los ensayos con radiación sin pintura (Control i) arrojaron las mismas conclusiones que para los ensayos fotocatalíticos, ya que se observaron diferencias significativas entre las tasas de reducción fágica obtenidas con las distintas fuentes de radiación, para cada fago por separado, con un 95 % de nivel de confianza (Tabla 2.7).

**Tabla 2.7.** Tasas de reducción fágica, títulos iniciales y constantes de inactivación para placas sin recubrir bajo fuentes de radiación UV-A y VIS, para los fagos J-1 y M13-G1b (HR = 80 %, R = 100 %). Letras distintas en una misma fila de tasa reducción fágica indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

|         |                                                 | UV-A                | VIS                   |
|---------|-------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| J-1     | <b>Tasa de reducción fágica [órdenes log/h]</b> | $1,145 \pm 0,035^a$ | $0,600 \pm 0,028^b$   |
|         | $P_o$ [UFP/ml]                                  | $1,05 \times 10^7$  | $1,07 \times 10^8$    |
|         | $k_T$ [1/h]                                     | $2,561 \pm 0,011$   | $1,44 \pm 0,12$       |
|         | $R^2$                                           | 0,96                | 0,99                  |
| M13-G1b | <b>Tasa de reducción fágica [órdenes log/h]</b> | $1,065 \pm 0,035^a$ | $0,4550 \pm 0,0071^b$ |
|         | $P_o$ [UFP/ml]                                  | $5,30 \times 10^6$  | $1,62 \times 10^7$    |
|         | $k_T$ [1/h]                                     | $2,540 \pm 0,020$   | $1,058 \pm 0,085$     |
|         | $R^2$                                           | 0,99                | 0,99                  |

Para ambos fagos, las constantes de inactivación aparente calculadas con la fuente de radiación UV-A (2,56 1/h para el fago J-1 y 2,54 1/h para el fago M13-G1b) fueron mayores que las obtenidas para la radiación típica de ambientes interiores (VIS,  $\lambda = 360 - 720$  nm) (1,44 1/h para el fago J-1 y 1,058 1/h para el fago M13-G1b), en concordancia con lo observado analizando las tasas de reducción fágica. Al igual que

en presencia de pintura fotocatalítica, se observó una inactivación fágica más rápida bajo radiación UV-A para ambos fagos. Para el fago J-1, el valor de  $k_T$  obtenido en presencia de radiación UV-A fue 1,77 veces mayor que el obtenido al trabajar con radiación visible, mientras que para el fago M13-G1b, el valor de  $k_T$  obtenido en presencia de radiación UV-A fue 2,40 veces mayor que el obtenido al trabajar con radiación visible.

En la Tabla 2.7, a diferencia de la Tabla 2.6, no se presentan valores de eficiencia fotocatalítica fotónica ni cuántica, ya que los ensayos del Control i se realizaron sobre placas sin recubrir, es decir que no hay presencia de catalizador para el cual calcular dichas eficiencias.

### 2.3.7. Modelo cinético empírico

Los datos experimentales obtenidos para los fagos J-1 y M13-G1b trabajando con diversas condiciones ambientales fueron ajustados con el modelo cinético propuesto en la Ecuación (2.22), el cual considera el efecto de la humedad relativa y del flujo de radiación incidente en la inactivación fágica. La Tabla 2.8 muestra los parámetros del modelo cinético ajustados con un método de regresión no lineal para ambos fagos ensayados bajo radiación visible, para placas cubiertas y sin recubrir con la pintura.

El parámetro cinético  $k_1$  es una constante de proporcionalidad pre-potencial, con unidades de  $[\text{cm}^2 \text{k}_2 \text{s}^{\text{k}_2} \text{Einstein}^{-\text{k}_2} \text{h}^{-1}]$ , mientras que el parámetro cinético  $k_2$  representa el orden de la velocidad de reacción, teniendo en cuenta el flujo de radiación incidente. Los valores reportados de estos parámetros se muestran en la Tabla 2.8. Se puede observar que, trabajando con placas recubiertas, el orden de reacción para ambos fagos fue similar y significativamente menor a 1.

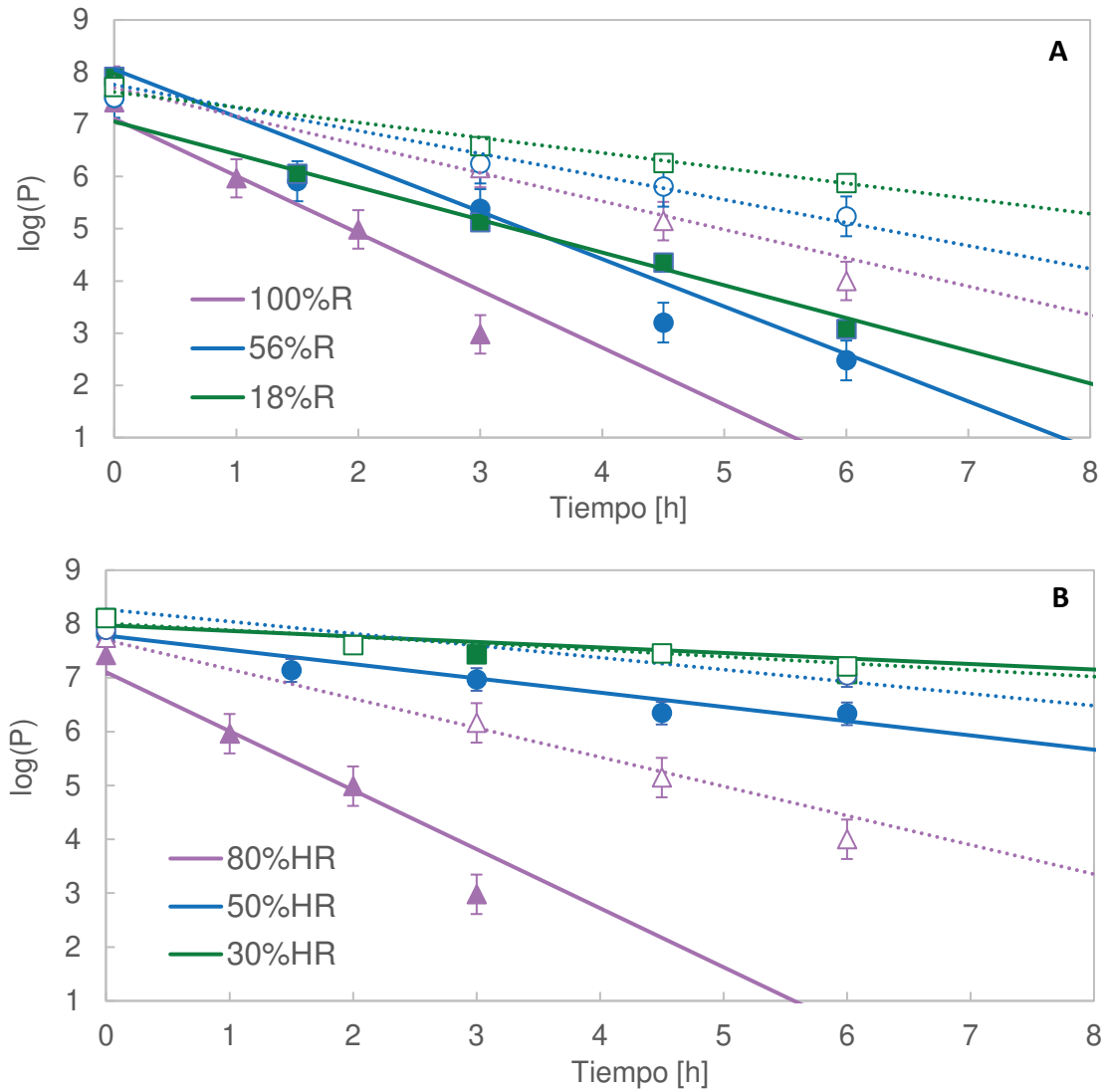
**Tabla 2.8.** Parámetros cinéticos estimados a partir del ajuste de un modelo empírico a los datos experimentales, mediante la minimización del error cuadrático medio (RMSE), para ensayos realizados con placas sin recubrir y recubiertas con pintura fotocatalítica bajo radiación visible, para ambos fagos.

|                                                                                                  | J-1                   |                       | M13-G1b               |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                                                                  | Sin recubrir          | Recubiertas           | Sin recubrir          | Recubiertas           |
| $k_1 [\text{cm}^2 \text{k}_2 \text{s}^{\text{k}_2} \text{Einstein}^{-\text{k}_2} \text{h}^{-1}]$ | $3,52 \times 10^4$    | $2,71 \times 10^4$    | $2,33 \times 10^7$    | $3,74 \times 10^{17}$ |
| $k_2 [-]$                                                                                        | 0,36                  | 0,33                  | 0,82                  | 0,27                  |
| $k_3 [\text{mol cm}^{-3}]$                                                                       | $2,77 \times 10^{-3}$ | $2,00 \times 10^{-3}$ | $2,77 \times 10^{-3}$ | $1,31 \times 10^{-2}$ |
| $k_4 [\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}]$                                                              | $2,47 \times 10^3$    | $3,95 \times 10^3$    | $2,30 \times 10^3$    | $2,94 \times 10^3$    |
| RMSE [%]                                                                                         | 1,90                  | 6,12                  | 2,59                  | 3,16                  |
| Total RMSE [%]                                                                                   | 4,43                  |                       | 2,98                  |                       |

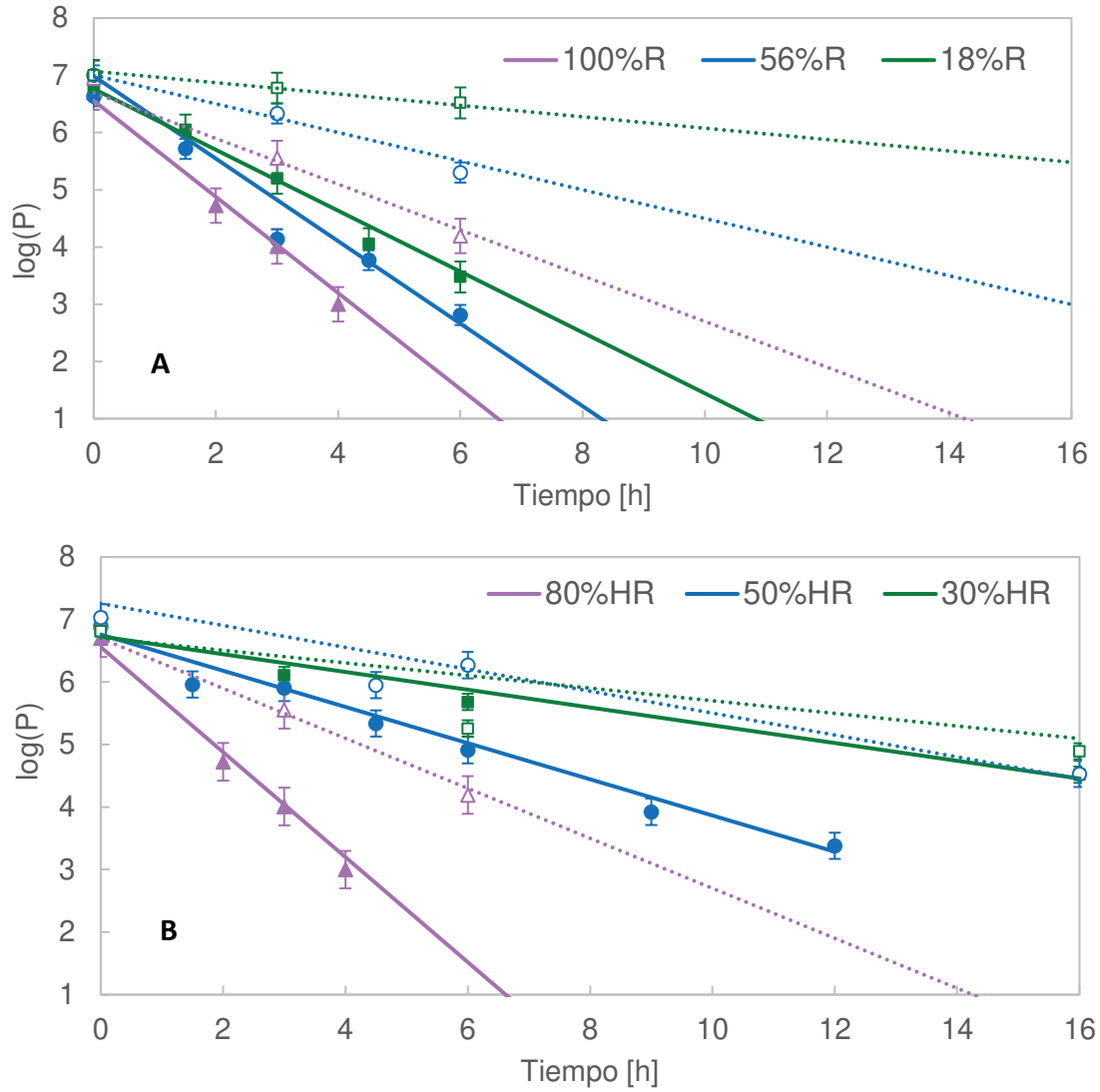
Analizando los otros parámetros del modelo,  $k_3$  representa el punto medio y  $k_4$  la pendiente de la curva de la función logística que considera el efecto de la concentración de agua en el ambiente. Para todas las situaciones, el orden de magnitud de estos parámetros resultó similar. Sin embargo, al entrar en juego el proceso fotocatalítico,  $k_4$  fue mayor para ambos fagos, lo que indicaría que, si bien la tasa de inactivación aumentó para ambos fagos cuando se incrementó la humedad relativa, este aumento fue mayor en los ensayos con las placas recubiertas con pintura fotocatalítica.

Los valores de RMSE fueron calculados y analizados para verificar la bondad del ajuste del modelo propuesto y son reportados en la Tabla 2.8. Se observó un buen ajuste entre los datos experimentales y las predicciones del modelo para placas sin recubrir y recubiertas, alcanzando valores promedios de RMSE para todas las condiciones ensayadas de 4,43 % para el fago J-1 y 2,98 % para el fago M13-G1b.

Una vez que el modelo cinético fue ajustado a los datos experimentales, ambos comportamientos fueron graficados para mostrar el ajuste de manera visual. La Figura 2.13 muestra la concentración del fago J-1 como función del tiempo ( $\log(P)$  vs. tiempo, con  $P$  en [UFP/ml]), para ensayos con placas recubiertas con la pintura (símbolos rellenos) y sin recubrir (símbolos vacíos); variando el flujo de radiación visible incidente (80 % HR, gráfica A) y la humedad relativa (100 % flujo de radiación, gráfica B), junto a la predicción del modelo cinético propuesto (líneas continuas para los ensayos fotocatalíticos y punteadas para los ensayos fotoquímicos). De la misma manera, la Figura 2.14 muestra la concentración del fago M13-G1b como función del tiempo y su ajuste con el modelo cinético, variando el flujo de radiación visible incidente (80 % HR, gráfica A) y la humedad relativa (100 % flujo de radiación, gráfica B). En estas figuras se puede observar el muy buen ajuste del modelo cinético propuesto a los datos experimentales de ambos fagos estudiados. Esto resulta prometedor, ya que el modelo propuesto permitiría predecir la inactivación fágica en diversas condiciones, como así también optimizar y escalar el proceso, facilitando un diseño más eficiente del tratamiento de inactivación fágica.



**Figura 2.13.** Concentración del fago J-1 en función del tiempo ( $\log(P)$  vs. tiempo, con  $P$  en [UFP/ml], símbolos), ajustando con el modelo cinético propuesto (líneas), para ensayos con placas recubiertas con la pintura fotocatalítica (símbolos rellenos, línea continua) y sin recubrir (símbolos vacíos, línea punteada); variando: A) el flujo de radiación visible incidente (80 % HR) y la B) humedad relativa (100 % R).



**Figura 2.14.** Concentración del fago M13-G1b en función del tiempo ( $\log(P)$  vs. tiempo, con  $P$  en [UFP/ml], símbolos), ajustando con el modelo cinético propuesto (líneas), para ensayos con placas recubiertas con la pintura fotocatalítica (símbolos rellenos, línea continua) y sin recubrir (símbolos vacíos, línea punteada); variando: A) el flujo de radiación visible incidente (80 % HR) y B) la humedad relativa (100 % R).

## **2.4. Discusión**

Se estudió la inactivación de dieciséis fagos de bacterias lácticas mediante la aplicación de una pintura fotocatalítica formulada en el INTEC con dióxido de titanio anatasa dopado con carbono como catalizador y sometida a radiación visible ( $\lambda = 360 - 720$  nm), típica de ambientes interiores, durante un tiempo total de 20 h. A partir de los resultados obtenidos, se calcularon las tasas de reducción fágica para cada fago según el tratamiento aplicado, así como también las constantes de inactivación y las eficiencias fotocatalíticas de inactivación fotónicas y cuánticas, tanto en los ensayos fotocatalíticos (pintura + radiación) como en el ensayo conducido en presencia de radiación y ausencia de pintura (Control i).

En primer lugar, hay que considerar que los títulos iniciales al comienzo del experimento para los fagos 832-B1, 892-LB, 009-ML, BYM, Ib<sub>3</sub> y Cb1/204 resultaron bajos (entre  $3,1 \times 10^4$  y  $3,8 \times 10^5$  UFP/ml), debido que no fue posible alcanzar altas concentraciones virales durante su propagación, a la dilución decimal realizada en agua destilada para remover los compuestos orgánicos que podrían interferir con el proceso de inactivación y a la pérdida de infectividad evidenciada a causa del proceso de deposición y secado. En concordancia con estos resultados, Hudson et al. (2009) reportaron pérdida en la infectividad de hasta 1 orden log al depositar y secar virus humanos tales como Adenovirus, Influenza y el virus del Herpes.

Cuando los fagos de bacterias lácticas fueron tratados con la pintura en presencia de radiación se observaron tasas de reducción fágica variables entre 0,12 y 3,03 órdenes log/h. En particular, se observó que las tasas obtenidas en los ensayos del Control i representaron aproximadamente el 50 % de las reducciones fágicas alcanzadas en presencia de pintura y radiación para los fagos J-1, M13-G1b y ATCC 8014-B1. Debido a que no se observó variación en la concentración fágica al realizar los ensayos Control ii y Control iii, se puede concluir que el ensayo Control i en realidad sería un control fotoquímico, donde el único factor presente en estos ensayos que induce la inactivación fágica es la radiación. Teniendo en cuenta estos resultados, sería esperable que los fagos presentes en superficies pierdan naturalmente parte de su infectividad en distintos niveles (por el comportamiento fago-dependiente) debido exclusivamente a la presencia de la radiación proveniente del sistema de iluminación propio de la planta, aunque este proceso posiblemente pueda demandar tiempos elevados. Este efecto fue aún más evidente para los fagos MLC-A y LDG ya que la reducción obtenida en la infectividad de ambos fagos durante los ensayos del Control i representó más del 70 y 90 %, respectivamente, de la reducción total obtenida en presencia de pintura. Esto indica que la inactivación de estos dos fagos se produciría

mayormente debido a la radiación en un proceso fotoquímico, siendo menor el efecto a causa de a la fotocatálisis (radiación con pintura fotocatalítica). Las tasas de reducción de estos dos fagos y del fago ATCC 8014-B1 fueron las menores entre los dieciséis fagos estudiados cuando se aplicó la pintura en presencia de radiación, por lo cual estos tres fagos podrían demostrar mayor resistencia frente a condiciones ambientales y persistir en el ambiente por periodos mayores de tiempo.

#### 2.4.1. Comparación con otras tecnologías

En trabajos previos del grupo se ha estudiado la inactivación de algunos de los fagos estudiados en la presente tesis, bajo distintas tecnologías de inactivación. Analizando estos resultados, es posible comparar los distintos parámetros relativos a la inactivación para concluir cuáles serían las tecnologías más adecuadas para la inactivación fágica. Para ello, en primer lugar, es necesario interpretar estos parámetros.

En primer lugar, la constante de inactivación aparente ( $k$ ) es un parámetro intrínseco de la inactivación, ya que no depende del tiempo de tratamiento ni de la concentración inicial del fago. Por otro lado, la constante sí depende del fago a inactivar, de la humedad relativa y del flujo de radiación, como se observó a partir del modelo propuesto en la Sección 2.2.8.3 (Ecuación 2.22).

En cuanto a las tasas de reducción fágica, este parámetro nos indica la relación entre la reducción en órdenes log entre el punto inicial y el último punto de la curva de inactivación y el período de tiempo en el cual se alcanzó dicha reducción. Este parámetro debería ser similar a la constante de inactivación, ya que se calculan de forma semejante, pero para calcular las tasas de reducción fágica solamente se emplean dos puntos experimentales (puntos inicial y final de la curva de inactivación), por lo que este parámetro presenta errores asociados a la sensibilidad del método analítico, mientras que las constantes de inactivación se obtienen ajustando la cinética de muchos puntos y presentan un error menor.

Por otro lado, el  $t_{99}$  es un parámetro que representa el tiempo necesario para reducir la infectividad del fago en un 99 % (2 órdenes log). Por lo tanto, se calcula a partir de la primera porción de la curva de inactivación. Como no se posee una gran cantidad de puntos experimentales en esta zona, puede presentar un cierto error. Por definición, este parámetro debería presentar un comportamiento inverso al de  $k$ , ya que, frente a una mayor tasa de inactivación, el tiempo necesario para alcanzar una determinada reducción logarítmica será menor.

Finalmente, las eficiencias son un parámetro útil para comparar con otros sistemas, por ejemplo, en casos con distinto flujo de radiación (eficiencia fotónica) o materiales fotocatalíticos con distintas absorbancias (eficiencia cuántica). Al ser

calculado a partir de una velocidad aparente de inactivación, es altamente sensible a la concentración fágica inicial ya que, a mayor concentración inicial, la velocidad aumenta.

Teniendo en cuenta estas interpretaciones y consideraciones de los parámetros calculados en el presente capítulo, se procede a comparar los resultados obtenidos en la presente tesis con distintas tecnologías de inactivación.

Seis de los dieciséis fagos involucrados en esta tesis (832-B1, J-1, MLC-A, 0BJ, CHD y QF9) fueron previamente estudiados aplicando tratamientos fotocatalíticos con  $\text{TiO}_2$  prístino y UV-A en un fotorreactor con características similares al utilizado en este trabajo (Briggiler Marcó et al., 2011). En el mencionado artículo, el catalizador fue depositado por la técnica *sol-gel*, y la cantidad de catalizador depositado fue  $0,02 \text{ mg/cm}^2$ . Además, las suspensiones fágicas fueron depositadas sobre placas de vidrio borosilicato y cubiertas con otra pieza del mismo vidrio (sin recubrir), dejando un espacio entre ellas tal que se genere un espesor similar al de las gotas provenientes de un bioaerosol. Los ensayos se realizaron en esas condiciones a temperatura de  $40^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa de 89,5 %, manteniéndose ambos parámetros constantes durante el experimento. Analizando los resultados del trabajo de Briggiler Marcó et al. (2011), los autores también observaron un comportamiento fago-dependiente. Algunos fagos se inactivaron parcialmente como en el caso de los fagos J-1 ( $0,061$  órdenes  $\log/\text{min}$ ) y QF9 ( $0,042$  órdenes  $\log/\text{min}$ ) dentro del tiempo de tratamiento, mientras que otros se inactivaron completamente, como los fagos 832-B1 ( $0,032$  órdenes  $\log/\text{min}$ ), 0BJ ( $0,025$  órdenes  $\log/\text{min}$ ) y CHD ( $0,024$  órdenes  $\log/\text{min}$ ). En particular, el fago MLC-A demostró la mayor resistencia bajo este tratamiento ya que redujo su título en solo  $0,014$  órdenes  $\log/\text{min}$ , manteniendo su infectividad aún luego de 180 min de ensayo. Los resultados de esta investigación están en línea con los resultados obtenidos en la presente tesis, ya que el fago MLC-A fue uno de los que demostró la mayor resistencia al tratamiento con pintura fotocatalítica. Las tasas de reducción fágica obtenidas trabajando con fotocátalisis ( $\text{TiO}_2$ , UV-A) son más altas que las obtenidas con la pintura fotocatalítica ya que con esta tecnología se utilizó radiación UV-A en lugar de radiación visible, la cual es una fuente de radiación de mayor energía.

Comparando ambas tecnologías, se puede observar que la fotocátalisis prístina ( $\text{TiO}_2$ , UV-A) requeriría tiempos de tratamiento menores para alcanzar reducciones fágicas considerables respecto a los tiempos necesarios al trabajar con la pintura fotocatalítica (Briggiler Marcó et al., 2011), dependiendo del fago. Sin embargo, debe ser notado que el proceso fotocatalítico con  $\text{TiO}_2$  y UV-A requiere un equipamiento especial y un consecuente aumento en el costo energético, mientras que la pintura se depositaría sobre diversas superficies de las plantas lácteas, sin necesidad de equipos

o lámparas especiales, ya que la inactivación fágica se produciría *in situ* utilizando el propio sistema de iluminación de la planta.

En otro trabajo del grupo (Lloréns, 2024) también se calcularon las tasas de reducción fágica para los dieciséis fagos estudiados en la presente tesis, pero en presencia de ozono gaseoso. Los fagos fueron depositados sobre portaobjetos de vidrio y secados en ambiente estéril, similar a lo realizado en esta tesis. Las tasas de reducción fágica obtenidas se encontraron entre 0,07 y 0,63 órdenes log/min, luego de ser sometidas a un tratamiento con ozono gaseoso (10 ppm en base volumétrica).

A fin de realizar comparaciones entre las distintas tecnologías, las tasas de reducción fágica obtenidas en esta tesis como órdenes log/h fueron convertidas a órdenes log/min, para trabajar con las mismas unidades. A partir de este parámetro es posible observar cuán rápido se inactivarían los fagos, conociendo cuáles serían las tecnologías que produjeron las mayores o menores reducciones logarítmicas por unidad de tiempo y así poder estimar los tiempos necesarios para lograr igual reducción con las distintas tecnologías. De esta manera, las tasas de reducción fágica en el caso de la pintura fotocatalítica para los dieciséis fagos ensayados variaron entre 0,002 y 0,05 órdenes log/min, mientras que para el ozono dichas tasas variaron entre 0,07 y 0,63 órdenes log/min. Finalmente, para los seis fagos estudiados con fotocatálisis, las tasas de reducción fágica variaron entre 0,014 y 0,061 órdenes log/min. A partir de estos resultados, se puede observar que la pintura fotocatalítica produjo las menores tasas de reducción fágica, seguida por la fotocatálisis. Finalmente, con el ozono se lograron las mayores reducciones logarítmicas por minuto. La mayor tasa de reducción obtenida con esta tecnología está relacionada al gran poder oxidante del ozono y a su alta capacidad de penetración. Sin embargo, el ozono presenta ciertas limitaciones a la hora de su aplicación, siendo la más importante su elevada toxicidad a altas concentraciones, ya que el contacto con el gas puede provocar problemas respiratorios, corrosión en la piel y daños oculares, dependiendo de la concentración del gas y del tiempo de exposición al mismo (Pironti et al., 2021). Por otro lado, al realizar una comparación de costos aproximados de ambas tecnologías, se observa que el ozono presentaría un costo mayor, tanto de equipamiento como de funcionamiento, ya que sería necesario adquirir un generador de ozono, el cual funciona conectado a la red eléctrica, mientras que la aplicación de la pintura fotocatalítica no precisa de un equipamiento especial (simplemente la aplicación de la pintura en la pared y diversas superficies) y, al utilizar la iluminación propia de los ambientes interiores, tampoco generaría un costo de funcionamiento eléctrico extra.

Los valores de  $t_{99}$ , que es el tiempo necesario para lograr la inactivación del 99 % de las partículas fágicas, están relacionados con la caída en la infectividad de cada

fago y la velocidad con la que ésta se produce. Un valor de  $t_{99}$  menor indicará que el fago precisa de un tiempo más corto para alcanzar el 99 % de inactivación. Trabajando con la pintura bajo radiación visible, los valores de  $t_{99}$  se encontraron en el rango entre 0,6 h y 17,9 h, siendo los fagos 892-LB, 009-ML y QF9 los que presentaron los menores valores (0,6, 0,8 y 0,8 h) mientras que los fagos ATCC 8014-B1, MLC-A y LDG evidenciaron los mayores valores de  $t_{99}$  (7,1, 7,9 y 17,9 h, respectivamente). Estos valores pueden ser comparados con los obtenidos por Lloréns (2024) al estudiar la inactivación de los dieciséis fagos con ozono gaseoso. Al trabajar con este agente oxidante, los valores de  $t_{99}$  fueron considerablemente menores, ya que se encontraron entre 3,1 y 15,9 min, dependiendo el fago. Los fagos CHD y QF9 mostraron la mayor sensibilidad para ambas tecnologías, mientras que los fagos LDG y MLC-A se ubicaron dentro del grupo de los más resistentes. Es decir que, si bien los  $t_{99}$  son muy distintos en magnitud para estas dos tecnologías, se observa que estos 4 fagos siguen la misma tendencia de comportamiento. Sin embargo, esto no podría generalizarse para el resto de los fagos, ya que se encontraron diferencias en su comportamiento dependiendo de la tecnología aplicada.

A partir del trabajo de Briggiler Marcó et al. (2011), también es posible comparar los  $t_{99}$  necesarios para los fagos 832-B1, J-1, MLC-A, CHD, QF9 y 0BJ, empleando fotocátalisis como tecnología de inactivación. En este caso, los valores de  $t_{99}$  variaron entre 35 y 180 min, mostrando un comportamiento intermedio al compararlo con la pintura fotocatalítica y el ozono.

Comparando las tres tecnologías, se observa que la pintura fotocatalítica es la que presenta los mayores  $t_{99}$ , es decir que es la que precisa de mayores tiempos para lograr una reducción del 99 % en la infectividad de los fagos. Sin embargo, la pintura fotocatalítica se aplicaría sobre paredes y diversas superficies de los ambientes industriales y provocaría la inactivación de los fagos a lo largo del tiempo (tecnología pasiva). Como el catalizador presente en la pintura está modificado, el mismo se activa con la iluminación propia de los ambientes industriales, por lo que, como se explicó anteriormente, no sería necesaria la utilización de lámparas especiales UV como en el caso de la fotocátalisis (Jacob et al., 2023), ni equipamientos específicos como generadores de ozono, que sí son necesarios en el caso de la tecnología restante.

Finalmente, considerando las regresiones realizadas para los dieciséis fagos con la cinética de primer orden, se calcularon las eficiencias fotónicas y cuánticas. Estos parámetros también pueden ser utilizados para comparar diversas tecnologías y/o distintos tipos y flujos de radiación incidente.

El fotocatalizador tiene una gran habilidad en la absorción de radiación en el espectro UV, por lo que se esperarían eficiencias mayores trabajando en esta región.

Sin embargo, cuando seis de estos fagos fueron estudiados aplicando tratamientos fotocatalíticos con  $\text{TiO}_2$  prístino y UV-A en un fotorreactor con características similares al utilizado en este trabajo (Briggiler Marcó et al., 2011), solo uno de ellos (832-B1) presentó eficiencias mayores ( $2,46 \times 10^{10}$  UFP/Einstein para la eficiencia fotónica y  $6,99 \times 10^{11}$  UFP/Einstein para la eficiencia cuántica) a las obtenidas con pintura fotocatalítica y radiación visible. Los cinco fagos restantes (J-1, 0BJ, MLC-A, CHD y QF9) mostraron eficiencias menores (entre  $7,00 \times 10^9$  y  $4,82 \times 10^{10}$  UFP/Einstein para eficiencias fotónicas y entre  $1,99 \times 10^{11}$  y  $1,37 \times 10^{12}$  UFP/Einstein para eficiencias cuánticas) a las obtenidas con la pintura fotocatalítica y radiación típica de ambientes interiores. Esto puede ser explicado debido a una menor cantidad de  $\text{TiO}_2$  en las placas de vidrio, ya que para el tratamiento fotocatalítico ( $\text{TiO}_2$ , UV-A), el catalizador fue depositado por la técnica *sol-gel*, y la cantidad de catalizador depositado fue únicamente de  $0,02 \text{ mg/cm}^2$  (Briggiler Marcó et al., 2011). En el caso de la pintura estudiada en el presente trabajo, se estimó un promedio de  $0,697 \pm 0,075 \text{ mg/cm}^2$  de  $\text{TiO}_2$  en la pintura. Esto podría explicar las mayores eficiencias de inactivación en presencia de la pintura fotocatalítica, a pesar de la ausencia de radiación UV-A. Por otro lado, la menor eficiencia cuántica de la fotocatálisis podría deberse a que la velocidad promedio local superficial de absorción de fotones ( $\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}}$ ) de las placas con  $\text{TiO}_2$  puro presente en el denominador de la Ecuación (2.10) es mayor que la correspondiente a la de la pintura. Este valor de  $\langle e^{a,s} \rangle_{A_{irr}}$  mayor está relacionado con la mayor fracción de radiación absorbida por el  $\text{TiO}_2$  puro en el UV-A, en comparación con la fracción de radiación absorbida por el  $\text{TiO}_2$  en la región de la radiación visible. También es importante mencionar algunas diferencias en las metodologías utilizadas entre el presente trabajo y el realizado por Briggiler Marcó et al. (2011). Por ejemplo, en el trabajo mencionado, las suspensiones fágicas no se dejaron secar en las placas recubiertas con  $\text{TiO}_2$ , sino que fueron depositadas simulando gotas de bioaerosoles como se explicó anteriormente y, para el cálculo de las eficiencias de inactivación, se utilizó una tasa de inactivación volumétrica inicial ( $-dUFP/dt|_{t=0}$ ). Las condiciones de temperatura y humedad relativa dentro del reactor también fueron distintas ( $40^\circ\text{C}$  y  $89,5\%$  para fotocatálisis y  $30^\circ\text{C}$  y  $80\%$  para la pintura). Estas pequeñas variaciones en las metodologías pueden influir en gran medida en los resultados informados, por lo cual la comparación entre eficiencias puede no ser del todo justa.

#### 2.4.2. Mecanismos de inactivación

Como se mencionó previamente, al ajustar los datos con la ecuación cinética de primer orden (Ecuación 2.3'), se obtuvieron las constantes de inactivación total ( $k_T$ ). Los valores de estas constantes se encontraron entre  $0,3 \text{ 1/h}$  (fago LDG) y  $7,56 \text{ 1/h}$  (fago

892-LB). De manera similar, ajustando los resultados del Control i con la misma ecuación, se obtuvieron las constantes no fotocatalíticas ( $k_{nph}$ ) para cada fago, cuyos valores se encontraron en el rango entre 0 1/h (fago M1-G1b) y 1,95 1/h (fago QF9). En este caso, estos valores están relacionados al efecto fotoquímico, según se explicó previamente. Por lo tanto, valores similares de ambas constantes para el mismo fago indican una gran contribución del proceso fotoquímico en la inactivación fágica, como en el caso de los fagos LDG y MLC-A. Para estos fagos, los valores de  $k_{nph}$  representan el 83,3 y 69,4 % del valor de  $k_T$ , respectivamente. Similar a lo explicado previamente para las reducciones logarítmicas, esto indica que la inactivación fágica podría deberse principalmente a un efecto fotoquímico (sólo por presencia de radiación), en lugar de uno fotocatalítico.

Para que un virus mantenga su capacidad infectiva es necesario que se conserve la integridad tanto de su cápside como de su genoma (Nuanualsuwan y Cliver, 2003; Wigginton y Kohn, 2012), ya que resultan necesarios para el reconocimiento, unión y formación de nuevas partículas virales. Por lo tanto, un daño en alguno de estos componentes implicaría una pérdida en la infectividad de los virus. Asimismo, la susceptibilidad del virus a los distintos desinfectantes puede verse influenciada por variaciones menores en la estructura o genoma del virus (Wigginton et al., 2012). Como está documentado, los procesos avanzados de oxidación producen la inactivación de virus a través de la generación de especies altamente oxidantes (como los radicales libres) que actúan sobre los componentes estructurales del virus como proteínas y material genético. Para estos procesos, el radical hidroxilo sería el principal responsable de la inactivación viral, como se demostró en estudios realizados con el fago MS2, infectivo de *E. coli* (M. Cho et al., 2005), donde se observó que, al encontrarse en presencia de  $\text{TiO}_2$  y radiación UV-A, el mencionado fago no se inactivó en presencia de los agentes secuestrantes de radicales hidroxilo (t-BuOH y MeOH), mientras que en ausencia de dichos agentes secuestrantes se inactivó notablemente, lo que indicaría la clara importancia de la presencia de los radicales hidroxilo en la inactivación del fago MS2. Cabe destacar que el fago MS2, es un fago que posee ARN como material genético, la cual es una diferencia considerable con los fagos infectivos de BAL estudiados en esta tesis, los cuales presentan ADN como material genético. Por lo que, no se podrían extrapolar conclusiones de un fago a otro, pero su comparación puede ser utilizada como un primer acercamiento al comportamiento de los fagos infectivos de BAL.

Es así que las diferencias en la resistencia fágica frente al tratamiento con pintura fotocatalítica en los dieciséis fagos podrían estar relacionadas a la diversa composición de las proteínas estructurales de cada fago, además de diferencias en el material

genético. Se ha documentado que los radicales libres (principalmente  $\cdot\text{OH}$ ) pueden atacar de distintas maneras, dependiendo de la composición de los aminoácidos y la conformación espacial de sus proteínas estructurales (Gerrity et al., 2008; Kashige et al., 2001). Si bien los radicales hidroxilos son considerados no específicos, es decir que todos los aminoácidos son susceptibles a la degradación por dicho radical durante el proceso fotocatalítico, la abundancia de aminoácidos tirosina parece estar fuertemente relacionado a la susceptibilidad viral para los procesos avanzados de oxidación (Mayer et al., 2015).

De manera similar, se ha demostrado también que los desinfectantes basados en la generación de radicales hidroxilos tienen como objetivo principal a los aminoácidos de las proteínas de la cápside de los virus (Mayer et al., 2015). Sin embargo, a medida que el potencial oxidativo aumenta, los desinfectantes son menos selectivos y el daño en el genoma también comienza a tomar un lugar considerable en la inactivación. Mayer et al. (2015) plantearon un modelo que predice los sitios donde se producen los mayores daños. Conociendo la composición de los distintos virus estudiados en su trabajo, multiplicaron el número de cada nucleótido y aminoácido relevante por la constante de inactivación cinética de distintos desinfectantes, para así analizar la contribución relativa del daño en el genoma o en las proteínas del virus a la inactivación. Para las reacciones con radicales hidroxilos, las constantes de inactivación cinética tabuladas se encontraron en el orden de  $10^9$  l/(mol  $\times$  s) para los nucleótidos (Adenina, Citosina, Guanina, Timina y Uracilo) y entre  $1 \times 10^7$  y  $3,4 \times 10^{10}$  l/(mol  $\times$  s) para los aminoácidos. Este modelo, aplicado a procesos fotocatalíticos, muestra que la contribución teórica relativa al daño en los componentes proteicos de la cápside representa un 65 %, mientras que el daño en el genoma representa un 35 % del daño total en la inactivación del fago MS2.

Se puede concluir que la composición, estructura y función de los componentes de las partículas fágicas tales como proteínas y material genético, tendrían una importante influencia en la inactivación de los virus al ser tratados con procesos fotocatalíticos. Además, cualquier distinción en algunos de esos factores podría generar diferencias en la resistencia o sensibilidad de las partículas virales (Bayarri et al., 2021).

Específicamente, existen trabajos donde se ha estudiado el efecto de la fotocatálisis (UV-A,  $\text{TiO}_2$ ) sobre la inactivación de fagos de bacterias lácticas como es el caso del fago PL-1, infectivo de *Lc. casei* (Kakita Y et al., 2000; Kashige et al., 2001). Con el fago en medio acuoso, se observó una inactivación del 99,9 % luego de 24 h de tratamiento. Además Kakita Y et al. (2000) observaron, con microscopía electrónica, que el 43 % de las partículas fágicas inactivadas carecían de material genético, es decir que sus cápsides se encontraban vacías, lo que se conoce como partículas fantasmas. Por

otro lado, Kashige et al. (2001) reportaron que los daños en la estructura proteica de la cápside del fago PL-1 fueron la principal causa de su inactivación, seguido por la fragmentación de su genoma. También determinaron que los responsables de estos daños serían especies oxidantes (como radicales hidroxilos) generados en la película catalítica, como consecuencia de la incidencia de la radiación UV-A.

#### 2.4.3. Estudio de la pintura fotocatalítica en otros sistemas de purificación de aire

La pintura fotocatalítica utilizada en este trabajo fue estudiada previamente para la degradación de compuestos químicos (como acetaldehído y óxido nítrico (Ballari et al., 2016; Salvadores, Alfano, et al., 2020a; Salvadores, Reli, et al., 2020)), como así también para el control del crecimiento de hongos (*A. niger*) (Salvadores, Alfano, et al., 2020b, 2020a; Salvadores, Reli, et al., 2020; Zacarías et al., 2018). La inactivación de *A. niger* utilizando la pintura fotocatalítica fue estudiada en el fotorreactor utilizado en esta tesis, bajo diversas condiciones experimentales, tales como el tipo de radiación (UV o visible), humedad relativa (30 – 50 % HR) y flujo de radiación incidente (12,5 – 100 % de radiación) (Zacarías et al., 2018). Los autores de este trabajo concluyeron que la pintura fue eficiente en el control de crecimiento fúngico. Más aún, la cantidad de pintura fotocatalítica depositada sobre las placas de vidrio por la técnica de *dip-coating* que reportaron estos autores (2,29 mg/cm<sup>2</sup>) es muy similar a la cantidad de pintura depositada reportada en esta tesis (2,04 ± 0,22 mg/cm<sup>2</sup>), indicando una muy buena repetibilidad de la técnica de deposición del *dip-coating*, lo que nos permite comparar los resultados obtenidos en ambos trabajos, ya que se empleó una cantidad de pintura similar.

En el trabajo antes mencionado, Zacarías et al. (2018) encontraron una constante aparente promedio de aproximadamente 0,008 1/h al estudiar la inactivación de *A. niger* utilizando la pintura fotocatalítica bajo radiación visible por 7 días. Esta constante es mucho más pequeña que las constantes halladas en este trabajo, lo que indica una resistencia mayor por parte de los hongos, comparados con los fagos de bacterias lácticas ensayados en este trabajo, lo cual podría explicarse debido a la estructura más compleja y resistente de los hongos. Además, la inactivación observada con *A. niger* fue mayormente debida al efecto fotoquímico, como se observó también en nuestro trabajo para algunos fagos como LDG, MLC-A y ATCC 8014-B1.

#### 2.4.4. Influencia de condiciones ambientales y fuente de radiación

La eficiencia fotocatalítica está fuertemente influenciada por la interacción entre el catalizador y la entidad biológica a ser degradada, la cual a su vez depende de la cantidad de moléculas de agua presentes, la hidrofiliidad del catalizador, la naturaleza química de los microorganismos o virus a ser degradados, la presencia de otras

moléculas, entre otros (Luévano-Hipólito y Martínez de la Cruz, 2016; Ribeiro Borges et al., 2020; Rochetto y Tomaz, 2015). Por este motivo, se estudió la influencia de la humedad relativa, el flujo y la fuente de radiación en la inactivación de fagos de BAL y, posteriormente, se desarrolló un modelo cinético que ajustara fehacientemente los resultados obtenidos.

Para llevar adelante estos ensayos, se seleccionaron los fagos J-1, infectivo de *Lc. casei* ATCC 27139 y el fago M13-G1b, infectivo de *St. thermophilus* G1b, ya que, al ser estudiados en las condiciones iniciales (100 % radiación, 80 % humedad relativa), estos fagos presentaron una tasa de inactivación intermedia, lo cual favoreció la observación de los cambios ocasionados al variar las condiciones operacionales. Más aún, estos fagos son sencillos de propagar y producen placas de lisis claras, lo que facilitó el trabajo experimental.

Si bien en el proceso fotocatalítico es necesario un mínimo nivel de humedad para asegurar la presencia de agua como principal fuente de radicales hidroxilos, el efecto de la humedad relativa en la inactivación de fagos de BAL mediante procesos fotocatalíticos no se había demostrado aún. En la presente tesis se observó que a medida que la humedad relativa aumentó, la tasa de reducción fágica (órdenes log/h) se volvió mayor, especialmente para valores altos de humedad relativa. En la bibliografía hay una amplia variabilidad en lo reportado al estudiar la relación entre la humedad relativa y la inactivación fotocatalítica de microorganismos o virus. En este sentido, algunos autores reportaron una alta inactivación de microorganismos o virus del aire usando radiación UV y TiO<sub>2</sub> como fotocatalizador, cuando la humedad relativa aumentó entre 30 y 70 – 80 % (Lee, 2011; Yu et al., 2008). Por ejemplo, se observó que la eficiencia de remoción del fago  $\lambda$  vir (infectivo de *E. coli*) aumentó 1,32 veces al pasar de 30 a 70 % HR, generando con el fago un bioaerosol que atravesó, dentro de un reactor de acero inoxidable, un filtro recubierto de TiO<sub>2</sub> iluminado con radiación UV-A ( $\lambda$  = 365 nm). Al estudiar la inactivación fágica con placas sin recubrir (Control i) en esta tesis, se observó también que a medida que la humedad relativa disminuyó, la inactivación fágica fue menor, lo que indicaría que la humedad relativa también es un factor significativo en el proceso de inactivación fotoquímico. Zacarías et al. (2018) reportaron que no hallaron diferencias significativas en la inactivación de *A. niger* al trabajar con niveles de humedad de 30 y 50 % en presencia de la misma pintura que la utilizada en esta tesis. A pesar de la diferencia en la entidad a ser inactivada, estos resultados son consistentes con los observados en la presente tesis ya que se observó un cambio prácticamente despreciable en la tasa de reducción fágica para niveles de humedad relativa intermedios y bajos (0,28 y 0,29 órdenes log/h para los fagos J-1 y M13-G1b, respectivamente, a 50 % HR y 0,14 órdenes log/h para ambos fagos a 30 %

HR). En contraste, en esta tesis se observó un aumento considerable en la tasa de reducción fágica a 80 % HR (1,48 órdenes log/h para el fago J-1 y 0,92 órdenes log/h para el fago M13-G1b). Se destaca la importancia de estos resultados, ya que se encontró una notable diferencia en el comportamiento reportado por otros microorganismos en bibliografía frente a aumentos en la humedad relativa (B. U. Lee, 2011; L. Liu et al., 2022; Poormohammadi et al., 2021; Yu et al., 2008), lo que representa un resultado novedoso en el efecto de esta variable en la inactivación de fagos infectivos de bacterias lácticas. Los resultados presentados en esta tesis son alentadores ya que, en los ambientes de las industrias lácteas, la humedad relativa es generalmente elevada.

En Lloréns (2024), donde se estudió la inactivación de fagos de BAL con ozono gaseoso a dos niveles distintos de humedad relativa (70 y 95 %), también se observó el mismo efecto negativo en la inactivación de los fagos MLC-A y LDG al reducir la humedad relativa. Al trabajar con 70 % HR se requirieron dosis de ozono 11 (fago MLC-A) y 4 veces mayores (fago LDG) para lograr la misma concentración fágica final que trabajando con 95 % de humedad relativa.

Al aumentar el flujo de radiación se observó una mayor eficiencia fotocatalítica para los fagos ensayados (J-1 y M13-G1b). Esto concuerda con Huang et al. (2019) y Liu et al. (2022), ya que el proceso fotocatalítico comienza cuando la energía de *band gap* del fotocatalizador es excedida, un par electrón-hueco se forma y reacciona para generar especies reactivas, siendo la tasa de separación de cargas proporcional a la cantidad de fotones. En forma similar, para los ensayos con radiación y placas sin recubrir (Control i), al disminuir la radiación, la inactivación fágica también se redujo. En este caso, la pérdida de infectividad puede ser atribuida exclusivamente a un proceso fotoquímico causado por la interacción entre los fagos y la radiación (L. Liu et al., 2022; Nakano et al., 2012).

Como el catalizador comercial  $\text{TiO}_2$  (sin modificar) absorbe radiación en la región UV, pero no así en la región visible, al formular la pintura fotocatalítica fue necesario modificarlo, dopándolo con carbono para aprovechar también el rango de radiación visible, emitida por las lámparas típicas de ambientes interiores. Sin embargo, como se observó en las secciones anteriores, el  $\text{TiO}_2$  modificado presente en la pintura fotocatalítica posee una mayor absorción de radiación en el espectro UV que en la región del visible. Por este motivo, se realizaron también ensayos modificando la fuente de radiación típica de ambientes interiores por una de radiación UV-A. Considerando los valores de tasas de reducción fágica y las constantes cinéticas obtenidas, se alcanzó una inactivación fágica más rápida utilizando la pintura bajo radiación UV-A. Esto concuerda con lo revisado en Poormohammadi et al. (2021), donde se concluyó que

cuando se utiliza una fuente de radiación con mayor energía, la generación de radicales libres reactivos por parte de la superficie fotocatalítica se intensifica, lo que resulta en un aumento en la velocidad de inactivación de los agentes biológicos. De manera similar, se observó que la inactivación fotoquímica (Control i) aumentó al cambiar la fuente de radiación incidente, de lámparas típicas de ambientes interiores a lámparas UV-A. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la radiación UV-A es una radiación de mayor energía y con mayor poder penetrante que la radiación visible.

Al analizar los valores de las eficiencias obtenidas con las distintas fuentes de radiación se observó que tanto las eficiencias fotónicas como cuánticas fueron mayores en presencia de radiación UV-A, para ambos fagos. Un parámetro que se debe tener en cuenta para explicar este comportamiento es la fracción de radiación absorbida por el  $\text{TiO}_2$ , la cual es mayor en el rango de longitud de onda UV-A ( $\lambda = 340 - 400 \text{ nm}$ ) que en el rango de longitud de onda visible ( $\lambda = 360 - 720 \text{ nm}$ ). Un aumento en este parámetro afecta positivamente a las eficiencias, ya que, al absorber una mayor cantidad de radiación, se producirá un aumento en la generación de los radicales libres, lo que se traduce en un aumento en la velocidad de inactivación aparente. A su vez, este aumento en la fracción de radiación absorbida afecta negativamente a la eficiencia cuántica, ya que es utilizada para calcular la velocidad promedio local superficial de absorción de fotones, parámetro presente en el denominador de la Ecuación (2.10), empleada para calcular la eficiencia cuántica. A partir de estos resultados, se puede observar que el aumento en la velocidad de inactivación aparente (numerador de la Ecuación (2.10)) resultó mayor que el aumento en la velocidad promedio local superficial de absorción de fotones (denominador de la ecuación), y la eficiencia cuántica también resulta mayor al trabajar con radiación UV-A. Por lo tanto, al utilizar las pinturas bajo radiación UV-A, además de ser una inactivación mayor y más rápida, también será más eficiente desde el punto de vista del flujo de radiación utilizado. Por ejemplo, Zacarías et al. (2018) también estudiaron la inactivación de *A. niger* con pintura fotocatalítica reemplazando la radiación visible por radiación UV-A. La constante cinética obtenida trabajando con radiación visible (0,008 1/h) aumentó entre 4 y 5 veces luego de modificar la fuente de radiación. A pesar de las claras diferencias de trabajar con hongos o fagos, estos resultados nos conducen a pensar en un estudio combinando pintura fotocatalítica con radiación UV-A, especialmente para aquellos fagos que no fueron completamente inactivados en las condiciones estudiadas. Más aún, L. Liu et al. (2022) expusieron que se alcanzaron mayores eficiencias de inactivación cuando cepas de *E. coli* y *S. aureus*, esporas de *A. versicolor* y el fago MS2 fueron expuestos a lámparas con longitudes de onda más cortas, obteniendo para este último caso una inactivación de 4,06 órdenes log bajo radiación UV-C ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) y 2,64 órdenes log bajo radiación UV-A ( $\lambda = 365$

nm). Como consecuencia, el empleo de radiación UV-C podría causar una inactivación fotoquímica aún mayor, como así también una intensificación en el proceso fotocatalítico (L. Liu et al., 2022), que será evaluado en el próximo capítulo.

#### 2.4.5. Modelo cinético

Se obtuvo un muy buen ajuste para el modelo cinético propuesto en esta tesis, donde cada parámetro se relaciona con una variable importante en la inactivación. El parámetro cinético  $k_2$  representa el orden de la velocidad de reacción, teniendo en cuenta el flujo de radiación incidente. Es importante destacar que, trabajando con placas recubiertas, el orden de reacción para ambos fagos fue similar y significativamente menor a 1. Esto indica que a medida que se aumentó el flujo de radiación, se produjo una saturación de fotones en la superficie del catalizador, lo que ocasionó que la tasa de inactivación no se incremente en la misma proporción que el aumento en el flujo de radiación. Analizando el ajuste para las placas sin recubrir para el fago J-1, el parámetro  $k_2$  mostró un valor similar que para las placas recubiertas. Esto podría ser atribuido a un fenómeno similar al descrito previamente en referencia a la saturación de fotones, pero esta vez debido a una mayor absorción de la radiación por parte del fago. Por el contrario, el fago M13-G1b presentó un mayor valor de  $k_2$  estimado para las placas sin recubrir en comparación al obtenido al trabajar con placas recubiertas (cercano a 1), siendo una relación prácticamente lineal entre el flujo de radiación y la inactivación fágica, lo que indicaría que aparentemente este fago absorbería menos fotones. Este resultado es también consistente con la baja inactivación fotoquímica del fago M13-G1b, reportada previamente en la Sección 2.3.4. Es posible entonces plantear que para el fago J-1, el orden de reacción no varía significativamente entre el proceso fotoquímico para las placas sin recubrir y el proceso combinado fotoquímico-fotocatalítico que ocurre en las placas recubiertas. Sin embargo, para el fago M13-G1b, el valor de  $k_2$  se redujo cuando se combinaron los fenómenos fotoquímico y fotocatalítico.

En cuanto a la función logística para tener en cuenta la influencia de la humedad relativa,  $k_3$  representa el punto medio de la función logística y  $k_4$  representa la pendiente de la curva de la función logística. Para todas las situaciones, el orden de magnitud de estos parámetros resultó similar. Sin embargo, para ambos fagos la pendiente de la tasa de inactivación con respecto a la humedad relativa aumentó cuando entró en juego el proceso fotocatalítico ( $k_4$  es mayor). Esto es, la tasa fue mayor para ambas placas cuando la humedad relativa se aumentó, pero en mayor proporción para las placas recubiertas, y esto puede ser observado con el valor del parámetro  $k_4$ . Por otro lado, la concentración de agua predicha a la cual la curva de inactivación alcanza su punto de inflexión es menor para los ensayos fotocatalíticos ( $k_3$  es menor). Esto podría indicar

que una velocidad máxima de inactivación puede ser alcanzada a una concentración de vapor de agua menor cuando actúan ambos procesos, fotoquímico y fotocatalítico.

A partir de los resultados presentados en este capítulo, se propone la deposición de la pintura fotocatalítica sobre diversas superficies y equipos de la planta, para que durante la jornada de trabajo la inactivación fágica se produzca continuamente bajo la iluminación típica de la planta. Se recomienda también el encendido de lámparas UV-A cuando los trabajadores abandonen el ambiente industrial o ante situaciones particulares en donde se necesite aumentar la eficiencia de la pintura fotocatalítica. A partir del modelo cinético propuesto y exitosamente ajustado se puede predecir el comportamiento de los fagos al ser tratados con esta tecnología, pero en condiciones de humedad relativa y flujo de radiación diferentes a las ensayadas en esta tesis. Estas predicciones presentarán una mayor precisión si los valores de las variables humedad relativa y flujo de radiación utilizados para la predicción se encuentran dentro del rango para el cual se ajustó el modelo (30 – 80 % humedad relativa, 18 – 100 % flujo de radiación).

# **CAPÍTULO 3 - RADIACIÓN UV-C**

### **3.1. Resumen del capítulo**

En este capítulo se estudió la inactivación de los dieciséis fagos infectivos de BAL empleando como estrategia de inactivación a la radiación UV-C ( $\lambda = 200 - 280$  nm). Para realizar estos ensayos, se depositaron y secaron las suspensiones fágicas sobre placas de vidrio borosilicato y se introdujeron en un reactor escala laboratorio, donde fueron sometidas a radiación UV-C ( $1,05 \times 10^{-3}$  W/cm<sup>2</sup> de flujo de radiación, 90 % de humedad relativa) por un tiempo máximo de 30 min (dosis máxima de 0,63 J/cm<sup>2</sup>). De los dieciséis fagos estudiados, seis fueron completamente inactivados a los 2 min de tratamiento, equivalente a una dosis de 0,13 J/cm<sup>2</sup>. Para los diez fagos que permanecieron infectivos, se graficaron los resultados obtenidos ( $\log(P/P_0)$  vs tiempo) y se observó, en todas las curvas de inactivación, una pronunciada pendiente para tiempos cortos de tratamiento y un efecto de cola para los tiempos mayores, el cual indica que la concentración fágica se mantuvo constante en un valor umbral de  $\log(P/P_0)$  (entre -3,27 y -4,73) hasta el final del experimento. Se ajustaron diversos modelos cinéticos reportados en bibliografía a los datos experimentales, obteniendo los modelos de Geeraerd y de Baranyi y Roberts el mejor ajuste. A partir de estos modelos, se obtuvo el parámetro  $k_{max}$ , que modela la porción de la curva que refleja la caída exponencial en la infectividad, obteniéndose valores entre  $4,6 \times 10^{-2}$  1/s (fago LDG, el más resistente) y  $9,1 \times 10^{-2}$  1/s (fago CHD, el más sensible). Cuatro de los diez fagos alcanzaron el efecto de cola a los 2 min, para los cuales las reducciones log se encontraron entre 3,58 (fago ATCC 8014-B1) y 4,38 órdenes log (fago CHD), mientras que los restantes alcanzaron la cola a los 5 min, reduciendo su infectividad entre 3,16 (fago OBJ) y 4,45 órdenes log (fago M1-G1b). Otro parámetro relevante en la inactivación es el  $t_{99}$ , que es el tiempo necesario para reducir la infectividad en 2 órdenes log. El rango de valores para el  $t_{99}$  se encontró entre 53 s (fago CHD) y 102 s (fago LDG).

Con el objetivo de analizar la influencia de diversas condiciones en la inactivación y al mismo tiempo intentar eliminar el efecto de cola para lograr una completa inactivación fágica, se variaron diversas condiciones, de a una por vez, tales como humedad relativa (40, 60 y 90 %), flujo de radiación ( $4,42 \times 10^{-4}$ ,  $1,05 \times 10^{-3}$  y  $2,95 \times 10^{-3}$  W/cm<sup>2</sup>), medio de suspensión fágica (agua, leche y suero de quesería), agregado de fotocatalizador (TiO<sub>2</sub>), números de ciclos de radiación (1 o 2 ciclos), dosis de radiación (0,63, 10,61 y 21,22 J/cm<sup>2</sup>) y concentraciones fágicas iniciales ( $1,3 \times 10^7$ ,  $3,60 \times 10^6$  y  $1,70 \times 10^6$  UFP/ml). Todos estos ensayos fueron realizados empleando los fagos MLC-A (infectivo de *Lc. casei*) y LDG (infectivo de *Leuc. pseudomesenteroides*). Como conclusión general, en ninguno de los casos se logró la eliminación completa del efecto de cola. Se observó una mayor reducción en la infectividad del fago LDG al trabajar con

humedades bajas (40 – 60 %), mientras que el fago MLC-A no presentó diferencias significativas entre las reducciones a distintas humedades ( $p < 0,05$ ). Al ajustar el modelo de Geeraerd, se observó que el parámetro  $k_{max}$  disminuyó parabólicamente con la humedad relativa. Al variar el flujo de radiación se observó que no hubo diferencias significativas en las reducciones de ningún fago si la dosis de radiación se mantenía constante (cumplimiento de la ley de Bunsen Roscoe,  $p < 0,05$ ) y, al ajustar el modelo de Geeraerd, se observó que el parámetro  $k_{max}$  aumentó linealmente con el flujo de radiación. El agregado del catalizador mejoró la velocidad de inactivación inicial (mayor  $k_{max}$ ) pero el efecto de cola se observó a concentraciones fágicas mayores, con lo cual se obtuvo una menor reducción en la infectividad de los fagos. Respecto a los medios de suspensión fágica, no se observaron diferencias significativas para las reducciones logradas con los diferentes medios ( $p < 0,05$ ), excepto para la leche con el fago LDG. De la única manera que se logró la inactivación completa de los fagos MLC-A y LDG, eliminando el efecto de cola, fue mediante el tratamiento secuencial con radiación UV-C, seguido de fotocátalisis prístina ( $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$ ) u ozono gaseoso (10 ppm base volumétrica).

La radiación UV-C resultó una tecnología muy útil para la inactivación de fagos a causa de la elevada reducción ocasionada en su infectividad en un breve período de tiempo. Debido al efecto de cola observado en las curvas de inactivación, se recomienda la complementación de esta tecnología con otras estrategias, tales como el ozono gaseoso o la fotocátalisis, con el fin de mejorar las tasas de inactivación fágica.

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Bacteriofagos y cepas bacterianas**

Se ensayaron los dieciséis fagos descritos en el Capítulo 2, estudiados con las pinturas fotocatalíticas (Tabla 2.1).

La titulación de los fagos se llevó adelante con el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991), tal como se explicó en la Sección 2.2.3 del Capítulo 2.

### **3.2.2. Descripción del equipo experimental**

Se empleó el reactor descrito en el Capítulo 2, con dos pequeñas modificaciones: en esta oportunidad, el sistema de emisión de radiación fue modificado colocando únicamente una lámpara UV-C en el centro (Lámpara Germicida OSRAM Puritec HNS G5 8W, Italia,  $\lambda = 200 - 280$  nm). Por otro lado, se retiró la tapa de vidrio de borosilicato de la parte superior de la cámara de irradiación, ya que el borosilicato no es transparente a la radiación UV-C, y, si el reactor se encontrara cubierto con el vidrio, la radiación no podría alcanzar las muestras.

La humedad relativa en el interior del reactor se mantuvo constante (alrededor de 90 %) al colocar una solución sobresaturada de sulfato de potasio en el interior del reactor, y fue monitoreada con el medidor de humedad y temperatura (Smart Sensor, Houston, EEUU).

### **3.2.3. Ensayos de inactivación fágica**

Las suspensiones fágicas fueron diluidas con agua destilada estéril hasta alcanzar concentraciones finales entre  $10^5$  y  $10^7$  UFP/ml. Luego, 20  $\mu$ l de las suspensiones fueron depositados en placas de vidrio borosilicato de 3 cm  $\times$  7 cm y secadas en un ambiente estéril. A continuación, las placas fueron colocadas dentro del reactor e irradiadas ( $\lambda = 200 - 280$  nm) por un tiempo total de 10 minutos. Las muestras fueron retiradas del reactor a tiempos predeterminados y se agregaron 70  $\mu$ l de agua destilada estéril sobre la muestra tratada, a fin de recuperarla en medio líquido (Figura 2.3). Finalmente, las enumeraciones fágicas fueron llevadas adelante mediante el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991). Los resultados obtenidos se graficaron en función del tiempo ( $\log P/P_0$  vs tiempo).

#### **3.2.3.1. Segundo ciclo de radiación UV-C**

En base a los resultados obtenidos, se realizó un segundo ciclo de inactivación bajo radiación UV-C. Para ello, se levantaron placas de lisis correspondientes a los fagos que permanecieron infectivos después del primer tratamiento con radiación UV-C y se sometieron a dos procedimientos:

➤ Las placas de lisis levantadas se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril y esta suspensión fue depositada (20 µl) en una placa de vidrio borosilicato, secada y expuesta a radiación UV-C (concentración inicial entre  $1 \times 10^7$  y  $6 \times 10^7$  UFP/ml), siguiendo el mismo procedimiento que el explicado en la sección anterior.

➤ Las placas de lisis levantadas se colocaron en un tubo con 5 ml de medio de cultivo MRS, dejándolas difundir toda la noche. Posteriormente, se agregó la cepa hospedadora para realizar la propagación fágica, de acuerdo a las condiciones apropiadas mencionadas en la Tabla 2.1. Una vez que el fago fue propagado y posteriormente filtrado (0,45 µm), se realizaron diluciones decimales en agua destilada hasta una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^7$  UFP/ml. Esta dilución se depositó (20 µl), se dejó secar sobre la placa de vidrio borosilicato y se colocó en el reactor para su exposición a la radiación UV-C, siguiendo el mismo procedimiento al descrito en la sección anterior.

Estos ensayos se realizaron a una humedad relativa del 90 %, por un tiempo máximo de 10 min.

### 3.2.4. Modelos cinéticos teóricos

Considerando la evolución de los títulos fágicos obtenidos a lo largo del tiempo, se propusieron diversos modelos cinéticos de inactivación que contemplan efectos de “hombro” y de “cola” para ajustar los datos experimentales. A continuación, se describen estos modelos.

Para poder ajustar los modelos y obtener los parámetros cinéticos de cada uno, se utilizó un parámetro de optimización no lineal que aplica el método del gradiente reducido generalizado, minimizando la raíz del error cuadrático medio (RMSE, Ecuación 3.1) entre los resultados experimentales y las distintas predicciones de los modelos. El modelo con el menor RMSE para cada fago será el que brinde el mejor ajuste.

$$RMSE (\%) = \sqrt{\frac{\sum_1^n \left( \frac{\log \left( \frac{P}{P_0} \right)_{exp} - \log \left( \frac{P}{P_0} \right)_{mod}}{\log \left( \frac{P}{P_0} \right)_{exp}} \right)^2}{n}} \times 100 \quad (3.1)$$

Donde  $\frac{P}{P_0} \Big|_{exp}$  y  $\frac{P}{P_0} \Big|_{mod}$  representan la relación de la concentración de fagos experimental y la predicha por los modelos teóricos, respectivamente, mientras que  $n$  es el número de muestras analizadas en cada ensayo para cada fago.

### 3.2.4.1. Modelo Weibull

Este modelo fue propuesto por Peleg y Cole (1998) y asume los episodios letales como probabilidades. A partir de la forma acumulativa de la distribución de dichos episodios, se obtienen las curvas de inactivación (Ecuación 3.2).

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = -b \times t^n \quad (3.2)$$

Donde  $P$  [UFP/ml] es el número de fagos infectivos luego del tiempo de exposición  $t$  [s],  $P_0$  [UFP/ml] es el número inicial de fagos,  $b$  y  $n$  son factores de escala y forma, respectivamente. Esta distribución corresponde a una curva cóncava ascendente si  $n < 1$ , a una curva lineal si  $n = 1$  y a una curva cóncava descendente si  $n > 1$ .

### 3.2.4.2. Modelo Weibull-tail

Este modelo fue propuesto por Albert y Mafart (2005) (Ecuación 3.3) e incluye los parámetros  $\alpha$  ( $\alpha > 0$ ), que representa el tiempo necesario para lograr la reducción decimal en la concentración para la parte de la población que no pertenece a  $P_{res}$ ,  $\beta$ , que indica la concavidad o convexidad de la curva y  $P_{res}$  [UFP/ml], que representa la concentración residual de fagos infectivos al final del tratamiento.

$$\frac{P}{P_0} = \left(1 - \frac{P_{res}}{P_0}\right) \times 10^{\left(\left(\frac{-t}{\alpha}\right)^\beta\right)} + \frac{P_{res}}{P_0} \quad (3.3)$$

### 3.2.4.3. Ecuación log-logistic

Esta ecuación fue originalmente propuesta por Cole et al. (1993) y fue luego modificada por Chen y Hoover (2003), reduciendo la cantidad de parámetros a:  $A$  [ $\log(\text{UFP/ml})$ ], que representa la diferencia entre las asíntotas superior e inferior,  $\sigma$  [ $(\log(\text{UFP/ml}))/\log(s)$ ] que representa la máxima velocidad de inactivación y  $\tau$  [ $\log(s)$ ], que representa el logaritmo del tiempo necesario para alcanzar la máxima velocidad de inactivación (Ecuación 3.4).

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau - \log t)/A}} - \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau + 6)/A}} \quad (3.4)$$

### 3.2.4.4. Ecuación de Gompertz modificada

En este modelo (Ecuación 3.5)  $C$  representa la diferencia entre las asíntotas superior e inferior,  $M$  [s] es el tiempo al cual la velocidad de muerte absoluta es máxima y  $B$  [1/s] es la velocidad de muerte relativa a tiempo  $M$  (Linton et al., 1995; Xiong et al., 1999).

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = C \times e^{-BM} - C \times e^{-e^{-B \times (t-M)}} \quad (3.5)$$

### 3.2.4.5. Modelo de Geeraerd

Este modelo (Ecuación 3.6) fue propuesto por Geeraerd et al. (2000) y emplea tres parámetros: el largo del hombro ( $SL$ ), que representa el tiempo previo a que comience la inactivación exponencial, la velocidad de inactivación ( $k_{max}$ ), que es la pendiente de la porción exponencial de la curva [1/s] y la porción de la cola ( $P_{res}$ ), que representa los fagos residuales al final del tratamiento [UFP/ml]. Este modelo puede ser también aplicado para curvas sin hombros ( $SL=0$ ) o cola ( $P_{res}=0$ ).

$$P = (P_0 - P_{res}) \times \exp(-k_{max} \times t) \times \left( \frac{\exp(-k_{max} \times SL)}{1 + (\exp(k_{max} \times SL) - 1) \times \exp(-k_{max} \times t)} \right) + P_{res} \quad (3.6)$$

Para independizar al modelo de la concentración fágica inicial, todos los términos de la Ecuación (3.6) fueron divididos por  $P_0$ , resultando la Ecuación (3.7).

$$\frac{P}{P_0} = \left( 1 - \frac{P_{res}}{P_0} \right) \times \exp(-k_{max} \times t) \times \left( \frac{\exp(-k_{max} \times SL)}{1 + (\exp(k_{max} \times SL) - 1) \times \exp(-k_{max} \times t)} \right) + \frac{P_{res}}{P_0} \quad (3.7)$$

### 3.2.4.6. Modelo de Chick-Watson modificado

Este modelo fue propuesto por Lambert y Johnston (2000), modificando el modelo de Chick-Watson, con el objetivo de poder describir las fases de hombro o cola (Ecuación 3.8). El parámetro  $k_1$  es una constante de velocidad de inactivación [1/s] y el parámetro  $k_2$  es una constante de inactivación UV de primer orden [1/s].

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = -k_1 \times (1 - \exp(-k_2 \times t)) \quad (3.8)$$

### 3.2.4.7. Modelo de Hom

Este modelo fue propuesto por Hom (1972) y es similar al modelo de Chick-Watson, pero con la adición del parámetro  $h$  [adimensional], el cual modela una curva con cola si  $h < 1$  y con hombro si  $h > 1$  (Ecuación 3.9). El parámetro  $k$  es la constante de velocidad de inactivación y está relacionado con la resistencia del fago ensayado.

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = -k \times C^m \times t^h \quad (3.9)$$

### 3.2.4.8. Modelo de Baranyi y Roberts

Este modelo (Ecuación 3.10), propuesto por Baranyi y Roberts (1994), emplea 3 parámetros:  $P_{min}$  representa los fagos infectivos al finalizar el tratamiento [UFP/ml],  $k_{max}$  representa la máxima velocidad de inactivación [1/s] y  $P_0$  representa el número inicial de fagos [UFP/ml].

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = \log\left[\frac{P_{min}}{P_0} + \left(1 - \frac{P_{min}}{P_0}\right) \times \exp(-k_{max} \times \left(t - 1 + \frac{P_{min}}{P}\right))\right] \quad (3.10)$$

### 3.2.5. Variación de condiciones de operación

Con el objetivo de estudiar la inactivación fágica bajo diversas condiciones, se seleccionaron los fagos MLC-A, infectivo de *Lc. paracasei* A, y LDG, infectivo de *Leuc. pseudomesenteroides* R707, para llevar adelante ensayos variando diversas condiciones, de a una por vez. Estos fagos fueron seleccionados debido a varias razones. En primer lugar, fueron aislados de muestras defectuosas de productos lácteos en Argentina, por lo que son altamente relevantes para la industria láctea de nuestro país. Además, ambos fagos son normalmente los más resistentes, considerando los dieciséis fagos estudiados en esta tesis, al ser tratados con distintas tecnologías para su inactivación, tales como fotocátalisis (Briggiler Marcó et al., 2021), pintura fotocatalítica bajo radiación visible (Capítulo 2 de la presente tesis, (Jacob et al., 2023)) y ozono gaseoso (Lloréns, 2024).

En todas las experiencias se realizaron ensayos bajo las mismas condiciones que en los ensayos de la Sección 3.2.3, esto es fagos suspendidos en agua destilada estéril (concentración de  $1,07 \times 10^7$  UFP/ml) y depositados sobre placas de vidrio borosilicato, que luego fueron colocadas dentro de un reactor con 90 % de humedad relativa e irradiado con una única lámpara UV-C por un tiempo máximo de 10 min. Luego, estas condiciones de operación del reactor se fueron variando de a una a la vez, con el objetivo de analizar el efecto de diversos parámetros sobre la inactivación fágica, tales como el flujo de radiación (tres lámparas y una única lámpara con una malla metálica), la humedad relativa (40 y 60 %), la adición de  $\text{TiO}_2$  al soporte vidrio como fotocatalizador y el medio de suspensión fágica (leche, suero de quesería). Finalmente, se realizó una secuencia de distintas tecnologías de inactivación, sometiendo a los fagos a radiación UV-C seguida de un tratamiento fotocatalítico (UV-A,  $\text{TiO}_2$ ) o de ozono gaseoso, con el objetivo de mejorar la inactivación fágica.

Para todos estos estudios, el procedimiento y recolección de la muestra se llevaron adelante siguiendo las técnicas previamente descriptas. En esta oportunidad, y a diferencia de la Sección 3.2.3, los resultados se graficaron como  $\log P/P_0$  vs dosis de radiación.

#### 3.2.5.1. Concentraciones fágicas iniciales

Además de la concentración fágica inicial de  $1,07 \times 10^7$  UFP/ml, se evaluaron concentraciones de  $1,70 \times 10^6$  y  $3,60 \times 10^6$  UFP/ml para los fagos LDG y MLC-A, respectivamente. Para lograr estas concentraciones más bajas se realizó una dilución decimal extra en agua destilada para cada fago.

### 3.2.5.2. Flujo de radiación

Se evaluó la influencia del flujo de radiación en la inactivación fágica, manteniendo la dosis de radiación. Para ello, se estudió el efecto de una lámpara ubicada en el centro del reactor (tiempo máximo de 10 min), tres lámparas (colocando una lámpara de cada lado a la lámpara central) por un tiempo máximo de 5 min, y una lámpara con una malla metálica ubicada entre las muestras a tratar y la lámpara UV-C central, por un tiempo máximo de 24 min. La dosis de radiación entregada a las placas se calculó como el producto de la radiación incidente y el tiempo de tratamiento.

En particular, al trabajar con tres lámparas se ensayaron también tiempos más prolongados (60 y 120 min), para realizar tratamientos con dosis mayores (10,61 y 21,22 J/cm<sup>2</sup>).

El flujo neto de radiación incidente fue medido utilizando un radiómetro (IL 1700 Research Radiometer de International Light) con un sensor (SED240 #4277), filtro de paso de banda (NS254 #16793) y un difusor de ojo ancho (W #7722). Las mediciones se realizaron colocando el sensor directamente debajo de la/s lámpara/s germicida/s, al nivel donde usualmente se colocaron las placas con muestras a tratar. El factor de sensibilidad a la respuesta del PIR para el sensor fue de  $2,49 \times 10^4 \text{ A} \times \text{cm}^2/\text{W}$ . La emisión espectral de la lámpara UV-C fue determinada con un espectrómetro portátil (Ocean Optics USB 2000 +UV–Vis–ES).

### 3.2.5.3. Humedad relativa

La inactivación de los fagos LDG y MLC-A se estudió a diversas humedades relativas (40, 60 y 90 %). Para lograr estas humedades en el interior del reactor, se utilizó sílica-gel para lograr 40 % de HR o distintas soluciones sobresaturadas de sales, tales como nitrato de magnesio para 60 % de HR y sulfato de potasio para 90 % de HR.

### 3.2.5.4. Agregado de catalizador

Los ensayos de inactivación se condujeron depositando los fagos sobre placas de vidrio borosilicato recubiertas con catalizador (TiO<sub>2</sub> Aeroxide® P25) o sin recubrir, con el objetivo de observar un posible efecto de intensificación del proceso de inactivación con UV-C en presencia de catalizador. El fotocatalizador se depositó mediante la técnica del *dip-coating* (Zacarías et al., 2018, 2015), sumergiendo la placa de vidrio en una suspensión de TiO<sub>2</sub> (150 g/L) a velocidad controlada (3 cm/min) y retirando la placa de la solución a la misma velocidad constante. La cantidad de catalizador depositado en las placas resultó en un valor promedio de  $0,193 \pm 0,016 \text{ mg/cm}^2$ .

### 3.2.5.5. Medios de suspensión fágica

Con el objetivo de estudiar si la inactivación fágica bajo radiación UV-C puede verse influenciada por el medio donde los fagos se encuentran suspendidos, se realizaron ensayos utilizando agua destilada estéril, leche descremada en polvo reconstituida al 10 % p/p (leche) y suero de quesería en polvo reconstituido al 10 % p/p (suero de quesería) como medio de suspensión del fago, que posteriormente fue depositado y secado en placas de vidrio en estas condiciones.

### 3.2.6. Combinación de tecnologías

En el presente capítulo, se combinaron diversas tecnologías de inactivación tomando como modelo de estudio al fago MLC-A, para conocer si sería posible incrementar las tasas de inactivación alcanzadas. En un primer experimento, una placa de vidrio borosilicato con la suspensión fágica (concentración de  $1,07 \times 10^7$  UFP/ml) depositada fue sometida a radiación UV-C (1 lámpara, flujo de radiación de  $1,05 \times 10^{-3}$  W/cm<sup>2</sup>) por 10 min en las condiciones antes mencionadas y luego tratada con ozono gaseoso (10 ppm base volumétrica), colocando la placa dentro de una cámara hermética B-Logic (FDC Diseños y Desarrollos SRL, Córdoba, Argentina) por un tiempo total de 15 min (90 % HR). En otro experimento, el fago MLC-A se depositó en una placa de vidrio borosilicato recubierta con TiO<sub>2</sub>. Esta placa conteniendo la suspensión fágica fue sometida a radiación UV-C por 10 min y posteriormente a un tratamiento en presencia de radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm, siete lámparas, 90 % HR), por un tiempo total de 1,5 h. Para realizar esta segunda etapa en el proceso de inactivación, que involucra un cambio en la longitud de onda de la radiación incidente, se empleó el mismo reactor fotocatalítico, cambiando las lámparas en el sistema de emisión de radiación. Paralelamente, en cada etapa de estas estrategias combinadas, otras placas con la suspensión fágica depositada, sin tratamiento con radiación UV-C, fueron colocadas dentro del reactor fotocatalítico irradiado con UV-A y dentro de la cámara de ozono, para controlar la variación en la concentración fágica alcanzada con cada tecnología individual. Los tiempos de tratamiento fueron seleccionados considerando resultados previos empleando estas tecnologías (Briggiler Marcó et al., 2011, 2021; Lloréns, 2024), considerando un tiempo para el cual se alcanzó una reducción considerable, pero no completa, en el título fágico.

### 3.2.7. Análisis estadístico

Los ensayos de inactivación fágica se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía, con un criterio de  $p < 0,05$  para detectar diferencias significativas. Para comparar las medias obtenidas para diversos parámetros

(reducciones logarítmicas,  $t_{99}$ ), se utilizó el Test de Tukey. Estos análisis se realizaron utilizando el software R.

### **3.3. Resultados**

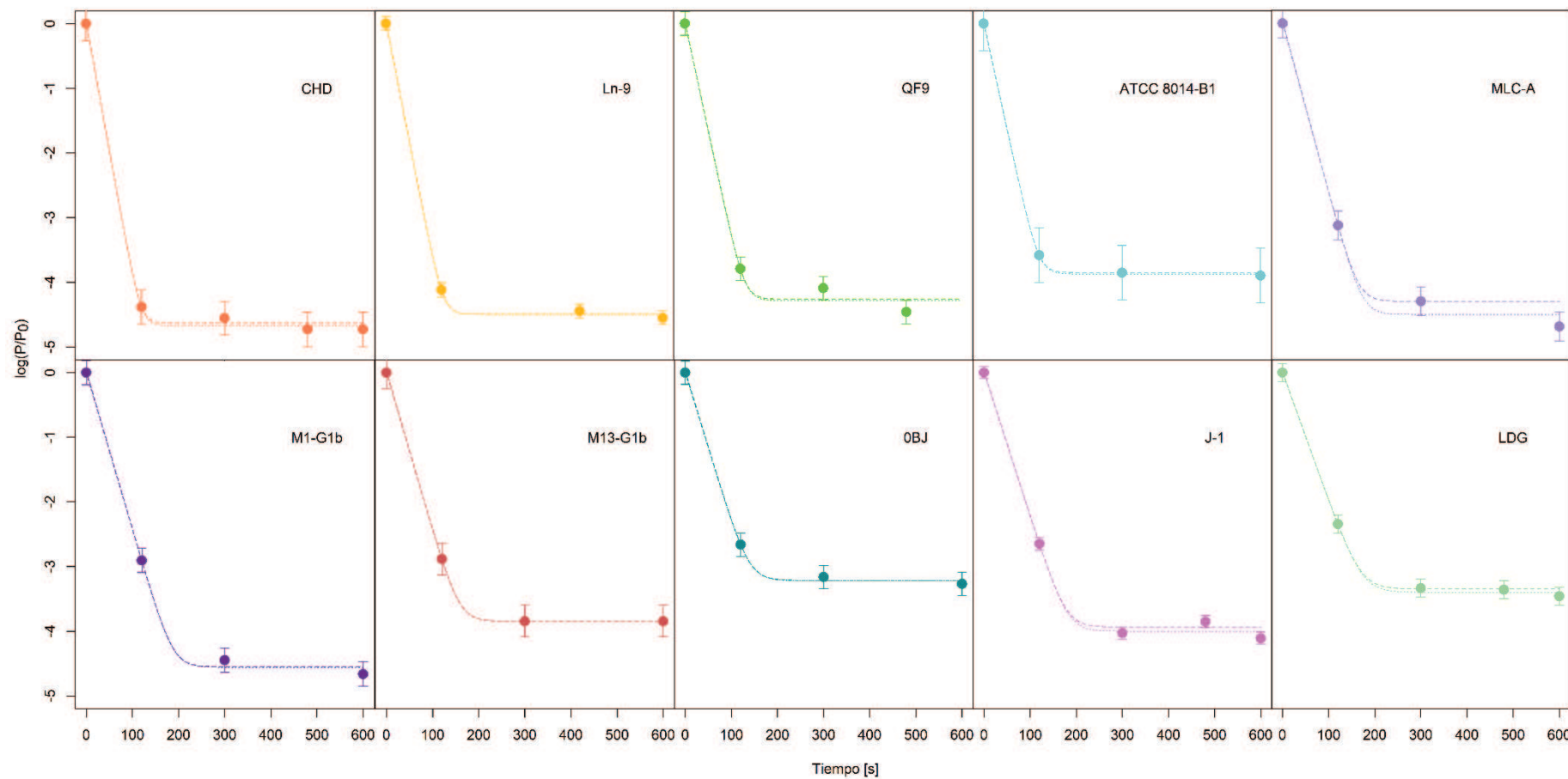
#### **3.3.1. Ensayos de inactivación fágica**

Se realizaron los ensayos de inactivación fágica sometiendo a los dieciséis fagos a un tratamiento con radiación UV-C ( $\lambda = 200 - 280 \text{ nm}$ ) por 10 min, de acuerdo a lo explicado en la Sección 3.2.3. El flujo de radiación utilizado en estos ensayos provino de una única lámpara germicida ubicada en el centro del reactor y el valor de flujo obtenido fue de  $1,05 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ , medido de acuerdo a lo explicado en la Sección 3.2.5.2.

De los dieciséis fagos estudiados, no se detectaron partículas infectivas de los fagos 832-B1, 892-LB, 009-ML, BYM, Ib<sub>3</sub> y Cb1/204 (límite de detección = 50 UFP/ml) luego de ser tratados por 2 min (menor tiempo de tratamiento ensayado) con una sola lámpara (dosis de  $0,13 \text{ J/cm}^2$ ), logrando reducciones fágicas mayores a 3,30 órdenes log, calculadas como la diferencia entre la concentración inicial y el límite de detección, ya que no se detectaron partículas fágicas infectivas en ningún tiempo distinto del inicial.

Las curvas de inactivación correspondientes a los diez fagos restantes se presentan en la Figura 3.1, como  $\log(P/P_0)$  vs tiempo [s], donde  $P$  [UFP/ml] es el número de fagos infectivos después del tiempo de exposición  $t$  [s] y  $P_0$  [UFP/ml] es el número inicial de fagos. Los títulos iniciales (previos al tratamiento) para los diez fagos fueron en promedio de  $7,11 \pm 0,79 [\log(\text{UFP/ml})]$ . A diferencia del Capítulo 2 en el que los resultados se graficaron como  $\log P$  en función del tiempo, en este capítulo se presentan en unidades de  $\log(P/P_0)$  en función del tiempo, ya que la mayoría de los modelos cinéticos propuestos en la Sección 3.2.4 son expresados en dichas unidades.

Estos diez fagos (CHD, Ln-9, ATCC 8014-B1, QF9, M1-G1b, M13-G1b, MLC-A, LDG, J-1 y 0BJ) alcanzaron una reducción logarítmica entre 2,34 (para el fago LDG) y 4,38 órdenes log (para el fago CHD) a los dos minutos de tratamiento, demostrando una elevada inactivación a los pocos minutos del ensayo, lo que se ve reflejado en un alto valor de la pendiente inicial en todas las curvas de inactivación (Figura 3.1). Esta reducción logarítmica parcial, se calculó como la diferencia entre los títulos obtenidos para el tiempo inicial y la primera muestra tomada (a los 2 min).



**Figura 3.1.** Resultados experimentales ( $\log(P/P_0)$  vs tiempo [s]) para cada fago (puntos), ajustados con los modelos de Geeraed (líneas entrecortadas) y de Baranyi y Roberts (líneas punteadas), que mostraron el mejor ajuste (menor RMSE). El eje x varía entre 0 y 600 s, donde el límite superior (600 s) es equivalente a una dosis de radiación de 0,63 J/cm<sup>2</sup>.

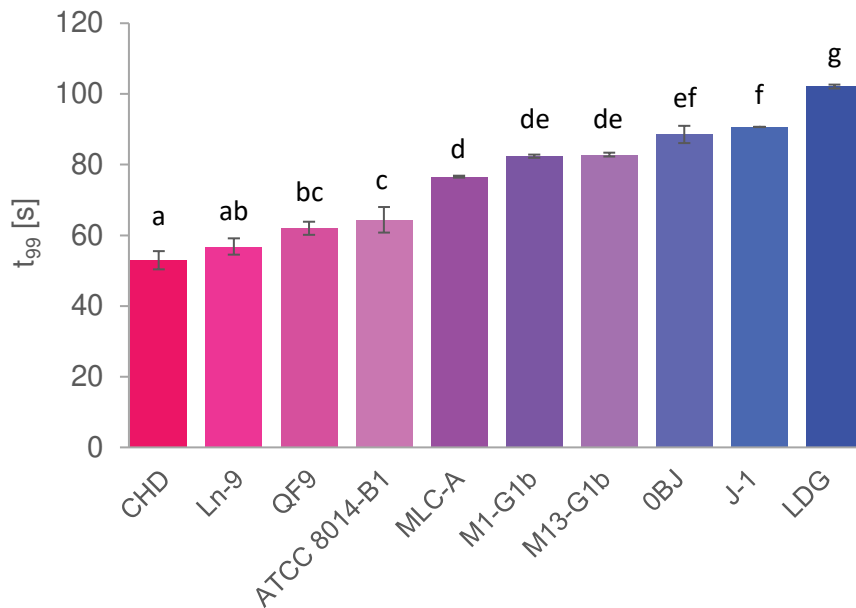
Sin embargo, la caída en la infectividad fágica entre el segundo y tercer punto de la curva fue considerablemente menor (0,17 – 1,54 órdenes log), con lo cual las pendientes de las curvas comienzan a aplanarse para todos los fagos. Esta tendencia se continúa observando en los puntos siguientes, hasta que la curva se vuelve prácticamente plana, mostrando un claro efecto de cola. Cabe mencionar que graficar los resultados como  $\log P/P_0$  en función del tiempo también facilita la comparación entre los valores finales de las colas en las distintas experiencias, ya que todas las curvas parten del mismo valor inicial ( $\log(P/P_0) = 1$ ).

Como se mencionó en el Capítulo 2, los fagos, una vez depositados sobre la placa, no perdieron infectividad a lo largo del tiempo, cuando fueron estudiados en oscuridad por 20 h por lo que las reducciones observadas en los títulos, en este caso, se deben puramente al efecto del tratamiento con radiación UV-C aplicado.

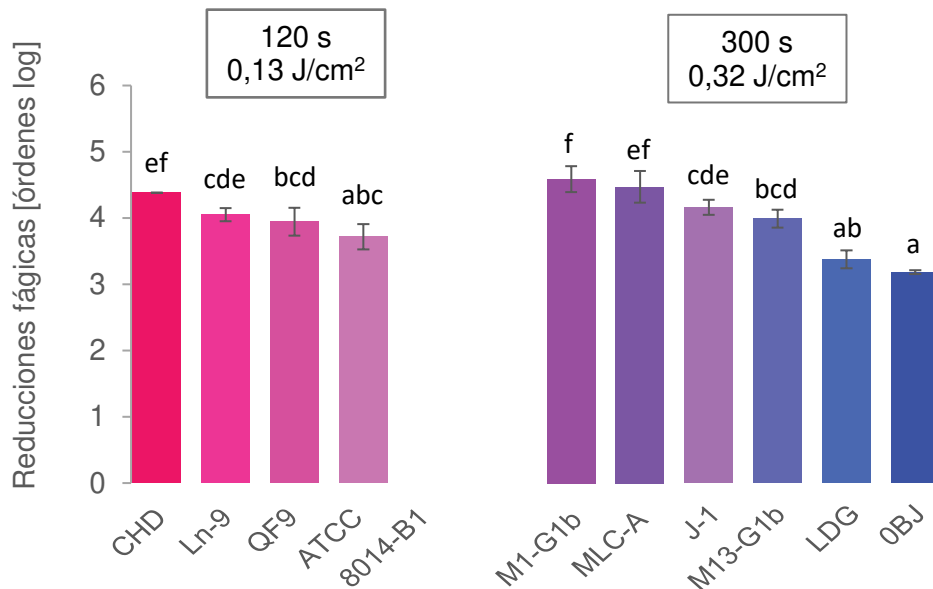
Otro parámetro útil para caracterizar la inactivación de los fagos bajo un determinado tratamiento es el tiempo en el cual se alcanza el 99 % de inactivación fágica ( $t_{99}$ ), como se mencionó y calculó en el Capítulo 2 al emplear la pintura fotocatalítica. Estos tiempos se calcularon gráficamente para los diez fagos que presentaron el efecto de cola en sus curvas de inactivación (Figura 3.1) y se muestran en orden ascendente en la Figura 3.2. De acuerdo a la Figura 3.2, el fago CHD requirió el menor tiempo (53 s) para alcanzar el 99 % de inactivación, y este valor fue significativamente diferente a los de los fagos restantes ( $p < 0,05$ ), excepto por el valor de  $t_{99}$  del fago Ln-9, con el cual no se observaron diferencias significativas, con un 95 % de nivel de confianza. Por el contrario, el fago LDG necesitó del mayor tiempo entre los fagos ensayados (102 s) para alcanzar el 99 % de inactivación, presentando diferencias significativas con los tiempos calculados para los fagos restantes, con un 95 % de nivel de confianza. El análisis estadístico realizado comparando las medias de los valores de los  $t_{99}$  para los diez fagos se muestra en la Figura 3.2, donde letras distintas indican diferencias significativas, con un 95 % de nivel de confianza.

Las reducciones logarítmicas se determinaron para cada fago a partir de la Figura 3.1, considerando el punto inicial de la curva de inactivación y el primer punto de muestreo donde el efecto de cola se comienza a evidenciar, como se mencionó previamente. Estos valores representan a las reducciones máximas alcanzadas por cada fago sometido a esta tecnología y se graficaron en la Figura 3.3, agrupadas por el tiempo (y la dosis) a la cual alcanzaron las reducciones graficadas. Se puede observar que los fagos J-1, LDG, MLC-A, M1-G1b, M13-G1b y OBJ requirieron un tratamiento ligeramente más largo (300 s), o más intenso en caso de la dosis (0,32 J/cm<sup>2</sup>), que el resto de los fagos para alcanzar el efecto de cola, según lo demostrado mediante el agrupamiento de la Figura 3.3 y en concordancia con lo observado en la Figura 3.1. A

partir del tiempo 120 o 300 s, dependiendo del fago, la concentración del fago permaneció constante, entre los valores  $2,00 \times 10^2$  y  $3,75 \times 10^3$  UFP/ml.



**Figura 3.2.** Tiempo a los cuales se alcanza el 99 % de inactivación ( $t_{99}$ ) para cada fago. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.3.** Reducciones logarítmicas en la infectividad de cada fago, agrupados según el tiempo y dosis aplicados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los fagos que mostraron una menor reducción son aquellos para los cuales el efecto de cola apareció a un valor de  $\log(P/P_0)$  mayor en la curva de inactivación, en comparación con los fagos que exhibieron una mayor reducción logarítmica. Por lo tanto,

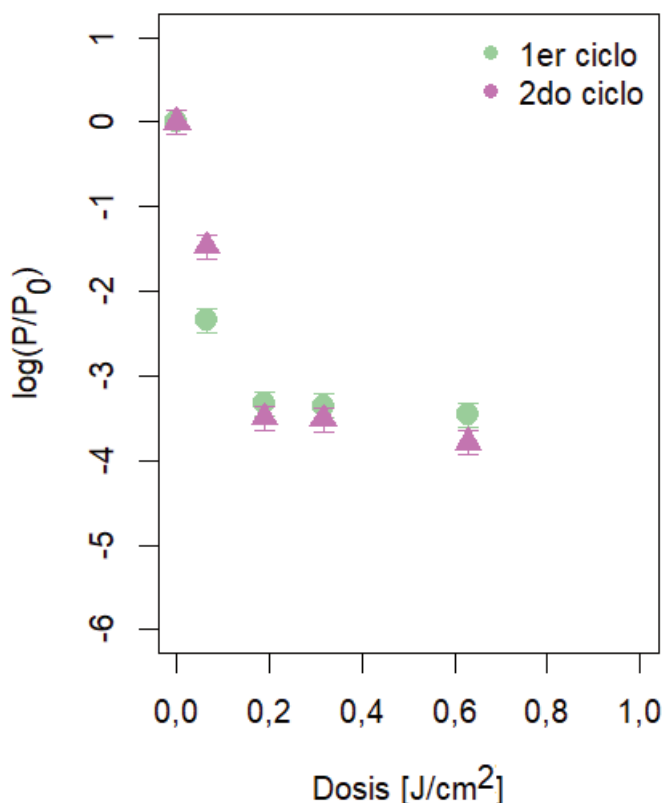
con una reducción logarítmica menor, un mayor número de partículas fágicas permanecen infectivas al final del tratamiento. Los fagos CHD, Ln-9, QF9 y ATCC 8014-B1, pertenecientes al grupo de fagos que alcanzaron su máxima inactivación a 120 s ( $0,13 \text{ J/cm}^2$ ), mostraron reducciones en el rango de 3,58 a 4,38 órdenes log, mientras los fagos M1-G1b, MLC-A, J-1, M13-G1b, LDG y 0BJ, pertenecientes al grupo que alcanzaron su máxima inactivación a 300 s ( $0,32 \text{ J/cm}^2$ ), evidenciaron reducciones en el rango de 3,16 a 4,45 órdenes log. Es importante notar que el fago CHD presentó una de las mayores reducciones (4,38 órdenes log), alcanzada al aplicar el tratamiento durante el menor tiempo ensayado (120 s), en línea con lo explicado previamente con los  $t_{99}$ . De hecho, las reducciones logarítmicas alcanzadas por el fago CHD no presentaron diferencias significativas con las alcanzadas por el fago M1-G1b, el fago con la mayor reducción lograda en presencia de una dosis de  $0,32 \text{ J/cm}^2$ , con un 95 % de nivel de confianza. Más aún, los fagos 0BJ y LDG presentaron las menores reducciones (3,16 y 3,33 órdenes log, respectivamente) y fueron alcanzadas a los 300 s de tratamiento (mayor tiempo testeado), estando también estas conclusiones en línea con los valores de  $t_{99}$ , ya que los fagos 0BJ, J-1 y LDG requirieron tiempos de tratamiento mayores para reducir en un 99 % su infectividad. Además, los fagos 0BJ, LDG y ATCC 8014-B1 exhibieron las menores reducciones en los títulos, sin presentar diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ). La comparación entre los valores de los promedios de las reducciones logarítmicas logradas para todos los fagos se muestra en la Figura 3.3, donde letras iguales denotan que no existen diferencias significativas, con un 95 % de nivel de confianza.

Al comparar el orden de los fagos por sus reducciones logarítmicas (Figura 3.3) con el orden de los fagos ordenados por sus valores de  $t_{99}$  (Figura 3.2), se observa que el orden no es el mismo en ambos casos. Esto no es una contradicción entre las conclusiones, ya que son parámetros que representan diferentes fenómenos, y ambos deben ser tenidos en cuenta al momento de diseñar los equipos para estas tecnologías. Por un lado, el parámetro  $t_{99}$  brinda información sobre la velocidad en la que los fagos son inactivados. En el caso de estas curvas que presentaron efecto de cola, los fagos con  $t_{99}$  más bajos son aquellos con una mayor pendiente al inicio de la curva (CHD y Ln-9), mientras que los fagos con mayores  $t_{99}$  son los que presentaron una pendiente menos pronunciada al comienzo de la curva (J-1, LDG). Por el otro lado, las reducciones logarítmicas representan la proporción de fagos que fueron inactivados, otorgando información sobre la cantidad de fagos que permanecieron infectivos al finalizar el tratamiento. Por lo tanto, los fagos con una mayor reducción logarítmica (M1-G1b, CHD) fueron los que más se inactivaron, presentando la cola en la curva de inactivación a un valor menor en el eje de ordenadas de la Figura 3.1 ( $\log(P/P_0)$ ), mientras que los fagos

con una reducción logarítmica menor (LDG, 0BJ) fueron inactivados en menor medida, presentando su cola a un valor mayor en el eje Y de la Figura 3.1. Este parámetro no toma en cuenta la velocidad o tasa de inactivación como sí lo hace el parámetro  $t_{99}$ , sino que solamente contempla los títulos iniciales y finales.

#### 3.3.1.1. Segundo ciclo de radiación UV-C

Para evaluar si la causa del efecto de cola radica en que los fagos adquirieron resistencia contra la radiación UV-C, un segundo ciclo de tratamiento se realizó para los fagos MLC-A y LDG. Luego de realizar la enumeración fágica para el segundo ciclo de tratamiento con radiación UV-C, se graficaron los valores obtenidos como  $\log(P/P_0)$  en función del tiempo y se observó que las curvas de inactivación presentaron la misma forma (incluida la cola) que luego del primer ciclo. Por lo tanto, se podría decir que los fagos MLC-A y LDG mostraron el mismo comportamiento tanto en el primer como en el segundo ciclo de inactivación, ya que no se observó ni una inactivación completa ni una mayor resistencia frente a la inactivación con radiación UV-C luego del segundo ciclo de radiación, en ninguno de los ensayos propuestos en la Sección 3.2.3.1 (placas de lisis levantadas y depositadas o placas de lisis levantadas, propagadas y depositadas sobre la placa de vidrio). A modo ilustrativo, las curvas de inactivación para el fago LDG tanto para el primer ciclo de tratamiento (curva de inactivación mostrada en la Figura 3.1) como para el segundo ciclo de radiación se muestran en la Figura 3.4.



**Figura 3.4.** Curvas de inactivación para el fago LDG al aplicarle un ciclo de radiación (●) y dos ciclos de radiación (▲).

### 3.3.2. Ajuste de modelos cinéticos

Los modelos cinéticos propuestos en la Sección 3.2.4 se ajustaron a los datos experimentales mediante un parámetro de optimización no lineal. Los RMSE para todos los modelos ajustados se muestran en la Tabla 3.1, siendo los modelos de Geeraerd y de Baranyi y Roberts los que mejor ajustaron los datos, ya que presentaron los menores RMSE (entre  $6,86 \times 10^{-6}$  y 3,54 %) y describen adecuadamente el comportamiento de las curvas de inactivación experimentales. Los parámetros ajustados para ambos modelos se muestran en la Tabla 3.1 para cada fago, y las curvas de estos modelos se muestran en la Figura 3.1. Además de los valores de RMSE, es importante analizar la precisión de los modelos, comparando el comportamiento real de los fagos con el predicho por el modelo. Algunos modelos, como Weibull o Hom por ejemplo, no presentaron grandes valores de RMSE pero sí un pequeño valle en la curva de inactivación entre los puntos correspondientes a los tiempos 60 y 120 s (en la unión entre la parte de decaimiento exponencial de la curva y la cola de la misma). Como no se obtuvieron datos experimentales en esta región, los RMSE que se estimaron con estos modelos fueron bajos, pero probablemente poco exactos. Por lo tanto, a pesar de presentar un valor de RMSE bajo, estas curvas no representan de una forma realista el

sistema, ya que los fagos no se comportaron experimentalmente de esa manera cuando fueron expuestos a radiación UV-C.

Con respecto al modelo de Geeraerd, el parámetro  $SL$  representa la longitud del hombro, como se explicó en la Sección 3.2.4.5. Dado que no se observó el efecto de hombro para ninguno de los fagos ensayados, este parámetro se consideró igual a cero para el ajuste de todos los fagos. Como se explicó previamente,  $P_0$  representa el número inicial de fagos en el modelo y  $P_{res}$  representa la concentración de fagos que permanecen infectivos al final del tratamiento. Como el modelo de Geeraerd fue ajustado a partir de la Ecuación (3.7) para independizarlo del valor de  $P_0$ , la relación entre ambos fue obtenida como parámetro cinético ( $P_{res}/P_0$ , Tabla 3.2). Al comparar el parámetro estimado  $P_{res}/P_0$  con la relación de la concentración de la cola ( $P_{res}$ ) y la concentración inicial ( $P_0$ ) experimentales para cada fago, se observó que el error relativo entre los valores experimentales y los estimados por el modelo estuvieron en el rango entre  $1,62 \times 10^{-2}$  y 11,01 %. El error relativo fue calculado como la relación porcentual entre la diferencia de  $P_{res}/P_0$  experimental y  $P_{res}/P_0$  estimado. Como se explicó anteriormente, en el modelo de Baranyi y Roberts el parámetro  $P_0$  también representa el número inicial de los fagos y  $P_{min}$  representa la concentración remanente de fagos infectivos al final del tratamiento, al igual que  $P_{res}$  en el modelo de Geeraerd. Como se muestra en la Tabla 3.2, este modelo también fue ajustado considerando la relación  $P_{min}/P_0$  como parámetro cinético. Comparando el parámetro estimado  $P_{min}/P_0$  con la relación entre la concentración remanente ( $P_{min}$ ) experimental y la concentración inicial ( $P_0$ ) experimental de cada fago, se observó que el error relativo entre los valores experimentales y los estimados se encontró en el rango entre  $1,42 \times 10^{-2}$  y 8,25 %.

**Tabla 3.1.** Valores de RMSE para todos los modelos cinéticos ajustados con los datos experimentales de los fagos ensayados.

|                     | RMSE [%]              |                       |                       |                   |                       |                       |                       |                       |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                     | Weibull               | Weibull-tail          | Log-logistic          | Modified Gompertz | Geeraerd              | Modified Chick-Watson | Hom                   | Baranyi and Roberts   |
| <b>CHD</b>          | 0,93                  | 0,93                  | 5,28                  | 5,28              | 1,53                  | 5,28                  | 0,93                  | 1,33                  |
| <b>Ln-9</b>         | 0,07                  | 0,07                  | $4,86 \times 10^{-4}$ | 4,80              | 0,96                  | 4,80                  | 0,45                  | 0,96                  |
| <b>QF9</b>          | 2,03                  | 2,03                  | 10,14                 | 8,88              | 3,52                  | 8,88                  | 2,03                  | 3,52                  |
| <b>ATCC 8014-B1</b> | 1,15                  | 3,36                  | $1,76 \times 10^{-3}$ | 4,50              | 0,49                  | 3,36                  | 1,06                  | $3,45 \times 10^{-6}$ |
| <b>MLC-A</b>        | 3,16                  | $5,96 \times 10^{-5}$ | 12,35                 | 12,35             | 3,54                  | 12,35                 | 3,16                  | $6,86 \times 10^{-6}$ |
| <b>M1-G1b</b>       | 9,32                  | 23,76                 | 23,76                 | 23,76             | 1,91                  | 23,76                 | 9,32                  | 1,91                  |
| <b>M13-G1b</b>      | 6,95                  | 0,03                  | 14,76                 | 14,76             | $1,50 \times 10^{-3}$ | 14,76                 | 6,95                  | $1,37 \times 10^{-3}$ |
| <b>OBJ</b>          | $8,50 \times 10^{-4}$ | $5,61 \times 10^{-5}$ | 6,62                  | 6,62              | 1,34                  | 6,62                  | $1,26 \times 10^{-4}$ | 1,34                  |
| <b>J-1</b>          | 0,13                  | 0,14                  | 11,76                 | 11,76             | 2,31                  | 11,76                 | 0,14                  | 1,58                  |
| <b>LDG</b>          | 3,73                  | 0,86                  | 10,39                 | 10,85             | 1,52                  | 10,85                 | 4,16                  | 0,27                  |

**Tabla 3.2.** Parámetros de ajuste de los modelos de Geeraerd y Baranyi y Roberts para los distintos fagos.

|                     | Geeraerd                        |                      | Baranyi y Roberts               |                      |
|---------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|
|                     | $P_{res}/P_0$<br>[adimensional] | $k_{max}$<br>[1/s]   | $P_{min}/P_0$<br>[adimensional] | $k_{max}$<br>[1/s]   |
| <b>CHD</b>          | $2,14 \times 10^{-5}$           | $9,0 \times 10^{-2}$ | $2,31 \times 10^{-5}$           | $9,1 \times 10^{-2}$ |
| <b>Ln-9</b>         | $3,16 \times 10^{-5}$           | $8,4 \times 10^{-2}$ | $3,17 \times 10^{-5}$           | $8,4 \times 10^{-2}$ |
| <b>QF9</b>          | $5,18 \times 10^{-5}$           | $7,6 \times 10^{-2}$ | $5,47 \times 10^{-5}$           | $7,7 \times 10^{-2}$ |
| <b>ATCC 8014-B1</b> | $1,33 \times 10^{-4}$           | $7,5 \times 10^{-2}$ | $1,40 \times 10^{-4}$           | $7,5 \times 10^{-2}$ |
| <b>MLC-A</b>        | $3,14 \times 10^{-5}$           | $6,0 \times 10^{-2}$ | $5,02 \times 10^{-5}$           | $6,1 \times 10^{-2}$ |
| <b>M1-G1b</b>       | $2,77 \times 10^{-5}$           | $5,6 \times 10^{-2}$ | $2,82 \times 10^{-5}$           | $5,6 \times 10^{-2}$ |
| <b>M13-G1b</b>      | $1,43 \times 10^{-4}$           | $5,6 \times 10^{-2}$ | $1,43 \times 10^{-4}$           | $5,7 \times 10^{-2}$ |
| <b>0BJ</b>          | $6,09 \times 10^{-4}$           | $5,4 \times 10^{-2}$ | $6,13 \times 10^{-4}$           | $5,4 \times 10^{-2}$ |
| <b>J-1</b>          | $1,00 \times 10^{-4}$           | $5,1 \times 10^{-2}$ | $1,16 \times 10^{-4}$           | $5,2 \times 10^{-2}$ |
| <b>LDG</b>          | $4,00 \times 10^{-4}$           | $4,6 \times 10^{-2}$ | $4,51 \times 10^{-4}$           | $4,6 \times 10^{-2}$ |

Analizando el parámetro  $k_{max}$ , que representa la pendiente de la porción exponencial de la curva en ambos modelos, los valores se encontraron entre 0,046 (fago LDG) y 0,091 1/s (fago CHD), para ambos modelos (Tabla 3.2). Prácticamente no se observaron diferencias entre los valores de  $k_{max}$  obtenidos con un modelo u otro, para todos los fagos. Los valores extremos del rango de  $k_{max}$  fueron consistentes con lo observado previamente, ya que el fago LDG mostró el menor valor de  $k_{max}$ , y, por lo tanto, la menor tasa de inactivación; siendo el más resistente entre los fagos ensayados, con mayores valores de  $P_{res}$  y  $P_{min}$ , que indican que la cola se encuentra ubicada más arriba en el eje de las ordenadas. Por el contrario, el fago CHD mostró una elevada reducción en órdenes log, presentando su cola a valores más bajos de  $P/P_0$  en el gráfico, lo que se traduce en una mayor sensibilidad. Además, presentó el mayor valor de  $k_{max}$  entre los fagos testeados, lo que indica una rápida inactivación inicial. Los fagos ordenados por los valores de  $k_{max}$ , desde el mayor (CHD, el fago más sensible) hacia el menor (LDG, el fago más resistente) siguen la misma secuencia que para los  $t_{99}$ . Esto se debe a que el parámetro  $k_{max}$  se correlaciona con la pendiente de la primera parte de la curva de inactivación (pendiente pronunciada), que es la región de la curva utilizada para calcular el parámetro  $t_{99}$ , es decir, donde se alcanza el 99 % de inactivación (53 – 102 s).

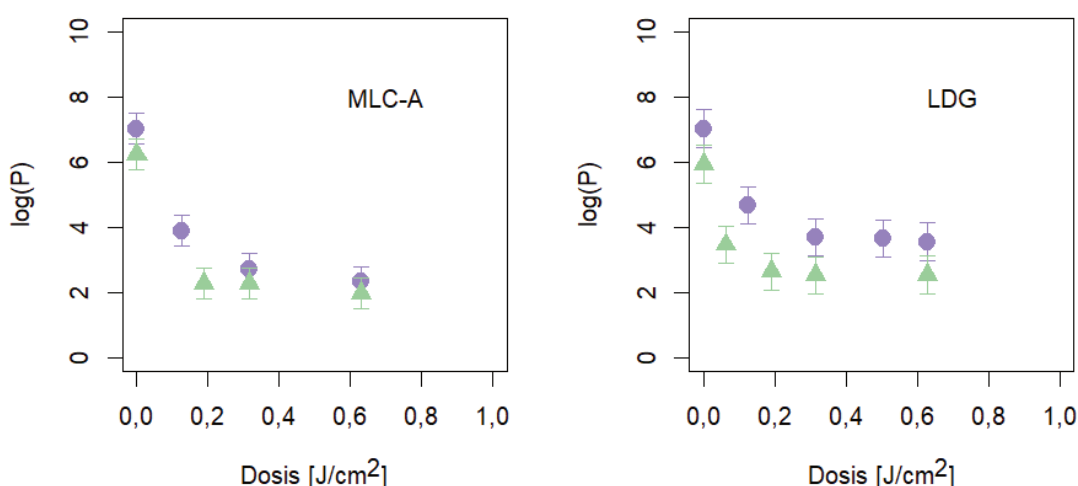
Todo esto, en conjunto con los bajos valores de RMSE (entre  $1,5 \times 10^{-3}$  y 3,54 % para Geeraerd y entre  $6,86 \times 10^{-6}$  y 3,52 % para Baranyi y Roberts) indica un muy buen ajuste de ambos modelos a los datos experimentales, como también puede observarse en la Figura 3.1.

### 3.3.3. Variación de condiciones de operación

#### 3.3.3.1. Concentraciones fágicas iniciales

Con el fin de interpretar adecuadamente el efecto de cola observado, se plantea como posible explicación la presencia de un efecto de sombra entre los fagos. En otras palabras, al depositar una gran cantidad de partículas fágicas sobre una misma superficie, la radiación alcanzaría solo la capa superior, mientras que las partículas ubicadas por debajo quedarían protegidas y, en consecuencia, sin inactivarse, dando lugar al mencionado efecto de cola. Para determinar si existe un efecto de sombra, se realizaron ensayos con concentraciones fágicas iniciales menores a los ya descriptos ( $1,07 \times 10^7$  UFP/ml). La nueva concentración inicial no podría ser menor a  $1,00 \times 10^6$  UFP/ml, ya que, si se alcanzara una reducción similar a la lograda en los ensayos previos con títulos iniciales mayores, este valor dificultaría la enumeración fágica, ya que los títulos estarían muy cerca del límite de detección, complicando la detección de las partículas fágicas y, como consecuencia, imposibilitando determinar si la cola está o

no presente. Por lo tanto, las concentraciones fágicas iniciales para estos ensayos fueron  $3,60 \times 10^6$  UFP/ml para el fago LDG y  $1,70 \times 10^6$  UFP/ml para el fago MLC-A. Previamente, los ensayos se habían realizado con títulos iniciales de  $1,07 \times 10^7$  UFP/ml para ambos fagos (Sección 3.3.1). Los resultados obtenidos con ambas concentraciones iniciales para los dos fagos se muestran en la Figura 3.5, en la que se percibe también el efecto de cola al trabajar con títulos iniciales más bajos. En esta figura los valores están graficados como  $\log(P)$  vs dosis para poder observar el efecto al variar la concentración inicial de fagos ( $P_0$ ). Estos resultados indican que el efecto de cola se continúa observando cuando el tratamiento comienza con concentraciones fágicas menores, lo que sugiere que el efecto de cola no sería causado por el efecto de sombra entre las partículas fágicas, o que el efecto de sombra aún persistiría trabajando con las concentraciones iniciales menores ensayadas.



**Figura 3.5.** Curvas de inactivación ( $\log(P)$  vs dosis) de los fagos MLC-A y LDG con diferentes concentraciones iniciales. Símbolo ●: curvas con concentración inicial original (aproximadamente  $10^7$  UFP/ml, mostradas previamente en Figura 3.1). Símbolo ▲: ensayos con menor concentración inicial, de aproximadamente  $10^6$  UFP/ml.

### 3.3.3.2. Flujo de radiación

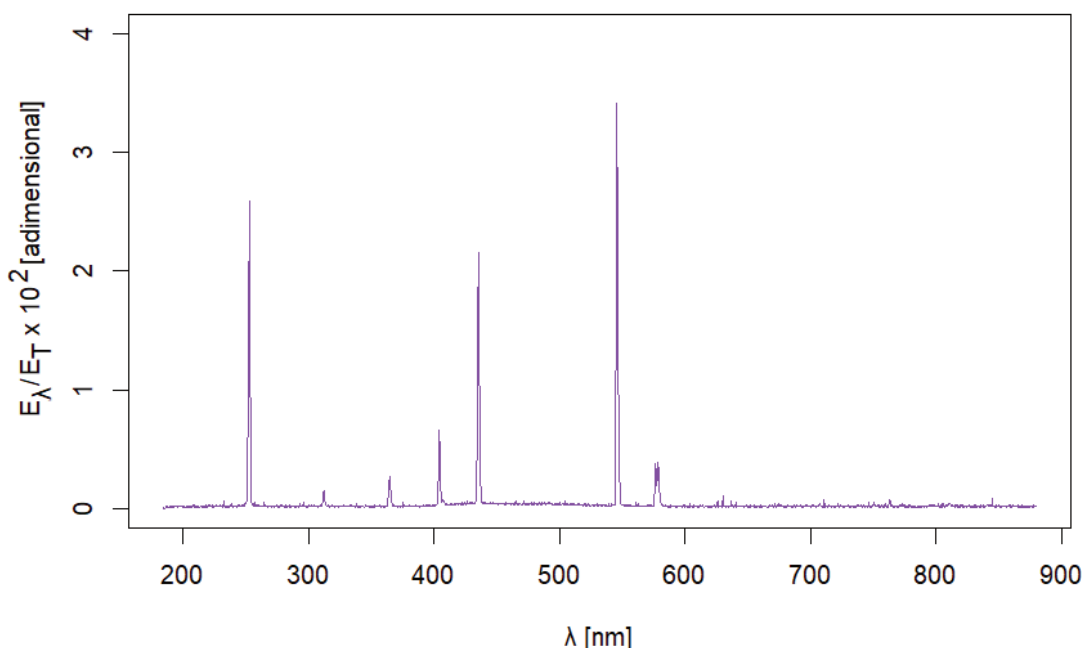
De acuerdo a la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe (Bunsen y Roscoe, 1857), al incrementar el número de lámparas se esperarían tiempos de tratamiento más cortos. Esto se debe a que, para alcanzar un mismo nivel de inactivación manteniendo la dosis, un nivel de radiación mayor permitirá lograr la inactivación en menor tiempo. En contraste, cuando se emplean flujos de radiación menores, serían necesarios tiempos de tratamiento más prolongados para obtener el mismo efecto.

Como se explicó anteriormente, para analizar la influencia del flujo de radiación incidente en las tasas de inactivación fágica, se modificó dicho flujo, ya sea incrementándolo a través del empleo de un mayor número de lámparas en el reactor

(tres lámparas en lugar de una), o disminuyéndolo mediante el empleo de una malla metálica ubicada entre una única lámpara y las muestras, a fin de atenuar la radiación que reciben las mismas. Se ensayó y comparó la inactivación bajo diferentes condiciones de flujo de radiación y de tiempo de exposición de tal manera que la dosis recibida, que resulta del producto entre el flujo de radiación y el tiempo, sea la misma.

Los valores de flujo de radiación incidente neto utilizando tres lámparas UV-C y una lámpara UV-C con y sin la malla metálica se midieron según el procedimiento explicado en la Sección 3.2.5.2. El valor del flujo de radiación incidente a 254 nm utilizando una lámpara UV-C sin la malla metálica fue de  $1,05 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ , mientras que el valor correspondiente utilizando la malla metálica fue de  $4,42 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$  y para las tres lámparas resultó en  $2,95 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ . La dosis fue calculada por radiometría, multiplicando las mediciones de los flujos de radiación por los tiempos de exposición.

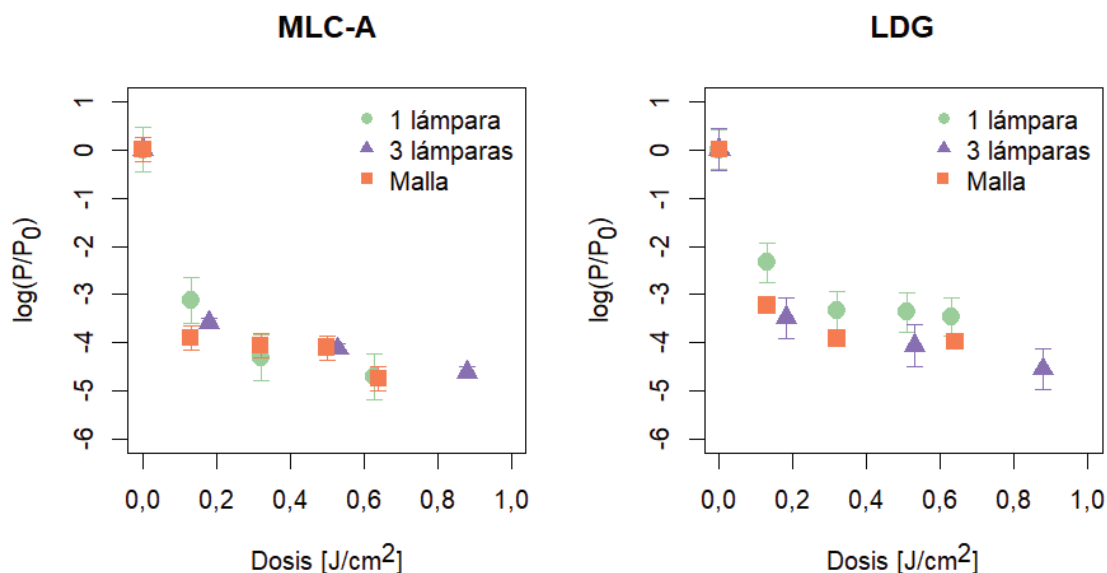
En la Figura 3.6 se muestra la distribución de la emisión espectral ( $E_\lambda/E_T$ ) de las lámparas UV-C, la cual se corresponde con los picos de emisión característicos de las lámparas de mercurio, incluyendo el pico a la longitud de onda de 254 nm.



**Figura 3.6.** Distribución de la emisión espectral de las lámparas UV-C.

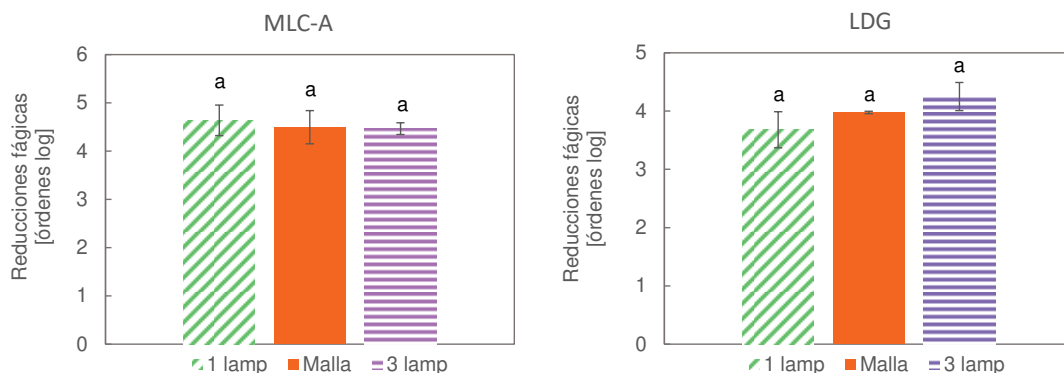
De acuerdo a la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe, una reacción fotoquímica es directamente proporcional a la dosis energética total, sin importar el tiempo en el cual dicha dosis es entregada (Bunsen y Roscoe, 1857). Entonces, para verificar si los fagos ensayados obedecen esta ley, se llevaron a cabo ensayos con distintos flujos de radiación, pero similares dosis. En otras palabras, para mantener la dosis, cuando se disminuyó la radiación incidente, fue necesario prolongar el tiempo de tratamiento y viceversa.

Los datos experimentales  $\log(P/P_0)$  se graficaron vs la dosis [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ] y se muestran en la Figura 3.7. La misma curva de inactivación y el efecto de cola se observó en todas las configuraciones del sistema. Por otro lado, al mantener la dosis no se observaron diferencias significativas entre las reducciones logarítmicas obtenidas al alcanzar la cola, a partir de las tres curvas, para ambos fagos, con un 95 % de nivel de confianza (Figura 3.8). Esto muestra que los fagos LDG y MLC-A obedecen la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe, dado que la fracción de virus infectivos luego del tratamiento con UV-C no se vio afectada por cambios en el flujo de radiación ni en el tiempo de exposición, siempre y cuando permanecieran recíprocos. Teniendo esto en cuenta y recordando que la dosis es el producto de la radiación incidente por el tiempo, se concluye que, para lograr una inactivación equivalente a la alcanzada con un flujo de radiación mayor, será necesario prolongar el tratamiento si se utiliza un flujo de radiación menor, de manera de alcanzar la dosis requerida.



**Figura 3.7.** Curvas de inactivación para los fagos MLC-A y LDG,  $\log(P/P_0)$  vs dosis [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ], bajo diversos flujos de radiación.

Asimismo, los fagos MLC-A y LDG se ensayaron bajo dosis mayores, empleando tres lámparas UV-C durante 60 y 120 min, para comprobar si el efecto de cola aún continuaba presente. Efectivamente, las colas continuaron apareciendo luego de tratar los fagos con dosis de 10,61 y 21,22  $\text{J}/\text{cm}^2$ , con valores de  $P/P_0$  de  $8,3 \times 10^{-6}$  y  $3,6 \times 10^{-6}$ , respectivamente para el fago MLC-A y valores de  $1,3 \times 10^{-5}$  y  $6,3 \times 10^{-6}$ , respectivamente para el fago LDG para la cola.



**Figura 3.8.** Reducciones logarítmicas obtenidas al alcanzar el efecto de cola trabajando a distintos niveles de flujo de radiación para los fagos MLC-A y LDG. Letras iguales en cada recuadro indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

De igual manera que en la Sección 3.3.2, los resultados obtenidos variando el flujo de radiación fueron ajustados utilizando un modelo cinético. En este caso, se empleó el modelo de Geeraerd, uno de los que previamente presentó el mejor ajuste. Como se explicó anteriormente, los parámetros cinéticos involucrados en este modelo son  $k_{max}$ , que representa la pendiente de la parte exponencial de la curva de inactivación, y  $P_{res}/P_0$ , que representa la relación entre el valor final de la cola y la concentración fágica inicial.

En esta oportunidad resulta de interés analizar particularmente cómo varía el parámetro cinético  $k_{max}$  con el flujo de radiación, ya que los valores de  $P_{res}/P_0$  están estrechamente vinculados con las reducciones logarítmicas analizadas previamente y hacer un análisis en este sentido no aportaría nuevas conclusiones a las ya mencionadas.

Los valores de  $k_{max}$  reportados para el flujo de radiación  $1,05 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  en la Sección 3.3.2 fueron de  $6,0 \times 10^{-2} \text{ 1/s}$  para el fago MLC-A (RMSE = 3,54 %) y  $4,6 \times 10^{-2} \text{ 1/s}$  para el fago LDG (RMSE = 1,52 %). Para ajustar el modelo de Geeraerd a los datos obtenidos al trabajar con flujos de radiación de  $2,95 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  (3 lámparas) y  $4,42 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$  (una lámpara con la malla metálica) es necesario expresar en primer lugar los resultados experimentales obtenidos para los fagos MLC-A y LDG en función del tiempo, ya que el modelo de Geeraerd utiliza este parámetro. Además, los valores de  $k_{max}$  para un flujo de radiación de  $1,05 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  fueron obtenidos ajustando el  $\log P/P_0$  en función del tiempo.

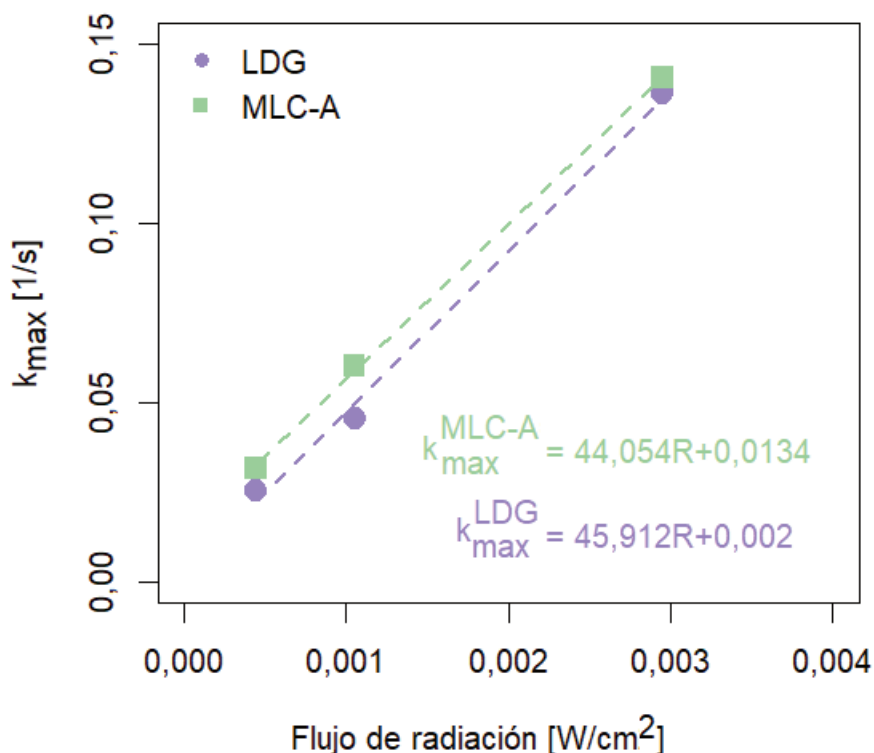
Luego de ajustar el modelo cinético de Geeraerd a los datos experimentales obtenidos al trabajar con tres lámparas y una lámpara cuya radiación fue atenuada con una malla metálica, expresados como  $\log(P/P_0)$  vs. tiempo, los valores de RMSE se encontraron entre 0,62 y 4,64 % para el fago LDG y entre 4,49 y 5,86 % para el fago

MLC-A. Los parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd ajustado se muestran en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd ajustados para los distintos flujos de radiación para ambos fagos.

|       |                 | Malla<br>( $4,42 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$ ) | 1 lámpara<br>( $1,05 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ ) | 3 lámparas<br>( $2,95 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ ) |
|-------|-----------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| MLC-A | $k_{max} [1/s]$ | $3,2 \times 10^{-2}$                              | $6,0 \times 10^{-2}$                                  | $1,4 \times 10^{-1}$                                   |
|       | $P_{res}/P_0$   | $5,0 \times 10^{-5}$                              | $3,1 \times 10^{-5}$                                  | $4,2 \times 10^{-5}$                                   |
|       | RMSE [%]        | 5,86                                              | 3,54                                                  | 4,49                                                   |
| LDG   | $k_{max} [1/s]$ | $2,5 \times 10^{-2}$                              | $4,6 \times 10^{-2}$                                  | $1,4 \times 10^{-1}$                                   |
|       | $P_{res}/P_0$   | $1,15 \times 10^{-4}$                             | $4,0 \times 10^{-4}$                                  | $4,8 \times 10^{-5}$                                   |
|       | RMSE [%]        | 0,62                                              | 1,52                                                  | 4,64                                                   |

La Figura 3.9 muestra los valores de  $k_{max}$  obtenidos para los distintos flujos de radiación. Se puede observar que un mayor valor de  $k_{max}$  se obtuvo con el mayor flujo de radiación ( $1,4 \times 10^{-1} \text{ 1/s}$  para ambos fagos), indicando una mayor velocidad de inactivación, mientras que los valores de  $k_{max}$  para el menor flujo de radiación fueron  $2,5 \times 10^{-2} \text{ 1/s}$  para el fago LDG y  $3,2 \times 10^{-2} \text{ 1/s}$  para el fago MLC-A. Una vez más, esto confirmaría que, si el flujo de radiación aumenta, la inactivación ocurrirá de forma más rápida. En otras palabras, un cierto nivel de inactivación será alcanzado en menor tiempo comparado con un tratamiento con menor flujo de radiación, como era de esperarse, ya que los fagos siguen la ley de Bunsen-Roscoe, como se explicó previamente. Más aún, la Figura 3.9 muestra que  $k_{max}$  varía linealmente con el flujo de radiación. Al ajustar estos datos con una cinética lineal se observó que el valor de  $R^2$  es muy cercano a 1 para ambos fagos. Basados en esto, es posible predecir que, al trabajar con flujos de radiación entre  $4,4 \times 10^{-4}$  y  $2,9 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ , el valor de  $k_{max}$  para ambos fagos seguirá la tendencia lineal mostrada en la Figura 3.9.

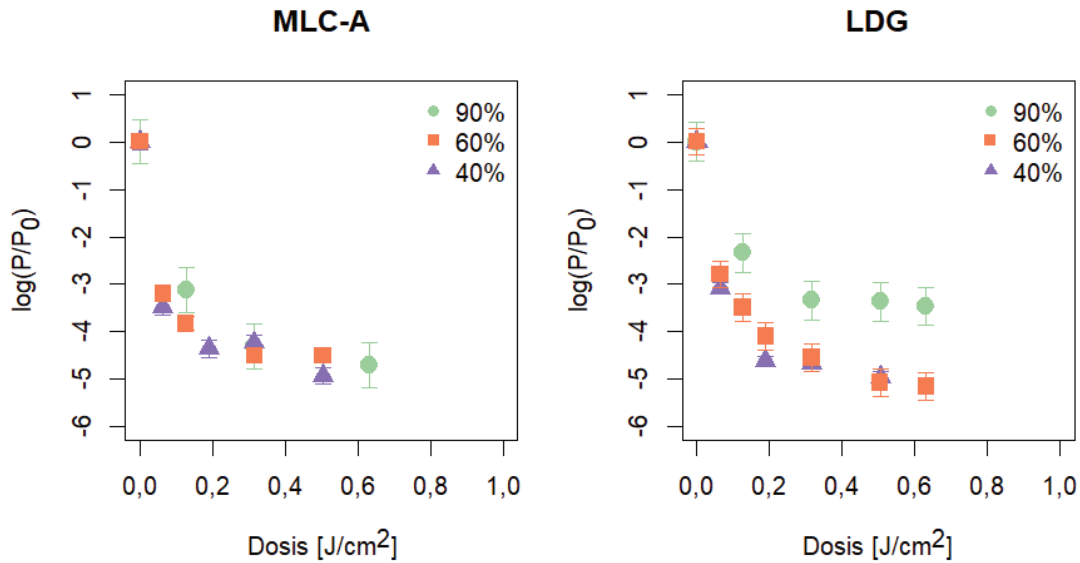


**Figura 3.9.** Variación del parámetro cinético  $k_{max}$  con el flujo de radiación UV-C.

### 3.3.3.3. Humedad relativa

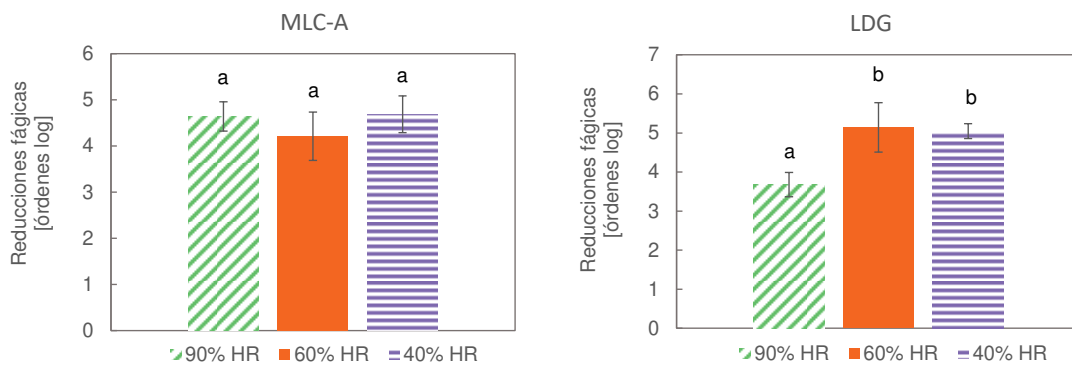
Como se explicó en la Sección 3.2.5.4, se realizaron ensayos bajo diversos valores de humedad relativa (40, 60 y 90 %) para analizar la influencia de dicho parámetro en la inactivación fágica bajo radiación UV-C. Los resultados experimentales ( $\log(P/P_0)$ ) se graficaron vs. la dosis administrada (Figura 3.10).

Para el fago MLC-A, prácticamente no se evidenció un efecto a la humedad en las curvas de inactivación en ninguna de las condiciones ensayadas. Sin embargo, cuando se estudió el fago LDG a distintos niveles de humedad relativa, se observó que presentó su menor inactivación trabajando con una humedad de 90 %, en comparación con las otras humedades relativas estudiadas. Más aún, la inactivación en efecto aumentó cuando la humedad relativa disminuyó de 90 a 60 %. Sin embargo, una mayor reducción de la humedad relativa a un valor de 40 % resultó en una curva de inactivación muy similar a la obtenida con una humedad relativa del 60 %. Por lo tanto, mientras es cierto que al disminuir la humedad relativa de 90 a 60 % se mejoró la inactivación fágica, también es cierto que a partir de un valor umbral la reducción en la humedad (de 60 a 40 %) no condujo a una mejora en la inactivación, de acuerdo a lo observado principalmente para este fago.



**Figura 3.10.** Curvas de inactivación para los fagos MLC-A y LDG,  $\log(P/P_0)$  vs dosis  $[J/cm^2]$ , para diversos valores de humedad relativa.

Realizando un análisis estadístico para las reducciones en los títulos fágicos logrados al alcanzar la cola, se verificó que no existe un efecto significativo de la humedad relativa sobre la inactivación del fago MLC-A, con un 95 % de nivel de confianza. Por el contrario, se evidenciaron diferencias significativas en la inactivación del fago LDG entre las reducciones alcanzadas a 90 % con las de 60 y 40 % de humedad relativa, pero no entre las reducciones alcanzadas a 60 y 40 % de humedad relativa, con un 95 % de nivel de confianza (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** Reducciones logarítmicas obtenidas trabajando a distintos niveles de humedad relativa para los fagos MLC-A y LDG. Letras distintas en un mismo recuadro indican que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

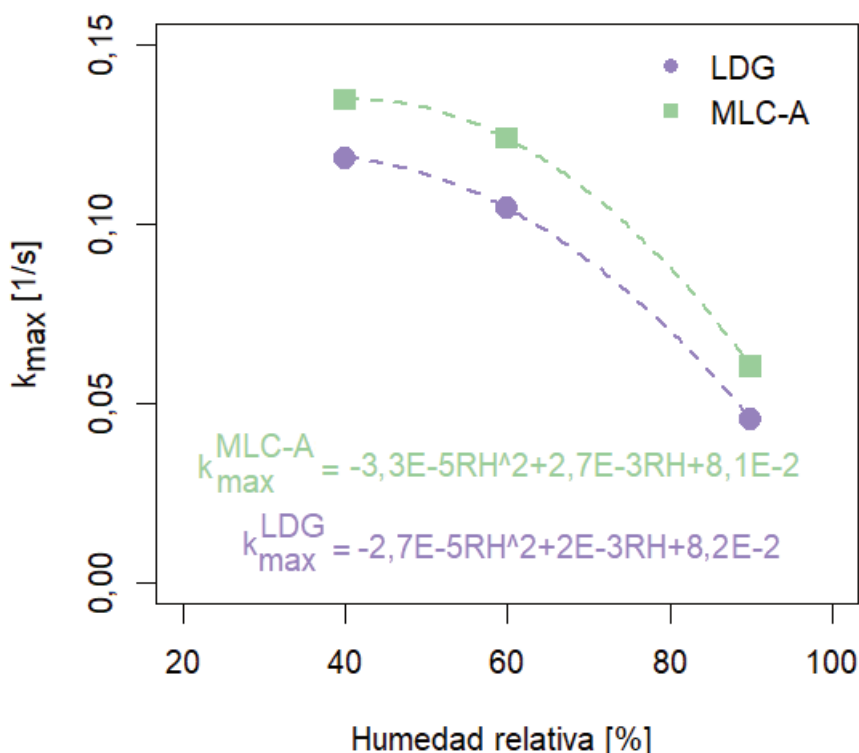
De manera similar a lo realizado en la Sección 3.3.3.2 para la variación del flujo de radiación, también se ajustó el modelo de Geeraerd para los resultados obtenidos al trabajar con diversas humedades relativas, a fin de evaluar cómo varía el parámetro cinético  $k_{max}$  en función de la humedad relativa.

Los valores de  $k_{max}$  reportados al trabajar con una humedad relativa de 90 % en la Sección 3.3.2 fueron de  $6,0 \times 10^{-2}$  1/s para el fago MLC-A (RMSE = 3,54 %) y  $4,6 \times 10^{-2}$  1/s para el fago LDG (RMSE = 1,52 %). Para una humedad relativa del 40 %, los valores de  $k_{max}$  fueron  $1,2 \times 10^{-1}$  1/s para el fago LDG y  $1,3 \times 10^{-1}$  1/s para el fago MLC-A, mientras que los valores de  $k_{max}$  para una humedad relativa del 60 % fueron  $1,0 \times 10^{-1}$  1/s para el fago LDG y  $1,2 \times 10^{-1}$  1/s para el fago MLC-A. Los parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd ajustado a los resultados obtenidos a partir de las distintas humedades relativas ensayadas se muestran en la Tabla 3.4, junto a los RMSE correspondientes.

Graficando los valores de  $k_{max}$  obtenidos con los distintos niveles de humedad relativa, se obtiene la Figura 3.12. Esta figura muestra que un aumento en la humedad relativa resultó en un menor valor de  $k_{max}$ , indicando una menor inactivación. Además, se puede observar que el parámetro  $k_{max}$  varía parabólicamente con la humedad relativa. Basándose en esta observación, es posible predecir que, al trabajar con niveles de humedad relativa entre 40 y 90 %, los valores de  $k_{max}$  para ambos fagos seguirán esta tendencia y tomarán los valores predichos por las parábolas ajustadas que se muestran en la Figura 3.12 para cada fago. De igual manera, a partir de la forma de las parábolas presentadas en la Figura 3.12 se observa que una variación de humedad relativa entre niveles bajos (40 – 60 %) no afectaría en gran medida al valor de  $k_{max}$ , mientras que un aumento en la humedad relativa a valores superiores (> 60 %) sí comenzaría a ejercer un mayor efecto sobre el valor de  $k_{max}$ , disminuyéndolo considerablemente.

**Tabla 3.4.** Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd ajustados para los distintos niveles de humedad relativa ensayados para ambos fagos.

|       |                 | 90 % HR              | 60 % HR              | 40 % HR              |
|-------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| MLC-A | $k_{max}$ [1/s] | $6,0 \times 10^{-2}$ | $1,2 \times 10^{-1}$ | $1,3 \times 10^{-1}$ |
|       | $P_{res}/P_0$   | $3,1 \times 10^{-5}$ | $5,0 \times 10^{-5}$ | $3,0 \times 10^{-5}$ |
|       | RMSE [%]        | 3,54                 | 6,45                 | 5,80                 |
| LDG   | $k_{max}$ [1/s] | $4,6 \times 10^{-2}$ | $1,0 \times 10^{-1}$ | $1,2 \times 10^{-1}$ |
|       | $P_{res}/P_0$   | $4,0 \times 10^{-4}$ | $2,7 \times 10^{-5}$ | $1,8 \times 10^{-5}$ |
|       | RMSE [%]        | 1,52                 | 12,28                | 2,66                 |

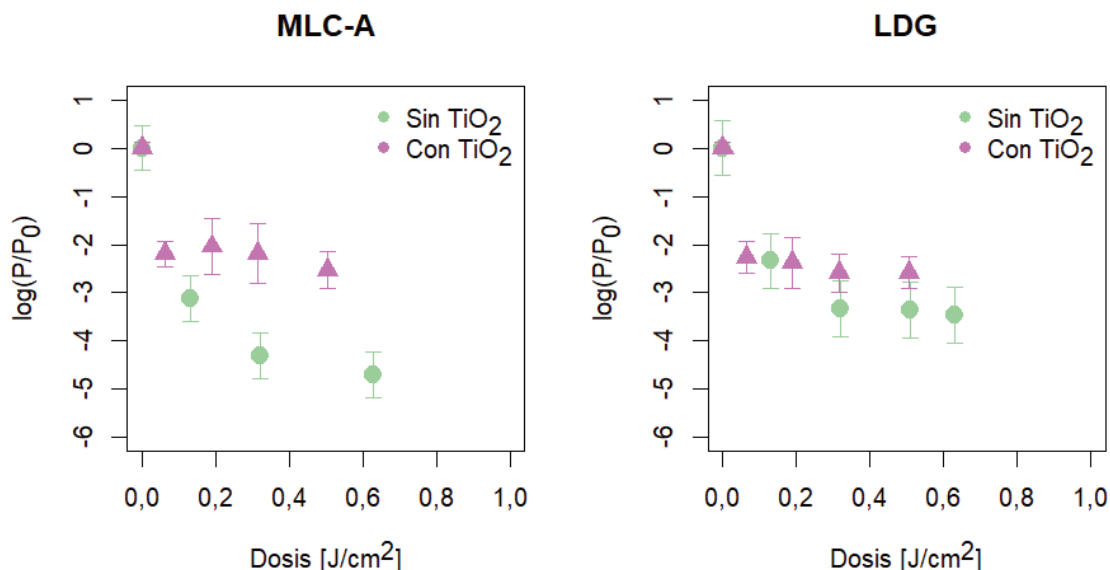


**Figura 3.12.** Variación del parámetro cinético  $k_{max}$  con la humedad relativa.

#### 3.3.3.4. Agregado de catalizador

Las suspensiones fágicas fueron sometidas a radiación UV-C (1 lámpara, flujo de radiación de  $1,05 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ ), luego de haber sido depositadas sobre placas de vidrio recubiertas y sin recubrir con  $\text{TiO}_2$ , con el fin de determinar si la presencia del fotocatalizador mejora la inactivación. Los resultados experimentales fueron graficados tanto vs dosis (Figura 3.13) como vs. tiempo (datos no mostrados), y los valores empleados en este último gráfico se ajustaron con el modelo Geeraerd (Tabla 3.5). A partir de la regresión de los parámetros cinéticos, se observó que el valor de  $k_{max}$  fue mayor trabajando con  $\text{TiO}_2$ , para ambos fagos. Esto indica que la presencia del fotocatalizador en efecto aumentó la tasa de inactivación ( $k_{max}$ ), ya que la pendiente de la porción decreciente de la curva resultó mayor para los ensayos con placas recubiertas con  $\text{TiO}_2$  (0,11  $1/s$  para el fago LDG y 0,10  $1/s$  para el fago MLC-A) que para aquellos realizados con placas sin recubrir ( $4,6 \times 10^{-2} \text{ 1/s}$  para el fago LDG y  $6,0 \times 10^{-2} \text{ 1/s}$  para el fago MLC-A). Por otro lado, el valor del parámetro  $P_{res}/P_0$ , que representa la relación entre los fagos infectivos al final del tratamiento y la concentración inicial de fagos, fue mayor para los ensayos con placas recubiertas con  $\text{TiO}_2$  ( $1,14 \times 10^{-3}$  para el fago LDG y  $3,77 \times 10^{-3}$  para el fago MLC-A) que para los ensayos con placas sin recubrir ( $4,00 \times 10^{-4}$  para el fago LDG y  $3,14 \times 10^{-5}$  para el fago MLC-A), indicando que la concentración alcanzada al final del tratamiento resultó mayor al trabajar con placas recubiertas con

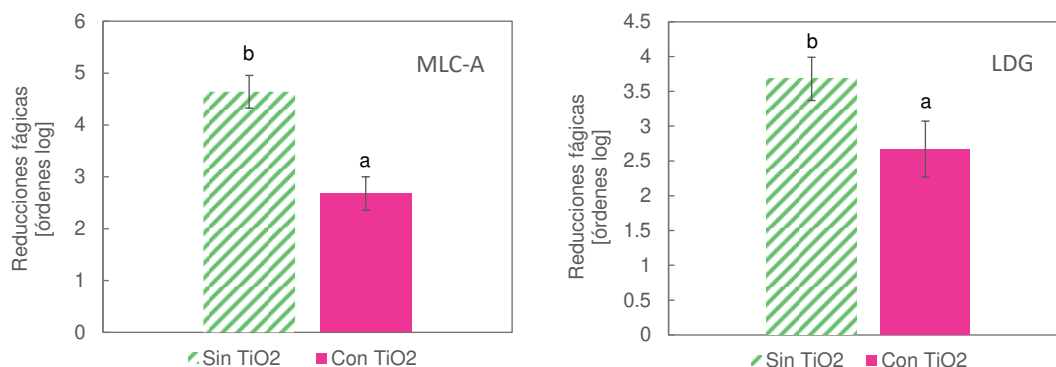
TiO<sub>2</sub>. Por lo tanto, el nivel de inactivación fágica no se incrementó en presencia de TiO<sub>2</sub>. Más aún, analizando las reducciones logarítmicas alcanzadas, se observó que la inactivación disminuyó significativamente (95 % de nivel de confianza) con la adición del fotocatalizador, para ambos fagos (Figura 3.14).



**Figura 3.13.** Curvas de inactivación para los fagos MLC-A y LDG,  $\log(P/P_0)$  vs dosis [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ], bajo la radiación de una lámpara UV-C, cuando las suspensiones fágicas fueron depositadas en placas de vidrio recubiertas y sin recubrir con TiO<sub>2</sub>.

**Tabla 3.5.** Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar el modelo de Geeraerd a los ensayos realizados con placas recubiertas y sin recubrir con TiO<sub>2</sub> para ambos fagos.

|       |                 | Sin TiO <sub>2</sub>  | Con TiO <sub>2</sub>  |
|-------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| MLC-A | $k_{max}$ [1/s] | $6,0 \times 10^{-2}$  | 0,10                  |
|       | $P_{res}/P_0$   | $3,14 \times 10^{-5}$ | $3,77 \times 10^{-3}$ |
|       | RMSE [%]        | 3,54                  | 4,94                  |
| LDG   | $k_{max}$ [1/s] | $4,6 \times 10^{-2}$  | 0,11                  |
|       | $P_{res}/P_0$   | $4,00 \times 10^{-4}$ | $1,14 \times 10^{-3}$ |
|       | RMSE [%]        | 1,52                  | 5,44                  |

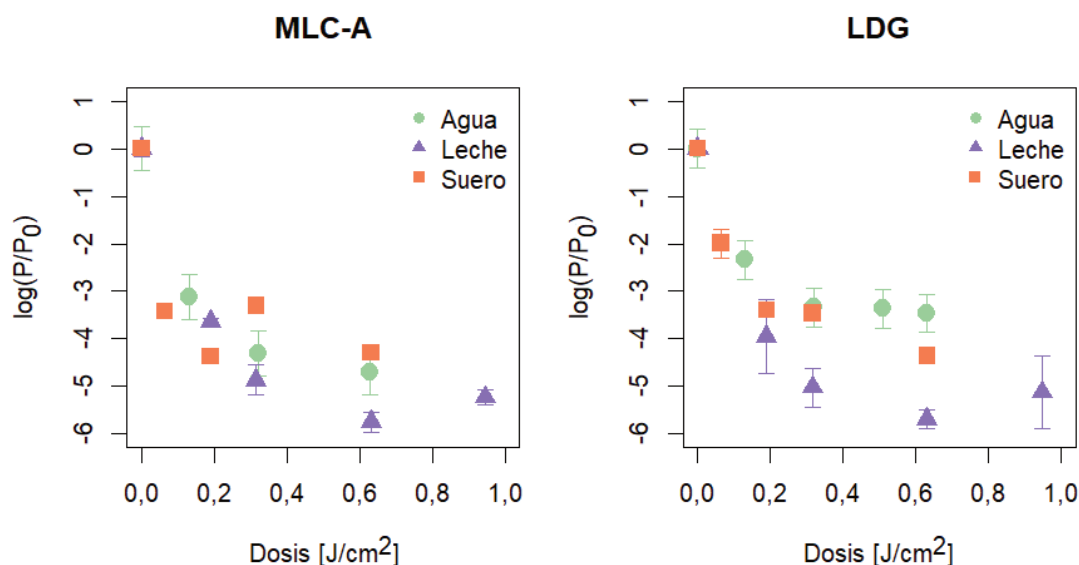


**Figura 3.14.** Reducciones logarítmicas obtenidas trabajando con placas de vidrio recubiertas con TiO<sub>2</sub> y sin recubrir, para los fagos MLC-A y LDG. Letras distintas en un mismo recuadro indican que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para analizar si los tiempos de exposición a la radiación UV-C en presencia del catalizador (fotocatálisis) ensayados resultaron demasiado cortos para observar la inactivación en estas condiciones, también se ensayaron tiempos de exposición más prolongados (3 h). Esta decisión se tomó en base a resultados previos obtenidos para el fago MLC-A en presencia de tratamientos fotocatalíticos (UV-A, TiO<sub>2</sub>) en los que fue necesario un tiempo de ensayo de 3 h para observar inactivación considerable de dicho fago (Briggiler Marcó et al., 2011). Sin embargo, luego del tratamiento por 3 h con radiación UV-C en presencia del catalizador, las unidades formadoras de placa por mililitro permanecieron en el mismo valor de la cola, es decir que no hubo un incremento en el nivel de inactivación y el efecto de cola también fue observado (datos no mostrados).

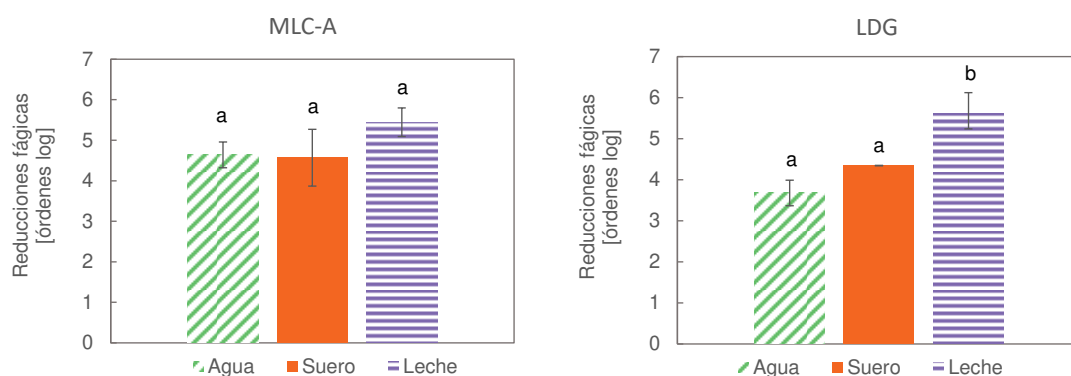
### 3.3.3.5. Medios de suspensión fágica

Se estudiaron diversos medios de suspensión del fago, esto es agua destilada, leche descremada en polvo reconstituida al 10 % p/p (leche) y suero de quesería en polvo, también reconstituido al 10 % p/p (suero), para analizar una posible interferencia de los componentes orgánicos presentes en estos medios en el proceso de inactivación. Los resultados obtenidos para estos ensayos se graficaron como  $\log(P/P_0)$  vs. dosis, obteniéndose las curvas presentadas en la Figura 3.15.



**Figura 3.15.** Curvas de inactivación para los fagos MLC-A y LDG,  $\log(P/P_0)$  vs dosis  $[J/cm^2]$ , para diversos medios de suspensión.

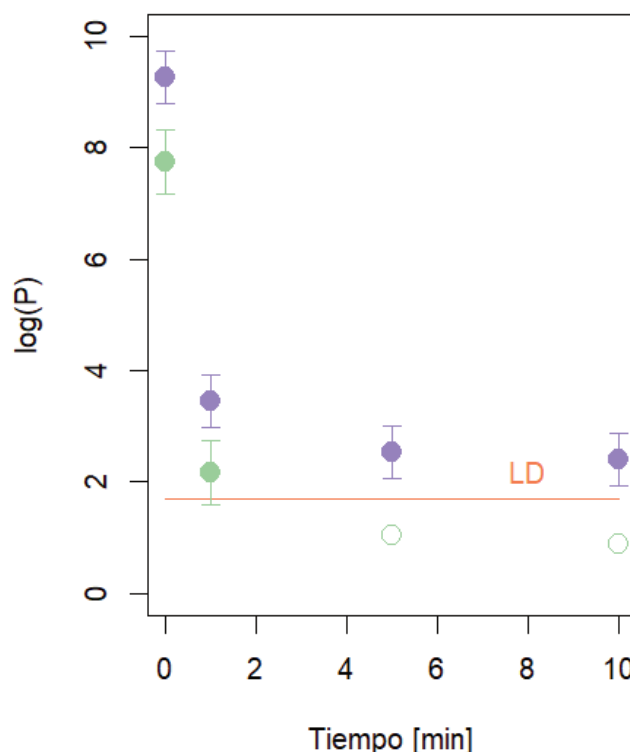
Cuando se ensayaron los tres medios de suspensión (agua, leche y suero de quesería), se observó que no existieron diferencias significativas en las reducciones logarítmicas alcanzadas con los tres medios de suspensión para ambos fagos, con la excepción de la leche para el fago LDG (Figura 3.16), con un 95 % de nivel de confianza. Asimismo, el efecto de cola siguió estando presente para todos los medios de suspensión (Figura 3.15). El comportamiento obtenido para el fago LDG en presencia de leche es opuesto al esperado, ya que en lugar de disminuir las reducciones logarítmicas debido a un efecto protector o competitivo de los componentes de la leche, las reducciones fágicas aumentaron, indicando que el fago LDG se inactivaría en mayor medida que cuando se encontraba suspendido en agua.



**Figura 3.16.** Reducciones logarítmicas obtenidas trabajando con distintos medios de suspensión para los fagos MLC-A y LDG. Letras diferentes en un mismo recuadro indican que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Con el objetivo de dilucidar el efecto de los medios de suspensión en la inactivación fágica con radiación UV-C, el fago MLC-A fue concentrado ( $21,1 \times 10^9$  UFP/ml, 1 h) y suspendido en el *buffer* acetato de amonio, obteniéndose un título final de  $1,8 \times 10^9$  UFP/ml. Cuando el fago se suspendió en acetato de amonio y se trabajó con una concentración inicial similar a la utilizada en los ensayos con los otros medios de suspensión ( $5,7 \times 10^7$  UFP/ml en agua, leche o suero), no se observó el efecto de cola en las curvas de inactivación (Figura 3.17), ya que la concentración fágica final se ubicó por debajo del límite de detección (50 UFP/ml). Sin embargo, al emplear títulos fágicos iniciales más elevados ( $1,8 \times 10^9$  UFP/ml), lo cual fue posible gracias a la concentración previa del fago, se observó que, si bien se alcanzó una mayor reducción (entre 6 y 7 órdenes log) en comparación con los ensayos realizados con otros los medios de suspensión y menores concentraciones iniciales ( $5,7 \times 10^7$  UFP/ml, aproximadamente 5 órdenes log de reducción), el efecto de cola persistió (Figura 3.17). En dicha figura se puede apreciar que, de haberse obtenido reducciones similares al trabajar con una concentración inicial de  $5,7 \times 10^7$  UFP/ml, la región correspondiente al efecto de cola hubiese quedado por debajo del límite de detección (LD), tal como se indica de manera estimada en la Figura 3.17.

Ensayos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los componentes del medio de cultivo MRS absorberían una fracción de la radiación incidente, por lo que el flujo de radiación que realmente llegaría a las partículas fágicas resultaría menor que el esperado en los ensayos utilizando el fago concentrando y libre de los componentes del medio de cultivo, por lo que las reducciones en los títulos obtenidas en presencia de componentes del medio del cultivo podrían resultar menores.



**Figura 3.17.** Curvas de inactivación ( $\log(P)$  vs tiempo, con  $P$  en UFP/ml) para el fago MLC-A suspendido en *buffer*. Símbolo  $\bullet$ : curva obtenida a partir de una concentración inicial de  $1,8 \times 10^9$  UFP/ml, símbolo  $\bullet$ : curva obtenida a partir de una concentración inicial de  $5,7 \times 10^7$  UFP/ml. Símbolo  $\circ$ : títulos predichos si se obtuvieran las mismas reducciones que al trabajar con las concentraciones iniciales más altas, encontrándose por debajo del límite de detección (LD, línea naranja).

### 3.3.4. Combinación secuencial de tecnologías

Como se mencionó en la Sección 3.2.6, se combinaron estrategias de inactivación con el objetivo de conocer si era posible mejorar la inactivación de los fagos mediante el aumento de las reducciones fágicas obtenidas y eliminar el efecto de cola presente en todos los ensayos con radiación UV-C. Las tecnologías propuestas para aplicar luego del tratamiento con radiación UV-C fueron el ozono gaseoso (10 ppm) y la fotocatálisis con  $\text{TiO}_2$  como fotocatalizador bajo radiación UV-A, ya que su eficiencia en la inactivación fágica ha sido previamente demostrada (Briggiler Marcó et al., 2011, 2021; Lloréns, 2024). Estos ensayos permitieron evaluar la factibilidad de combinar estas tecnologías, así como también analizar la posible adquisición de resistencia por parte del fago luego de su exposición a radiación UV-C.

Como resultado, se alcanzó una inactivación completa luego de realizar los tratamientos complementarios, ya que no se detectaron partículas fágicas (límite de detección de 50 UFP/ml) luego de aplicar los tratamientos, en ninguna de las dos combinaciones (10 min de radiación UV-C + 15 min de ozono, 10 min de radiación UV-

C + 1,5 h de fotocátalisis). Por otro lado, cuando se realizó el tratamiento con ozono gas sin previo tratamiento con radiación UV-C, se alcanzó un título fágico final de  $2,5 \times 10^2$  UFP/ml luego de 15 min de exposición. En cambio, luego del tratamiento fotocatalítico por 1,5 h, sin previo tratamiento con radiación UV-C, se alcanzó una concentración final de  $2,3 \times 10^3$  UFP/ml. Por lo tanto, se demostró que ambas combinaciones serían exitosas para mejorar la inactivación fágica y que los fagos no adquirieron resistencia frente a estas tecnologías de inactivación al ser expuestos previamente a radiación UV-C.

### **3.4. Discusión**

#### **3.4.1. Ensayos de inactivación**

Se estudió la inactivación de dieciséis fagos de bacterias lácticas bajo radiación UV-C ( $\lambda = 200 - 280$  nm), durante un tiempo total de 10 min. No se detectaron partículas infectivas ( $LD = 50$  UFP/ml) para seis fagos (832-B1, 892-LB, 009-ML, BYM, Ib<sub>3</sub> y Cb1/204), al ser irradiados con una lámpara ( $1,05 \times 10^{-3}$  W/cm<sup>2</sup>) por el menor tiempo ensayado (2 min, dosis de 0,13 J/cm<sup>2</sup>). Estos resultados podrían indicar una alta sensibilidad de estos fagos a la radiación UV-C. Asimismo, al tratarlos con la pintura fotocatalítica bajo radiación visible (Capítulo 2), se observó que se inactivaron por completo en un plazo de 1 a 5 h. Sin embargo, hay que considerar que los títulos iniciales al comienzo del experimento para estos seis fagos resultaron bajos (entre  $3,1 \times 10^4$  y  $3,8 \times 10^5$  UFP/ml), debido a que no fue posible alcanzar altas concentraciones virales durante su propagación y a la pérdida de infectividad evidenciada a causa del proceso de deposición y secado, como se discutió en el Capítulo 2. Por lo que, si los títulos iniciales en estos experimentos hubieran sido mayores, la inactivación completa de estos fagos a los 2 min de tratamiento podría no haberse alcanzado.

El resto de los fagos estudiados (CHD, Ln-9, QF9, ATCC 8014-B1, MLC-A, M1-G1b, M13-G1b, 0BJ, J-1, LDG) redujeron su infectividad entre 2,34 (fago LDG) y 4,38 órdenes log (fago CHD) a los dos minutos de tratamiento. Sin embargo, estas reducciones disminuyeron considerablemente entre los puntos subsiguientes, alcanzando un valor de  $\log(P/P_0)$  prácticamente constante y presentando un claro efecto de cola. Este comportamiento fue observado también por otros autores cuando estudiaron la inactivación viral (Cutler et al., 2011; Kim et al., 2017; Mattle y Kohn, 2012; Vitzilaiou et al., 2022). De los trabajos mencionados, el único que analizó la inactivación de fagos de bacterias lácticas fue el de Vitzilaiou et al. (2022), informando un marcado efecto de cola para los fagos P680 y P008, infectivos de *L. lactis*, cuando, estando suspendidos en suero de yogur, fueron sometidos a radiación UV-C (dosis máxima de 280 mJ/cm<sup>2</sup>). Entre las hipótesis planteadas por los autores para justificar este comportamiento se pueden mencionar la formación de un escudo a la luz por parte de las partículas virales, así como la agregación viral (Nieuwstad y Havelaar, 1994), la presencia de subpoblaciones de virus resistentes (Cutler et al., 2011) y la recombinación viral (Luria y Dulbecco, 1949; Mattle y Kohn, 2012).

A pesar de que todas las curvas siguen un comportamiento similar, esto es pendiente pronunciada al comienzo y efecto de cola al final, algunos fagos mostraron una inactivación inicial mayor (como se explicó previamente) o alcanzaron el efecto de cola en tiempos más cortos que otros, como en el caso de los fagos CHD, Ln-9, QF9 y

ATCC 8014-B1. Esto puede deberse a diferencias en los componentes de la partícula viral. En este sentido, se ha demostrado que la inactivación viral se produce debido a daños en el ADN de la partícula (Koutchma et al., 2009; Qiao et al., 2018) cuando se emplea radiación UV-C. Más aún, Mayer et al. (2015) ensayaron algunos bacteriófagos y virus animales y humanos con radiación UV-C y postularon que su inactivación se debía mayormente a un daño genómico (representando una contribución del 77 al 95 % del daño total), pero que también existía una contribución debida a la degradación de las proteínas (entre el 5 y el 23 %). Por lo tanto, de acuerdo a lo postulado por los autores, variaciones en los genomas fágicos o en las proteínas que conforman la cápside podrían explicar los diferentes comportamientos de los fagos analizados en esta tesis. De Plano et al. (2021) estudiaron el efecto de los cambios estructurales de la cápside en el fago M13 modificado genéticamente y observaron que una mayor resistencia al daño causado por la radiación UV-C era atribuible a la reorganización de las interacciones dentro de la cápside, lo que condujo a un aumento de los puentes de hidrógeno y de las interacciones estéricas, haciendo la estructura más estable y generando una mayor protección para el ADN viral. Schubert, Biere, et al. (2023) también sugirieron que puede existir un efecto combinado entre las características del virus y el tipo y tamaño de ácido nucleico en relación al comportamiento frente a la radiación UV-C. Sin embargo, al trabajar con once fagos infectivos de *L. lactis* (fagos P369 y KSY1, pertenecientes a la ex familia *Podoviridae* y fagos P001, P956, P1532, P680, P008, TP901-1, P087, 949 and P897, pertenecientes a la ex familia *Siphoviridae*), estos autores no pudieron detectar una correlación consistente entre la sensibilidad a la radiación UV-C y la morfología fágica o el tamaño del genoma, probablemente debido al efecto de otros parámetros indefinidos. Más aún, Vitzilaiou et al. (2022) postularon que los fagos del grupo 936 de *Lactococcus* podrían poseer características genómicas específicas, que podrían ser las responsables de su tolerancia a varios factores de estrés, tales como calor, biocidas y radiación UV. Sin embargo, sería necesario realizar una investigación más profunda para establecer la relación entre el nivel de inactivación y el daño al genoma o a la cápside fágica.

Similarmente al Capítulo 2, es posible realizar una comparación de distintas tecnologías de inactivación a partir de los valores de  $t_{99}$  y de las reducciones logarítmicas alcanzadas.

En primer lugar, los valores de  $t_{99}$  obtenidos para la radiación UV-C se encontraron en el rango entre 53 y 102 s. Al comparar estos valores con aquellos obtenidos al trabajar con pintura fotocatalítica bajo radiación visible (0,6 h – 17,9 h) se puede observar que los  $t_{99}$  obtenidos bajo radiación UV-C son mucho menores (entre 21,18 y 1215,85 veces). También es posible compararlos con los  $t_{99}$  alcanzados al

trabajar en la inactivación de estos dieciséis fagos con ozono gaseoso (Lloréns, 2024), los cuales se encontraron entre 3,1 y 15,9 min, siendo mayores que aquellos obtenidos bajo radiación UV-C. Finalmente, cuando se comparan los  $t_{99}$  con aquellos calculados a partir del trabajo de Briggiler Marcó et al. (2011) para los fagos 832-B1, J-1, MLC-A, CHD, QF9 y 0BJ en presencia de tratamientos fotocatalíticos (UV-A y  $\text{TiO}_2$  como catalizador), los mismos variaron entre 35 y 180 min, siendo también mayores que aquellos obtenidos con radiación UV-C. En resumen, los  $t_{99}$  obtenidos bajo radiación UV-C son considerablemente más bajos que los obtenidos con las tres tecnologías restantes (fotocatálisis, pintura fotocatalítica y ozono). Esto nos indica que la radiación UV-C es la tecnología que alcanza la reducción de 2 órdenes log en menor tiempo, lo cual es muy prometedor. Lamentablemente, la mayoría de los fagos ensayados (diez de dieciséis) presentaron efecto de cola en las curvas de inactivación, lo que representa una desventaja de esta tecnología, y resulta necesario analizar otros parámetros tal como las reducciones logarítmicas. Estas reducciones se encontraron en el rango entre 3,16 y 4,45 órdenes log, calculadas como la diferencia entre el punto inicial de la curva y el valor correspondiente a la cola. Por lo tanto, estas reducciones fueron alcanzadas en el tiempo en el que se alcanzó la cola (120 – 300 s) y las concentraciones finales de los fagos se encontraron en el rango entre  $2,00 \times 10^2$  y  $3,75 \times 10^3$  UFP/ml. Esto indica que no es posible alcanzar la inactivación completa de todos los fagos infectivos de bacterias lácticas ensayados en esta tesis empleando únicamente esta tecnología, y las concentraciones finales son cercanas a los niveles que pueden ocasionar problemas en los procesos fermentativos ( $10^4$  UFP/ml (Moineau y Lévesque, 2005)), por lo cual se recomienda combinar la radiación UV-C con alguna tecnología complementaria, como se observó en la Sección 3.3.4.

Al calcular las reducciones logarítmicas logradas hasta la aparición de la cola (entre 3,16 y 4,45 órdenes log) y agruparlas según el tiempo de tratamiento en el cual fueron alcanzadas (Figura 3.3), se puede observar que los fagos J-1, LDG, MLC-A, M1-G1b, M13-G1b y 0BJ requirieron un tratamiento ligeramente más largo (300 s), o más intenso si se considera la dosis ( $0,32 \text{ J/cm}^2$ ), que el resto de los fagos para alcanzar el efecto de cola, en concordancia con lo observado en la Figura 3.1. Sin embargo, cuando se comparan las dosis requeridas en esta tesis para alcanzar dichas reducciones con aquellas informadas por Michel et al. (2021) para fagos infectivos de bacterias lácticas suspendidos en suero de leche filtrado, se observó que dichos autores precisaron de dosis mayores ( $2,25 \text{ J/cm}^2$ ) para alcanzar una reducción de 5 órdenes log. Esto indica que, a pesar de que la reducción obtenida por los autores mencionados es levemente mayor que las obtenidas en esta tesis (entre 0,55 y 1,67 órdenes log mayores), la dosis requerida fue entre 4,4 y 17,3 veces mayor. Es importante notar que, como se mencionó

anteriormente, Michel et al. (2021) trabajaron con el fago suspendido en suero de leche, y esto puede explicar en gran medida estas diferencias, ya que el suero absorberá una gran fracción de radiación UV-C y la penetración de los rayos se verá reducida, produciéndose también una atenuación de los rayos UV hasta alcanzar los fagos. Asimismo, cabe remarcar que en nuestro trabajo los fagos estuvieron depositados en una superficie durante el tratamiento, lo que facilitaría que las partículas virales sean alcanzadas por la radiación, a diferencia del trabajo citado, en el cual las partículas fágicas se encontraban suspendidas en medio líquido. Una comparación similar se puede realizar con el artículo de Schubert, Hock, et al. (2023), ya que dichos autores estudiaron la inactivación en presencia de esta tecnología para el fago P008 en suero filtrado, utilizando distintas configuraciones del reactor. En este sentido, Schubert, Hock, et al. (2023) precisaron dosis mayores y esto también puede deberse a que el fago estaba suspendido en suero filtrado, como se explicó anteriormente. Por otro lado, Michel et al. (2021) también estudiaron la inactivación de los fagos en agua, obteniendo una reducción de 5,5 órdenes log para los fagos P001 y P008 cuando se aplicó una dosis de  $0,05 \text{ J/cm}^2$ . En este caso, la dosis requerida fue entre 2,6 a 6,4 veces menor que la reportada en esta tesis. Se destaca Michel et al. (2021) observaron una completa inactivación de los fagos, mientras que en esta tesis diez de los fagos estudiados presentaron un marcado efecto de cola. Esto puede estar relacionado con las razones explicadas previamente sobre las causas del efecto de cola, a las características morfológicas y estructurales del fago o a algunas diferencias entre las configuraciones y el diseño de los reactores empleados, lo que hace que la comparación entre resultados no sea realmente justa.

Por otro lado, al comparar las dosis requeridas en esta tesis con los resultados publicados por Vitzilaiou et al. (2022), se observa que los valores son consistentes para los fagos LDG, MLC-A, 0BJ, M1-G1b, M13-G1b y J-1, dado que los autores mencionados reportaron una reducción de 4,1 y 5 órdenes log para los fagos P680 y P008, respectivamente, aplicando una dosis de  $0,327 \text{ J/cm}^2$ . En cambio, los fagos ATCC 8014-B1, CHD, Ln-9 y QF9 precisaron dosis menores que las publicadas para alcanzar reducciones similares ( $\pm 0,5$  órdenes log) a la de los fagos P680 y P008.

No obstante, dado que no existe una metodología estandarizada para medir la dosis otorgada por las lámparas UV-C, las diferencias observadas entre nuestro trabajo y el de otros autores, podrían deberse a que, en dichos estudios, la dosis podría haber sido determinada por actinometría o biodosimetría. Asimismo, también puede tener influencia el lugar donde se calcula el flujo que se utiliza para calcular la dosis. En esta tesis, se calculó sobre la superficie de las placas, pero en medios líquidos puede ser en la superficie de la suspensión y luego esa radiación podrá ser atenuada en el medio

líquido, dependiendo de las propiedades ópticas y profundidad, entre otros factores (Datta et al., 2015).

Por otro lado, a pesar de que Vitzilaiou et al. (2022) reportaron un efecto de cola, la infectividad de los fagos por ellos estudiados continuó decreciendo (a una tasa menor) a medida que la dosis se incrementó ( $0,327 \text{ J/cm}^2$  fue el último punto estudiado), mientras que en la presente tesis los fagos alcanzaron el efecto de cola con dosis de  $0,13$  o  $0,32 \text{ J/cm}^2$  y la cola continuó realmente plana. Entonces, si la dosis se hubiese aumentado para los fagos P680 y P008, probablemente se hubiese observado una reducción en la cantidad de fagos infectivos, a una tasa cada vez menor, hasta que se alcance un punto donde es imperceptible el recuento de partículas fágicas (límite de detección). En cambio, en esta tesis el número de fagos infectivos permaneció constante en el valor reportado, y si la dosis se hubiese incrementado no se habría obtenido ningún beneficio, solo un mayor costo energético.

#### 3.4.2. Estudio del efecto de cola

En base a los resultados obtenidos, se realizaron ensayos complementarios con los fagos MLC-A y LDG para comprender el efecto de cola presente en las curvas de inactivación de diez de los fagos estudiados e intentar eliminarlo, para favorecer la inactivación fágica.

##### 3.4.2.1. Segundo ciclo de inactivación

Al realizar un segundo ciclo de tratamiento con el objetivo de evaluar si los fagos adquirieron resistencia contra la radiación UV-C o si el efecto de cola se continuaba presentando, se observó que los fagos MLC-A y LDG mostraron un comportamiento semejante al del primer ciclo, ya que no se observó ni una inactivación completa ni una mayor resistencia frente a la inactivación con radiación UV-C luego del segundo ciclo de radiación. De la mano con estos resultados, Schubert, Biere, et al. (2023) también realizaron múltiples ciclos de tratamiento con radiación UV-C y propagación del fago P008 (infectivo de *L. lactis*) seguido de un análisis del genoma, y encontraron muy pocos eventos mutacionales luego de los múltiples ciclos. Además, no se observó un aumento en la resistencia al tratamiento con radiación UV-C en las partículas que permanecieron infectivas, lo que sugiere que es poco probable que este tratamiento pierda su efectividad a lo largo del tiempo.

##### 3.4.2.2. Concentraciones iniciales menores

Con el objetivo de explicar la causa del efecto de cola en las curvas de inactivación se planteó también la hipótesis de un efecto de sombra entre los fagos. Esto quiere decir que, si en una pequeña superficie (gota depositada y seca) se encuentra una gran cantidad de partículas fágicas, algunas quedarían ocultas detrás o debajo de

otras y la radiación UV-C, de corta penetración, solamente alcanzaría a la capa superior de los fagos depositados, mientras que los restantes no serían alcanzados por el tratamiento, permaneciendo infectivos y dando origen al efecto de cola.

Para analizar si este fenómeno es el que ocurre en nuestro trabajo, se estudió la inactivación con los fagos MLC-A y LDG con diversas concentraciones fágicas. Para seleccionar estos nuevos títulos iniciales es importante considerar cuáles fueron las reducciones obtenidas en los ensayos previos, ya que, si la concentración inicial de fagos es muy baja y se obtienen reducciones similares, es posible que no se observe el efecto de cola simplemente porque la cola se encontraría por debajo del límite de detección. Con esto en mente, los valores de concentraciones iniciales para realizar estos ensayos fueron de  $1,70 \times 10^6$  y  $3,60 \times 10^6$  UFP/ml para los fagos LDG y MLC-A, respectivamente, aproximadamente un orden menor que la concentración original.

Al realizar los ensayos con una concentración menor se volvió a observar el efecto de cola, en un valor de  $P/P_0$  similar al obtenido realizando la experiencia con una concentración inicial de  $1,07 \times 10^7$  UFP/ml. Esto indica que el efecto de cola no sería consecuencia de un efecto de sombra entre partículas fágicas, o bien que el efecto de sombra se continúa observando para concentraciones iniciales entre  $1,70 \times 10^6$  y  $3,60 \times 10^6$  UFP/ml.

#### 3.4.2.3. Dosis mayores

Para evaluar si el efecto de cola podría desaparecer luego de someter a los fagos a un tratamiento aún más agresivo, se irradiaron los fagos con tres lámparas por 60 y 120 min, incrementando de esta manera la dosis. Sin embargo, luego de este tratamiento, la concentración final de los fagos permaneció inalterada, presentándose una vez más el efecto de cola.

#### 3.4.3. Modelo cinético

Al ajustar los distintos modelos cinéticos propuestos en la Sección 3.2.4, se observó que los dos modelos que presentaron el mejor ajuste fueron Baranyi y Roberts y Geeraerd, ya que presentaron los menores RMSE (entre  $6,86 \times 10^{-6}$  y 3,54 %) y representaron fehacientemente el comportamiento observado en las curvas de inactivación experimentales.

Los parámetros cinéticos de estos modelos son  $k_{max}$ , que representa la máxima tasa de inactivación, y  $P_{res}/P_0$  o  $P_{min}/P_0$ , que representan la relación entre el valor del título final de fagos y el valor de la concentración inicial de fagos. Al calcular el error relativo entre  $P_{min}/P_0$  o  $P_{res}/P_0$  y el valor experimental de esta relación, se observó que estos errores se encontraron en el rango entre  $1,42 \times 10^{-2}$  y 11,01 %, lo que indica un adecuado ajuste de la porción de la curva que presenta la cola.

Por otro lado, el parámetro  $k_{max}$  se encontró en un rango entre  $4,6 \times 10^{-2}$  y  $9,1 \times 10^{-2}$  1/s para ambos modelos y todos los fagos. Este parámetro puede ser comparado con los valores de las cinéticas de inactivación aparentes calculadas para las otras tecnologías. Para poder realizar dicha comparación de una manera más sencilla, todas las constantes se expresaron en unidades de 1/min. Por lo tanto, los  $k_{max}$  de los modelos cinéticos ajustados para los datos de radiación UV-C se encontraron en el rango de 2,76 a 5,46 1/min. Al comparar las constantes obtenidas con las otras tecnologías, se observa que las correspondientes a la radiación UV-C fueron las más altas, lo que indica que los fagos se inactivaron más rápidamente con esta tecnología. En contraste, para el tratamiento con ozono las constantes se encontraron en el rango desde 0,30 a 1,52 1/min (Lloréns, 2024), mientras que para la pintura fotocatalítica bajo radiación visible las constantes se encontraron entre 0,005 y 0,125 1/min (Capítulo 2) y para la fotocátalisis, entre 0,009 y 0,13 1/min (Briggiler Marcó et al., 2011). Este parámetro nos indica que con radiación UV-C se obtiene una tasa de inactivación mayor, pero nuevamente es importante remarcar que con la aplicación de esta tecnología se alcanzan títulos finales mayores (entre  $2,00 \times 10^2$  y  $3,75 \times 10^3$  UFP/ml) debido al efecto de cola, por lo que es recomendable su combinación con otras tecnologías de inactivación.

#### 3.4.4. Influencia de distintas condiciones sobre la inactivación fágica bajo radiación UV-C

Al evaluar distintas condiciones ambientales y de operación del reactor, el efecto de cola continuó estando presente en todos los ensayos, no pudiendo eliminarse por la modificación de ninguna de las condiciones propuestas.

##### 3.4.4.1. Flujo de radiación

En esta tesis se observó que los fagos MLC-A y LDG siguen la ley de Bunsen-Roscoe (Bunsen y Roscoe, 1857), ya que alcanzaron las mismas reducciones logarítmicas al variar el flujo de radiación y los tiempos de tratamiento de tal manera que la dosis entregada se mantenga constante.

Al analizar el parámetro cinético  $k_{max}$  del modelo de Geeraerd ajustado, se observó que el mayor valor de  $k_{max}$  para ambos fagos se obtuvo para el mayor flujo de radiación, lo que indicaría una inactivación más rápida y la consecuente posibilidad de realizar el tratamiento en tiempos más cortos. Asimismo, este parámetro varió de manera lineal con el flujo de radiación incidente dentro del rango ensayado.

##### 3.4.4.2. Humedad relativa

La humedad relativa tuvo diverso efecto sobre la inactivación de los fagos MLC-A y LDG. En este sentido, la inactivación del fago LDG mejoró al disminuir la humedad

relativa de 90 a 60 %, pero a partir de un cierto valor umbral la reducción en la humedad (de 60 a 40 %) no favoreció la inactivación. Por el contrario, las reducciones logarítmicas alcanzadas por el fago MLC-A no se vieron afectadas al trabajar con distintos niveles de humedad relativa, es decir, que este parámetro no tuvo influencia sobre las tasas de inactivación de dicho fago.

Al analizar la variación del parámetro cinético  $k_{max}$  con los cambios en la humedad relativa, se observó que el mismo varió parabólicamente al trabajar con humedades relativas entre 40 y 90 %, presentando menores valores a humedades relativas mayores (90 %). Este comportamiento, manifestado por ambos fagos y caracterizado por una disminución en la susceptibilidad a altos niveles de humedad relativa, fue también reportado por McDevitt et al. (2012) y Tseng y Li (2005) al estudiar la inactivación de varios virus bajo radiación UV-C. McDevitt et al. (2012) estudiaron el virus influenza A (H1N1, PR-8) y Tseng y Li (2005) estudiaron cuatro bacteriófagos con diferentes tipos de ácidos nucleicos: phi 6 con envoltura lipídica (ARN de doble cadena), MS2 (ARN de simple cadena), phi X174 (ADN de simple cadena) y T7 (ADN de doble cadena). Los últimos tres fagos son infectivos de *E. coli*, mientras que el fago phi 6 es infectivo de *Ps. syringae*. McDevitt et al. (2012) ajustaron los datos de inactivación experimentales con una cinética de primer orden. El valor que los autores llamaron “parámetro de susceptibilidad ( $Z$ )” es equivalente al parámetro  $k_{max}$  analizado en la presente tesis. Más aún, al variar la humedad relativa en aproximadamente 25, 52 y 83 %, los valores de  $Z$  reportados podrían ser ajustados con una suave parábola decreciente, que puede ser aproximada a una recta, ya que el coeficiente que acompaña al término cuadrático en la ecuación de ajuste resultó muy pequeño. Por otro lado, Khaiboullina et al. (2021) observaron un menor número de copias del virus HCoV-NL63 al trabajar con 85 % de humedad relativa, en comparación con los niveles de 45 y 65 %, empleando cubreobjetos sin recubrimiento y radiación UV-C, demostrando que la humedad relativa sería también un factor significativo en este proceso de inactivación.

Tseng y Li (2005) observaron que la susceptibilidad de los cuatro bacteriófagos ensayados en su trabajo fue menor a 85 % de humedad relativa que a 55 % e hipotetizaron que, bajo valores de humedad relativa altos, la susceptibilidad frente a la radiación UV-C disminuyó debido a la atenuación de la radiación por la sorción del agua en la superficie viral. En su estudio, los fagos se encontraban en forma de bioaerosoles, por lo que estaban contenidos dentro de pequeñas gotas con sorción de agua en la superficie del virus. Este hecho podría proveerles protección a los fagos frente al daño a los ácidos nucleicos inducido por radiación UV-C (Jordan et al., 2001). Tseng y Li (2005) propusieron que, si el agua de los aerosoles se evaporara, la resistencia a la radiación UV podría ser menor debido a la ausencia de dicho escudo de agua. A pesar

de que en nuestro trabajo los fagos fueron depositados en placas de vidrio y secados, es posible que la alta humedad relativa del ambiente les brinde un efecto protector similar al de la gota de bioaerosol y, por este motivo, la inactivación al trabajar a humedades relativas altas resultó menor. Más aún, L. Liu et al. (2022) sugirieron que, al trabajar con humedades relativas demasiado altas, la habilidad de penetración de la luz UV podría ser más débil debido a las refracciones de la luz UV, lo que podría ser otra explicación al comportamiento observado. En este punto es importante destacar que los resultados obtenidos en el Capítulo 2 muestran un comportamiento opuesto, ya que al trabajar con pintura fotocatalítica y radiación visible, se obtuvo la mayor tasa de reducción fágica para los valores de humedad relativa más altos ensayados (80 %). Este resultado reafirma lo previamente concluido a partir de la bibliografía disponible: el efecto de la humedad relativa en la inactivación de entidades biológicas depende de la tecnología aplicada y por ello es necesario estudiar su efecto en cada nueva estrategia de inactivación propuesta.

#### 3.4.4.3. Agregado de catalizador

Al añadir  $\text{TiO}_2$  a las placas sobre las cuales se depositaron las suspensiones fágicas y luego someter estas placas a radiación UV-C, se observó que la tasa de inactivación ( $k_{max}$ ) se incrementó en presencia de  $\text{TiO}_2$ , es decir que el catalizador aumentó la velocidad de reacción. Sin embargo, la inactivación de ambos fagos disminuyó significativamente con la adición del catalizador, ya que las reducciones logarítmicas alcanzadas en los títulos fágicos fueron menores que aquellas obtenidas trabajando con placas sin recubrir, indicando que la concentración alcanzada al final del tratamiento ( $\log(P/P_0)$ ) resultó mayor al trabajar con placas recubiertas con  $\text{TiO}_2$ , por lo que no se obtuvo una mejora en el nivel de inactivación fágica al agregar el fotocatalizador.

Una hipótesis que podría explicar este comportamiento es que, al depositar los fagos en la capa de catalizador, éstos podrían “escurrirse” en los intersticios de la superficie del  $\text{TiO}_2$  y quedar resguardados de la radiación por la película de catalizador. Dado que la extinción de radiación UV-C en el dióxido de titanio es mucho mayor que la correspondiente a la radiación UV-A, estos fagos “escondidos” no serían irradiados y permanecerían infectivos. Esta hipótesis también explicaría los resultados observados al analizar los parámetros cinéticos, ya que la relación  $P_{res}/P_0$  podría ser mayor al trabajar con el fotocatalizador debido a los fagos que no reciben radiación, ejerciendo el catalizador, un efecto inverso al esperado. Otra posible explicación sería que, dada la corta penetración de la radiación UV-C, la película de catalizador ubicada debajo de la capa de fagos no sería alcanzada por la radiación UV-C debido a un posible efecto de sombra causado por la presencia de las partículas virales, por lo que la producción de

radicales libres no ocurriría por esta vía y, por este motivo, el proceso no se vio mejorado por la adición de catalizador.

En la bibliografía, Choi et al. (2020) reportaron que el tratamiento con radiación UV-C y  $\text{TiO}_2$  alcanzó efectos de inactivación similares al tratar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio acuoso con y sin catalizador. Los autores tampoco observaron grandes diferencias entre ambos tratamientos al estudiar la inactivación de *E. coli*. Un comportamiento similar fue reportado por Guimarães y Barretto (2003) en la inactivación de un colifago. Por lo tanto, la principal causa de la inactivación de estos microorganismos estaría relacionada con la radiación UV-C, dado el gran daño ocasionado por la misma a los genomas, siendo el rango de longitud de onda de este tipo de radiación el más letal para los microorganismos.

Por otro lado, Khaiboullina et al. (2021) reportaron que sometiendo a radiación UV-C más catalizador al coronavirus humano HCoV-NL63, éste podía ser inactivado más rápidamente que cuando era tratado únicamente con radiación UV-C, en consonancia con lo observado en la presente tesis al obtener un mayor valor de  $k_{max}$  en los ensayos con catalizador. Sin embargo, una investigación más extensa y profunda sería necesaria para explicar las diferencias entre la fotocatalisis (UV-A +  $\text{TiO}_2$ ) y la radiación UV-C y los mecanismos de inactivación propios de cada tecnología.

#### 3.4.4.4. Medios de suspensión fágica

La leche cruda es una de las principales fuentes de ingreso de los fagos a las plantas lácteas, pudiendo contener concentraciones de hasta  $10^4$  UFP/ml (Moineau y Lévesque, 2005). Por lo tanto, los charcos y salpicaduras de leche cruda que pueden ocurrir durante las elaboraciones son una potencial fuente de contaminación fágica. De forma similar, el suero de quesería generado durante el proceso productivo y que puede contener hasta  $10^9$  UFP/ml de partículas infectivas también constituye una fuente de contaminación fágica para diversos ambientes de la industria láctea (Atamer et al., 2013). Por este motivo, resulta de interés estudiar la inactivación de los fagos cuando están suspendidos en estos medios presentes en la industria láctea, de tal manera de conocer si los diversos componentes de estos medios, tales como proteínas, grasa e hidratos de carbono, pueden ejercer un efecto de protección de la partícula fágica durante el tratamiento, o bien un efecto de competencia por el agente oxidante. Sin embargo, no se observaron variaciones en las tasas de inactivación cuando el fago MLC-A estuvo suspendido en leche o suero, en comparación a las obtenidas para dicho fago utilizando agua como medio de suspensión. Por el contrario, en el caso del fago LDG, se observó una mayor reducción logarítmica en presencia de leche en comparación a la obtenida con los otros dos medios, por lo que no sólo la presencia de

estos medios no ejercería un efecto protector o de competencia, sino que en el caso de la leche incluso favorecería la inactivación del fago LDG.

Si bien se trata de distintas tecnologías, al ensayar los mismos medios de suspensión para la inactivación fágica con ozono gaseoso (10 ppm, 30 min), se observó el efecto contrario, ya que el mayor valor de la constante global de inactivación ( $k_g$ ) se obtuvo al estar los fagos MLC-A y LDG suspendidos en agua (0,042 y 0,016 m<sup>3</sup>/(ml × min), respectivamente), presentando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con las constantes obtenidas para los otros medios de suspensión con valores de 0,001 m<sup>3</sup>/(ml × min) en leche para ambos fagos y de 0,003 y 0,011 m<sup>3</sup>/(ml × min) para los fagos LDG y MLC-A, respectivamente, en suero de quesería (Lloréns, 2024).

Una posible explicación de las diferencias obtenidas en el medio de suspensión leche con el fago LDG, es que la leche depositada y secada sobre las placas haya sufrido algunas modificaciones químicas luego de la exposición a la radiación UV-C, y dicha modificación posteriormente cause algún tipo de interferencia en el proceso infectivo del fago LDG, cuando se aplica el método de la doble capa agarizada. Por ejemplo, si la cola del fago es bloqueada por algún componente alterado de la leche, el fago no podrá absorberse en su célula huésped. De esta manera, el fago no se encuentra inactivado, pero está imposibilitado de llevar adelante la infección durante su cuantificación, y por lo tanto el número de partículas fágicas detectadas es menor.

En bibliografía, el efecto de la radiación UV-C en la leche fue estudiado y reportado en varios estudios. Burton (1951) reportó la desnaturalización de las proteínas de la leche al ser tratadas con radiación UV, y la desnaturalización de  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina también fue reportada para una dosis de UV-C de 4 J/cm<sup>2</sup> (Abbas Syed et al., 2021).

En experiencias complementarias, el fago MLC-A se concentró hasta niveles de  $1,8 \times 10^9$  UFP/ml, quedando suspendido en *buffer* acetato de amonio. Los ensayos conducidos en estas condiciones, es decir, con concentraciones iniciales mayores y en un medio casi libre de componentes orgánicos, demostraron que se logró una mayor inactivación de la partícula viral pero que persistió el efecto de cola.

Una explicación posible para este comportamiento es que, a diferencia del fago concentrado suspendido en *buffer*, que estaría completamente libre de componentes orgánicos, en el ensayo original donde el fago estaba suspendido en caldo MRS y al que se le realizó sólo una dilución decimal en agua, podría contener todavía una pequeña porción de componentes del medio de cultivo, tales como extractos de levadura y proteínas, que absorberían parte de la radiación incidente compitiendo con los fagos por ella, disminuyendo así la inactivación viral. Por otro lado, esto nos indica que probablemente en las experiencias realizadas en *buffer* con una concentración inicial

menor ( $1,07 \times 10^7$  UFP/ml) el efecto de cola se habría presentado en niveles de  $\log(P/P_0)$  que se encontraban por debajo del límite de detección de la técnica, al lograr una reducción fágica mayor en estas condiciones.

En estos ensayos, como el fago estaba suspendido en *buffer*, no existía ningún otro componente extra, o estuvieron presentes en concentraciones muy pequeñas, en la suspensión que pudiera competir por la radiación, y todo el flujo incidente alcanzó las partículas fágicas, logrando una reducción mayor en los títulos, en comparación con los restantes ensayos realizados. Por lo tanto, a pesar de que efectivamente se produjo una mejora en la reducción de la infectividad fágica al trabajar con el fago suspendido en *buffer*, el efecto de cola no se debe exclusivamente a la presencia de los componentes orgánicos del medio de cultivo MRS, ya que de ser así no se hubiese observado el efecto de cola en los ensayos en *buffer* con concentraciones iniciales mayores.

Cabe destacar que resultaría más valioso analizar la inactivación fágica en condiciones semejantes a las de los ambientes industriales, lugares donde los fagos estarán mayormente suspendidos o en contacto con algunos de los componentes de los medios de suspensión previamente estudiados (leche, suero de quesería), como proteínas, grasas o azúcares, y probablemente nunca completamente limpios como en el ensayo con los fagos suspendidos en *buffer*.

#### 3.4.5. Combinación de tecnologías

Debido al efecto de cola evidenciado en las curvas de inactivación al emplear únicamente la radiación UV-C, se implementaron tecnologías complementarias a los fines de lograr mejores tasas de inactivación.

La primera combinación propuesta fue radiación UV-C seguida de un tratamiento con ozono gaseoso (10 ppm, 15 min) y la segunda combinación fue radiación UV-C más fotocátalisis ( $\text{TiO}_2$ , UV-A,  $6,60 \times 10^{-3}$  W/cm<sup>2</sup> de flujo de radiación, 1,5 h). Se observó una inactivación completa luego de la combinación de los tratamientos, ya que no se detectaron partículas infectivas del fago MLC-A (LD de 50 UFP/ml) luego de la combinación con ozono gaseoso ni después de la combinación con fotocátalisis.

En trabajos previos de nuestro grupo se encontró que luego de tratar el fago MLC-A con 10 ppm de ozono por 30 min, la concentración final del mismo fue  $4,00 \times 10^2$  UFP/ml (Lloréns, 2024), y la concentración del fago MLC-A luego del tratamiento con fotocátalisis ( $\text{TiO}_2$ , UV-A,  $1,78 \times 10^{-3}$  W/cm<sup>2</sup> de flujo de radiación) por 3 h fue cercano a  $3,16 \times 10^4$  UFP/ml (Briggiler Marcó et al., 2011). De esta manera se demostró que la combinación de las estrategias de inactivación resultó exitosa para la inactivación fágica, presentando una mejora en la inactivación al emplear las tecnologías en conjunto en comparación con cada una por separado, ya que se logró una completa inactivación en

tiempos menores a los necesarios trabajando únicamente con ozono o fotocátalisis ( $\text{TiO}_2$ , UV-A). De manera similar, la combinación de estrategias de inactivación también fue demostrada como efectiva por Michel et al. (2021), quienes lograron mejorar la reducción en la infectividad de los bacteriófagos P001, P008 y P680 (infectivos de *L. lactis*) al combinar la tecnología de filtración por membrana junto con un tratamiento térmico o de radiación UV-C.

Asimismo, podría descartarse la teoría de la posible adquisición de resistencia por parte del fago a la inactivación ocasionada por el tratamiento con UV-C.

**CAPÍTULO 4 -  
REACTOR  
FOTOCATALÍTICO  
SEMIPILOTO**

#### **4.1. Resumen del capítulo**

El objetivo del presente capítulo fue optimizar el funcionamiento de un reactor fotocatalítico escala semi-piloto, anteriormente diseñado, para la inactivación de fagos infectivos de BAL, presentes en forma de bioaerosoles. Para llevar adelante las experiencias, se seleccionó el fago ATCC 8014-B1, infectivo de *Lp. plantarum*. El equipo fotocatalítico consta de una cámara donde se realiza la nebulización del fago, que está unida a un prisma de acrílico que en su interior puede contener hasta seis placas recubiertas con catalizador ( $\text{TiO}_2$ ), inclinadas  $120^\circ$ , que se encuentra iluminado por encima y por debajo por un sistema de radiación UV-A (dos juegos de diez lámparas fluorescentes,  $\lambda = 340 - 400 \text{ nm}$ ). La cámara y el reactor están conectados mediante un tubo de polipropileno que permite la recirculación del aire conteniendo el bioaerosol, constituyendo así un sistema cerrado. Un ventilador axial ubicado luego de la cámara facilita la dispersión de la muestra nebulizada.

Se propusieron tres materiales para utilizar como placas soportes para depositar el catalizador, esto es vidrio borosilicato (seis placas), vidrio común esmerilado (seis placas) y filtro (una placa). Se realizaron ensayos fotocatalíticos (en presencia de radiación y fotocatalizador) como así también ensayos controles – i) con radiación y placas sin recubrir, ii) sin radiación con placas recubiertas con  $\text{TiO}_2$  y iii) sin radiación y placas sin recubrir – para analizar tanto el efecto fotocatalítico como todos los no-fotocatalíticos en la inactivación, es decir, exclusivo a radiación, adsorción de fagos sobre el catalizador en las placas o deposición de los fagos en distintas superficies del reactor. Se graficaron los resultados obtenidos ( $\log(P)$  vs tiempo) y las curvas de inactivación siguieron una cinética de primer orden respecto a la concentración de fagos. Las constantes de inactivación aparente totales ( $k_T$ ) tomaron valores de 0,145 1/min (vidrio común esmerilado), 0,156 1/min (vidrio borosilicato) y 0,199 1/min (filtro), no existiendo diferencias significativas entre ellas ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar que la constante obtenida para los ensayos sin catalizador ni radiación ( $k_{\text{reactor}}$ , que representa la porción fágica depositada sobre las superficies del reactor) constituye entre el 45 y el 58 % del valor de  $k_T$  para los distintos soportes, es decir que la deposición de partículas fágicas reviste una elevada importancia en la no detección de las mismas en la toma de muestra. A su vez se calcularon las tasas de reducción fágica en órdenes log/min para todos los ensayos, obteniéndose valores de 0,071 órdenes log/min (vidrio común esmerilado), 0,074 1/min (vidrio borosilicato) y 0,0912 1/min (filtro) para los ensayos fotocatalíticos. Al calcular los  $t_{99}$ , se obtuvieron valores de 63,11 min (vidrio común esmerilado), 61,80 min (vidrio borosilicato) y 52,86 min (filtro). Finalmente se determinaron las eficiencias fotónicas, resultando en valores de  $1,25 \times 10^7 \text{ UFP/Einstein}$

(vidrio común esmerilado),  $7,82 \times 10^6$  UFP/Einstein (vidrio borosilicato) y  $6,47 \times 10^7$  UFP/Einstein (filtro), las eficiencias cuánticas, que presentaron valores de  $3,78 \times 10^7$  UFP/Einstein (vidrio común esmerilado),  $2,86 \times 10^7$  UFP/Einstein (vidrio borosilicato) y  $1,50 \times 10^8$  UFP/Einstein (filtro) y las eficiencias energéticas para las lámparas fluorescentes empleadas, que se encontraron entre 1,79 y 1,80 UFP/J.

Además de los soportes para el catalizador, también se varió la fuente de radiación, cambiando las lámparas fluorescentes por lámparas LEDs UV-A (dos grupos de doce lámparas). El catalizador se soportó sobre una placa de filtro, ya que dicho soporte presentó las mayores eficiencias con la anterior fuente de radiación ensayada. La constante  $k_T$  para el caso de las lámparas LEDs fue de 0,1143 1/min, siendo significativamente menor a la obtenida para las lámparas fluorescentes y el mismo soporte ( $p < 0,05$ ). Las tasas de reducción fágica también fueron menores con lámparas LEDs (0,0457 órdenes log/min) mientras que el parámetro  $t_{99}$  fue mayor (69,84 min). Sin embargo, las eficiencias fotónica ( $1,08 \times 10^9$  UFP/Einstein), cuántica ( $2,96 \times 10^9$  UFP/Einstein) y energética (4,32 UFP/J) fueron mayores para el sistema de iluminación LED, resultando el proceso más eficiente que al emplear lámparas fluorescentes.

Debido a que no se hallaron diferencias significativas entre las constantes  $k_T$  para los distintos soportes, a que las mayores eficiencias tanto fotónica como cuántica se obtuvieron con el filtro y al menor costo de este material, el filtro sería el soporte más adecuado para depositar el catalizador. Por otro lado, a pesar de presentar un menor valor de  $k_T$ , el sistema de radiación LED presentó las mayores eficiencias fotónica, cuántica y energética. Además, esta fuente de radiación es *eco-friendly*, posee una mayor vida útil que las lámparas fluorescentes y representa un menor costo a largo plazo, por lo que se sugiere su empleo para operar el reactor.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Bacteriófago y cepa hospedadora**

Para llevar adelante los estudios en el equipo fotocatalítico (UV-A, TiO<sub>2</sub> como catalizador) a escala semi-piloto, se utilizó el fago ATCC 8014-B1 (GenBank JX486087), cuya cepa hospedadora es *Lp. plantarum* ATCC 8014. Este fago se seleccionó como modelo de estudio ya que fue ampliamente estudiado y caracterizado previamente en cuanto a su inactivación fotocatalítica. Incluso con este fago se puso a punto el funcionamiento del reactor fotocatalítico empleado en este capítulo (Briggiler Marcó et al., 2009, 2018, 2021). Asimismo, su manejo en el laboratorio resulta sencillo, no presentando dificultades tanto para su propagación como para la formación y visualización de las placas de lisis. El almacenamiento de la cepa y el fago, se realizó de igual forma a lo explicado en el Capítulo 2, como así también su propagación y cuantificación de acuerdo a lo reportado en la Tabla 2.1 (MRS como medio de cultivo y 37°C como temperatura de incubación).

El fago, luego de ser propagado (hasta un título de aproximadamente  $7 \times 10^9$  UFP/ml) y filtrado (0,45 µm de diámetro de poro), se concentró utilizando tubos Vivaspín® 20 (Membrana 100,000 MWCO PES, Sartorius, Reino Unido). Para ello, la suspensión fágica se colocó en el tubo Vivaspín®, y se centrifugó a 4000 rpm durante 40 min a 15°C (Centrífuga Sorvall Legend X1R, Thermo Scientific, EEUU), obteniendo un fago 2,4 veces más concentrado que el propagado inicialmente.

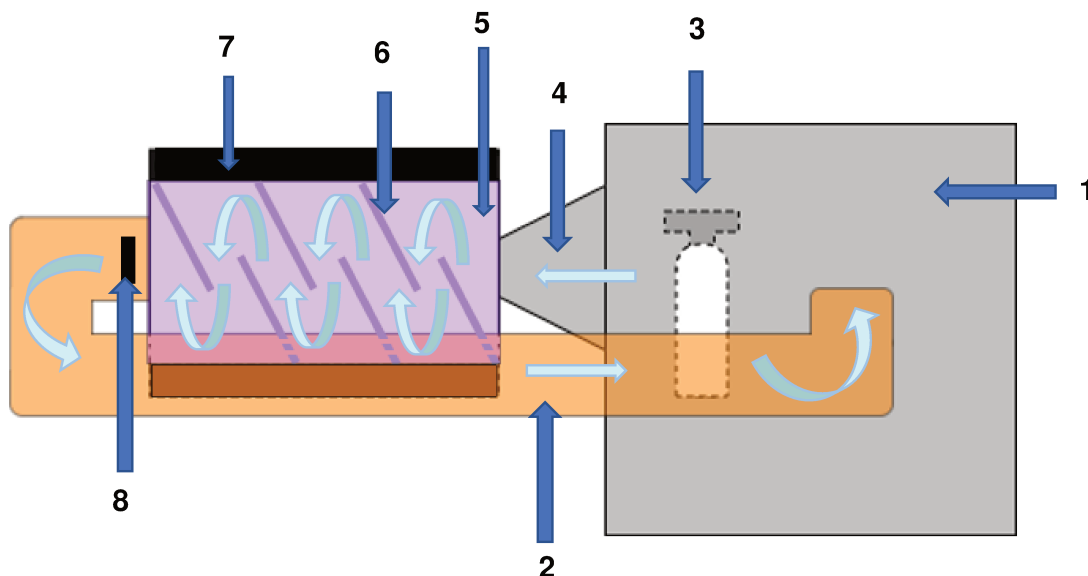
### **4.2.2. Sistema experimental**

El equipo a escala semi-piloto utilizado en este capítulo fue diseñado y construido previamente por el grupo de trabajo (Briggiler Marcó et al., 2018). El mismo está constituido por una cámara cúbica de acero inoxidable (60 cm de lado), un reactor fotocatalítico, que es un paralelepípedo de acrílico (transparente a la luz UV-A) de 30 cm de largo y 12 cm de ancho y alto, que puede contener hasta seis placas (12 cm × 12 cm) con una inclinación de 120° recubiertas con una película de catalizador (TiO<sub>2</sub>). Ambos compartimentos están conectados con un ventilador axial con el objetivo de forzar al aire a circular desde la cámara hacia el reactor fotocatalítico. A su vez, la cámara y el reactor están también conectados a través de un tubo de polipropileno de 10 cm de diámetro para recircular el aire, constituyendo un sistema cerrado (Figura 4.1).

El sistema de emisión de luz varió según la experiencia a realizar, pudiendo estar constituido por lámparas fluorescentes o lámparas LEDs (ver Sección 4.2.2.2).

Dentro de la cámara de acero inoxidable se colocó el nebulizador 6 Jet Collison (Keika Ventures, Chapel Hill, EEUU) a fin de inyectar la muestra fágica en el sistema,

simulando un bioaerosol. El fago ATCC 8014-B1 concentrado fue diluido 1:10 en agua destilada estéril, a fines de reducir los compuestos orgánicos presentes y se colocaron 40 ml de esta dilución en el nebulizador. El nebulizador trabajó conectado a un tubo de aire sintético. Se trabajó con una presión de 1,3 bar, operando el nebulizador por un total de 30 min, a fin de lograr títulos aproximadamente constantes dentro del equipo fotocatalítico ( $3,5 \times 10^4$  UFP/ml). El aire, conteniendo al bioaerosol, circuló desde la cámara de acero inoxidable hacia el reactor fotocatalítico impulsado por el ventilador y volvió a la cámara de acero inoxidable recirculando a través del tubo de polipropileno.



**Figura 4.1.** Esquema del equipo escala piloto utilizado, donde con flechas celestes se indica el sentido de circulación del bioaerosol y con flechas azules se indican las partes del equipo, siendo 1) Cámara de acero inoxidable, 2) Tubo de polipropileno para recirculación, 3) Nebulizador, 4) Ventilador, 5) Reactor fotocatalítico, 6) Soportes inclinados a 120° donde se deposita el catalizador, 7) Sistemas de iluminación (fluorescentes o LEDs) y 8) Toma de muestra.

#### 4.2.2.1. Soportes para el fotocatalizador y preparación de recubrimientos

Se estudiaron diversos soportes para la deposición del catalizador, entre los cuales se encontraron vidrio borosilicato, vidrio común esmerilado y filtro de aire de poliéster con diámetro de poro aproximado 357  $\mu\text{m}$  (Corona, Argentina). En el caso de los soportes vidrio borosilicato y vidrio común esmerilado, se utilizaron seis placas de 12 cm  $\times$  12 cm ubicadas con un ángulo de inclinación de 120° en el reactor. La altura y disposición de las placas permitió que quede un espacio libre para la circulación del bioaerosol conteniendo las partículas fágicas. Asimismo, la disposición de las placas permitió aumentar la velocidad lineal y la turbulencia dentro del reactor, contribuyendo a que el bioaerosol recorra todo el volumen del reactor, evitando la formación de *bypass*

o zonas muertas. Por otro lado, en el caso del filtro se usó únicamente una placa, en lugar de seis como con los soportes de vidrio. El filtro fue posicionado con la misma inclinación que el resto de los soportes, pero cubriendo completamente la sección de flujo del reactor, asegurando así que toda la suspensión fágica se encuentre en contacto con el catalizador y que la misma solamente circule a través de los poros del filtro. Además, al ser colocado de esta manera, el filtro cumpliría dos funciones, ya que sería el soporte del catalizador y estaría actuando propiamente como filtro, pudiendo quedar parte de la suspensión fágica retenida en el mismo. El ancho del filtro es igual que el de las otras placas (12 cm) pero, debido a que el filtro ocupa toda la extensión vertical del reactor, su altura fue superior al de las placas de vidrio, midiendo aproximadamente 13,86 cm.

El vidrio común fue esmerilado en nuestro laboratorio, previo a la deposición del catalizador, con un polvo de carburo de silicio para esmerilar. Este proceso de esmerilado tiene como objetivo hacer más rugosa la superficie del vidrio común para lograr una mayor retención del  $\text{TiO}_2$  sobre el soporte. Para ello, se colocó una pequeña cantidad de polvo sobre la placa de vidrio a esmerilar y, con ayuda de un trozo del mismo material de vidrio colocado sobre éste, se realizaron movimientos circulares, ejerciendo presión sobre la placa por aproximadamente 3 min, a fin de esmerilarla completamente de ambos lados.

El catalizador empleado fue  $\text{TiO}_2$  Aeroxide® P25 (Evonik, Essen, Alemania) y se depositó sobre las placas mediante la técnica del *dip-coating*, al igual que en los recubrimientos realizados en los capítulos anteriores. La cantidad de  $\text{TiO}_2$  depositada en los diferentes soportes fue estimada como la diferencia entre el peso del soporte antes y después de la deposición del catalizador. Se pesaron la totalidad de placas de todos los soportes para determinar la cantidad de  $\text{TiO}_2$  depositada en cada placa. Posteriormente, los valores obtenidos se promediaron para determinar la cantidad media de  $\text{TiO}_2$  depositada en cada soporte por unidad de superficie. Considerando que la reacción fotocatalítica ocurre en la superficie de los soportes recubiertos con el catalizador (donde reciben la radiación), la cantidad de catalizador depositada se expresó por unidad de área recubierta, para facilitar comparaciones. Para ello se calcularon las áreas superficiales de las placas, que resultaron en  $144 \text{ cm}^2$  para cada cara de las placas de vidrio borosilicato y vidrio común esmerilado y en  $166,32 \text{ cm}^2$  para cada cara del soporte filtro. Luego, la cantidad de catalizador depositada se dividió por el área superficial para cada soporte, obteniendo así la cantidad de catalizador por unidad de área recubierta.

De acuerdo al estudio de Zacarías et al. (2012), donde se observó un óptimo número de recubrimientos de fotocatalizador, se depositaron dos capas de catalizador

sobre los soportes. Para ello, una vez realizada la primera deposición, se llevaron todas las placas de vidrio (borosilicato y común esmerilado) a una estufa a 110 °C por 24 h para favorecer el proceso de secado del catalizador. Por el contrario, los filtros recubiertos se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, las placas de vidrio borosilicato fueron calcinadas en una mufla a 500 °C por 2 h, con una rampa de calentamiento de 5 °C/min, para mejorar la adherencia del sistema vidrio - catalizador. Los soportes filtro y vidrio común esmerilado no fueron calcinados ya que dichos materiales no soportarían temperaturas tan elevadas por tanto tiempo. Una vez que las placas estaban nuevamente a temperatura ambiente, se realizó la segunda deposición del catalizador por la técnica del *dip-coating*, de manera similar a lo realizado para la primera capa, con el posterior secado y calcinación, según corresponda.

#### 4.2.2.2. Sistema de emisión de radiación UV-A

##### 4.2.2.2.1. Lámparas fluorescentes

Este sistema de emisión de radiación incluyó dos juegos de diez lámparas UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm, TL4W/08 F4T5/BLB, Philips, Amsterdam, Países Bajos). Un grupo de lámparas se ubicó en la parte superior del reactor fotocatalítico y el otro grupo debajo del reactor, permitiendo que la luz ingrese al mismo a través de ambas ventanas planas de acrílico y que las placas conteniendo el catalizador sean irradiadas de ambos lados (superior e inferior). Las lámparas UV-A, operadas individualmente por un panel de control externo, se ubicaron dentro de cajas para mantener la radiación contenida y permitir una correcta manipulación de las mismas (Figura 4.2).



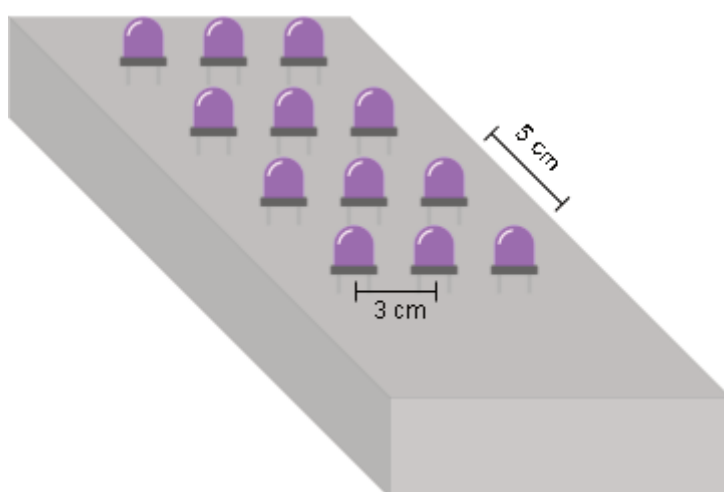
**Figura 4.2.** Esquema de las lámparas fluorescentes empleadas en el reactor fotocatalítico.

##### 4.2.2.2.2. Lámparas LEDs

El sistema de emisión de radiación UV-A LED, estuvo constituido por veinticuatro lámparas LEDs (UV-A LED Chips 5W,  $\lambda = 340 - 400$  nm, EPILEDs, Taiwán, China). La mitad de las LEDs fueron ubicadas sobre una plancha de aluminio, que fue posicionada en la parte superior del reactor y la otra mitad fue ubicada en otra plancha de aluminio debajo del mismo. De esta manera, al igual que con el sistema de emisión con lámparas fluorescentes, se permitió que la luz ingrese al reactor a través de las ventanas planas

de acrílico y que las placas recubiertas con el catalizador en el interior del reactor sean irradiadas de ambos lados (superior e inferior). Cada grupo de doce LEDs fue distribuido en tres filas equidistantes a lo ancho del reactor (3 cm) y cuatro lámparas en cada fila, a lo largo del reactor (5 cm) (Figura 4.3). Cada plancha de aluminio contó con disipadores de calor y dos pequeños ventiladores en la parte posterior, para favorecer la dispersión del calor generado durante el funcionamiento de las lámparas.

Las lámparas LED se conectaron a una fuente de laboratorio UNI-T 32 V 6A UTP1306 (Uni-Trend Technology, China) que permitió variar el voltaje de las mismas, a fin de lograr el valor de flujo de radiación deseado, dentro de los parámetros informados por el fabricante (3,4 – 3,8 V y 1400 mA por cada LED).



**Figura 4.3.** Distribución de las lámparas en el sistema de iluminación UV-A LED.

#### 4.2.2.3. Medición del flujo de radiación

El flujo de radiación incidente se midió utilizando un radiómetro (IL 1700 Research Radiometer de International Light). Para medir el flujo de radiación UV-A ( $\lambda = 340 - 400$  nm) para ambos sistemas de iluminación, se utilizó el sensor UV SED005 #847 (250 – 400 nm), un filtro de paso de banda (WBS320 #26831) y un difusor de ojo ancho (W #11187). El factor de sensibilidad a la respuesta del PIR fue de  $8,83 \times 10^{-4} \text{ A} \times \text{cm}^2/\text{W}$ .

Las mediciones del flujo de radiación para las lámparas fluorescentes se realizaron ubicando el sensor sobre un soporte especialmente diseñado para tal fin, con el objetivo de abarcar toda la superficie de la ventana acrílica del reactor, posicionando el sensor frente a las lámparas ubicadas en la parte superior. Se realizaron dieciocho mediciones en distintas posiciones espaciales, cubriendo toda la longitud del reactor, a un tercio y dos tercios del ancho de la ventana acrílica. Todas estas mediciones fueron realizadas por duplicado y promediadas para obtener el valor del flujo de radiación de las lámparas fluorescentes UV-A. Como las mediciones se realizaron para las lámparas

superiores y ambos grupos de lámparas son simétricas, el flujo de radiación medido y promediado fue multiplicado por dos para obtener el flujo de radiación total.

La medición del flujo de radiación para las lámparas LEDs se realizó ubicando al sensor sobre el mismo soporte utilizado para las lámparas fluorescentes, para realizar la medición a la misma distancia de las lámparas, y posicionando el sensor frente a las lámparas ubicadas en la parte superior del reactor pero, en este caso, las posiciones espaciales del sensor estuvieron determinadas por la ubicación de las lámparas LEDs. Como estas lámparas, a diferencia de las fluorescentes, generan un flujo de radiación discontinuo, fue necesario medir el flujo de radiación debajo de las lámparas y alrededor de ellas. Para eso, se realizaron las siguientes mediciones:

- a) Bordes externos del sistema de emisión.
- b) Debajo de las líneas de lámparas LEDs de los extremos.
- c) Entre las líneas de lámparas LEDs.
- d) Debajo de la línea de lámparas LEDs central.

A su vez, para las mediciones en cada una de estas franjas, el sensor se ubicó justo debajo de cada lámpara, entre dos lámparas consecutivas y antes y después de la primer y última LED, respectivamente. Todas estas mediciones fueron realizadas por duplicado y promediadas para obtener el valor del flujo de radiación de las lámparas LEDs. Como se mencionó en la Sección 4.2.2.2, las lámparas LEDs operaron conectadas a una fuente de laboratorio con las cuales se varió la tensión de trabajo. Se establecieron los valores de tensión de 11,35 V para las LEDs superiores y 11 V para las inferiores. Como consecuencia, se realizaron dos tandas de mediciones por duplicado (una a 11,35 V y otra a 11 V) y se sumaron ambos valores promediados para obtener el flujo total.

Por otro lado, la emisión espectral de ambos tipos de lámparas empleadas (fluorescentes y LEDs) fue determinada utilizando un espectrómetro portátil (Ocean Optics USB 2000+UV-Vis-ES).

#### 4.2.3. Ensayos de inactivación fágica

La suspensión fágica propagada y concentrada con tubos Vivaspin® fue diluida (1:10) en agua destilada estéril y nebulizada utilizando el nebulizador 6-jet Collison por 30 min, siendo el volumen total nebulizado de  $10 \pm 1$  ml. Para ello el nebulizador se ubicó dentro de la cámara, de tal manera que la suspensión nebulizada impactara sobre el ventilador para facilitar su dispersión. Los ensayos de inactivación fágica se realizaron en función del tiempo, con una duración total de 80 min, comenzando el conteo junto al proceso de nebulización. Durante los ensayos, el ventilador axial se encontró siempre encendido, para facilitar la dispersión de las partículas fágicas a lo largo del reactor. Se

realizaron los siguientes ensayos para cada soporte, similares a los realizados en el Capítulo 2:

- a) Placas sin recubrir irradiadas con lámparas UV-A (Control i).
- b) Placas recubiertas con TiO<sub>2</sub> en ausencia de radiación UV-A (Control ii).
- c) Placas sin recubrir en ausencia de radiación UV-A (Control iii).
- d) Placas recubiertas con TiO<sub>2</sub> irradiadas con lámparas UV-A (Ensayo fotocatalítico).

Las muestras fueron tomadas a tiempos predeterminados (30, 40, 60 y 80 min) usando una jeringa de un litro (1 L Super Syringe S1000 TLL, Hamilton, EEUU), desde el lugar indicado en la Figura 4.1 para la toma de muestra, a la salida del reactor fotocatalítico. La muestra fue subsecuentemente burbujeada lentamente en una botella que contenía 5 ml de caldo MRS y el contenido de la botella fue posteriormente filtrado con membranas de 0,45 µm de diámetro de poro (GVS Filtration Inc., Findlay, EEUU) para su cuantificación. La enumeración fágica fue realizada siguiendo el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991).

#### 4.2.4. Cálculos teóricos

##### 4.2.4.1. Cálculo de las constantes de inactivación

Las constantes  $k_T$ ,  $k_{control\ i}$ ,  $k_{control\ ii}$ ,  $k_{reactor}$ ,  $k_{light}$ ,  $k_{coating}$ ,  $k_{ph}$  y  $k_{nph}$  fueron obtenidas de acuerdo a lo explicado en la Sección 2.2.8.1 del Capítulo 2 (Ecuaciones 2.2 – 2.7).

##### 4.2.4.2. Cálculo de las eficiencias fotónica, cuántica y energética

Las eficiencias fotocatalíticas fotónica, cuántica y energética son parámetros confiables para evaluar el rendimiento en la inactivación fágica, considerando la energía consumida. Las eficiencias fotónica y cuántica se definen de igual manera que en el Capítulo 2 (Ecuaciones 2.9 y 2.10), representando la primera la relación entre la velocidad de inactivación aparente y el flujo de radiación incidente promedio sobre el recubrimiento fotocatalítico, mientras que la eficiencia cuántica representa la relación entre la velocidad de inactivación aparente y la tasa de radiación absorbida por el catalizador. En esta oportunidad los denominadores de las Ecuaciones 2.9 y 2.10 se calcularon de forma diferente a los del Capítulo 2 (Ecuaciones 4.1 y 4.2), ya que se cambió de equipo experimental.

$$\eta_{ph} = \frac{-dPFU/dt|_{\Delta t}}{A_T \times (\langle q_{net} \rangle_{sup} + \langle q_{net} \rangle_{inf})} = \frac{-dPFU/dt|_{\Delta t}}{A_P \times N \times \cos\theta \times (\langle q_P \rangle_{sup} + \langle q_P \rangle_{inf})} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned}
\eta_{qu} &= \frac{-dPFU/dt|_{\Delta t}}{A_T \times \int_{\lambda} (\langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{sup} + \langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{inf}) d\lambda} \\
&= \frac{-dPFU/dt|_{\Delta t}}{A_P \times N \times \cos\theta \times \int_{\lambda} (\langle q_P \rangle_{sup} + \langle q_P \rangle_{inf}) \times \frac{E_{\lambda}}{E_T} \times \alpha_{f,\lambda} d\lambda}
\end{aligned} \tag{4.2}$$

En estas ecuaciones,  $\theta$  es el ángulo de inclinación de las placas con respecto a la normal,  $\langle q_{net} \rangle_{sup}$  es el flujo de radiación total incidente neto promedio normal a las placas fotocatalíticas proveniente de las lámparas superiores del reactor, mientras que  $\langle q_{net} \rangle_{inf}$  es el correspondiente a las lámparas inferiores del reactor,  $\langle q_P \rangle_{sup}$  es el flujo de radiación total incidente promedio en las placas proveniente de las lámparas superiores del reactor, mientras que  $\langle q_P \rangle_{inf}$  es el proveniente de las lámparas inferiores,  $N$  es el número de placas en el reactor (seis placas para el vidrio borosilicato y el vidrio común esmerilado y uno para el filtro) y  $A_T$  y  $A_P$  son las áreas superficiales total y de cada placa. En el caso de las lámparas fluorescentes, los flujos superiores e inferiores son iguales, ya que ambos grupos de lámparas trabajaron en las mismas condiciones, como se explicó en la Sección 4.2.2.3. Por otro lado, con el objetivo de maximizar la irradiancia de las lámparas LEDs y obtener un flujo de radiación similar al de las lámparas fluorescentes, las lámparas LEDs fueron operadas con el máximo voltaje admitido, considerando que la intensidad de electricidad de las lámparas no supere 2,5 A en cada fuente, para evitar sobrecalentamientos. Este máximo voltaje admitido para el grupo de lámparas superiores fue de 11,35 V, mientras que para el grupo de lámparas inferiores fue de 11 V. Para este último grupo la disipación de calor fue menos eficiente y al aumentar el voltaje por encima de 11 V se corría el riesgo de sobrepasar el valor umbral de intensidad. Como se trabajó con distintos voltajes en cada grupo de lámparas, los flujos de radiación son diferentes para cada uno de ellos. Por otro lado,  $\langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle$  es la velocidad promedio local superficial de absorción de fotones (LSRPA por sus siglas en inglés),  $\alpha_{f,\lambda}$  es la fracción de radiación absorbida por la película de catalizador y  $\frac{E_{\lambda}}{E_T}$  es la emisión espectral relativa de las lámparas UV-A.

Además, se puede calcular la eficiencia energética para contemplar el consumo eléctrico de los diferentes sistemas ensayados, definida como la relación entre la velocidad de inactivación fágica ( $-dUFP/dt|_{\Delta t}$ ) y la potencia eléctrica requerida para operar la fuente de radiación, como se muestra en la Ecuación (4.3).

$$\eta_{ene} = \frac{\text{Velocidad de reacción}}{\text{Potencia total}} = \frac{-dUFP/dt|_{\Delta t}}{\text{Potencia total}} \tag{4.3}$$

Pero también es posible considerar la eficiencia energética como el producto de eficiencias individuales (Ecuación 4.4).

$$\eta_{ene} = \eta_{ele} \times \eta_{abs} \times \eta_{qu} \quad (4.4)$$

Donde  $\eta_{ele}$  es la eficiencia eléctrica, definida como la relación entre el flujo de radiación incidente por el área de las placas y la potencia que requiere la fuente de radiación para generar dicho flujo (Ecuación 4.5),  $\eta_{abs}$  es la eficiencia de absorción de radiación, definida como la relación entre el número de fotones absorbidos ( $e^a$ ) y el número de fotones incidentes ( $q_{net}$ ) (Ecuación 4.6) y  $\eta_{qu}$  es la eficiencia cuántica, previamente descrita, que relaciona los fagos inactivados por mol de fotones absorbidos por el catalizador (Ecuación 4.2). El parámetro  $\eta_{abs}$  depende fuertemente de las propiedades ópticas del catalizador.

$$\eta_{ele} = \frac{2 \times q_{net} \times A_T}{Potencia} \quad (4.5)$$

$$\eta_{abs} = \frac{\int_{\lambda} (\langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{sup} + \langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{inf}) d\lambda}{q_{net}} \quad (4.6)$$

La potencia de las distintas fuentes de radiación se calculó considerando la potencia de las lámparas fluorescentes y las lámparas LEDs según corresponda (Ecuación 4.7).

$$P_T = P_L \times N_L \quad (4.7)$$

Donde  $P_T$  representa la potencia del sistema de iluminación,  $N_L$  representa el número de lámparas y  $P_L$  representa la potencia de cada lámpara que, en el caso de las lámparas fluorescentes, es un valor entregado por el fabricante (4W) y en el caso de las lámparas LEDs se utilizaron los valores de tensión e intensidad leídos en la fuente eléctrica que regula la potencia entregada a las LEDs, considerando que las lámparas están conectadas en serie.

Para calcular las eficiencias fotónica, cuántica y energética, los numeradores de las Ecuaciones (4.1), (4.2) y (4.3) pueden ser obtenidos considerando un valor promediado de la tasa de inactivación en un período de tiempo  $t$ , que puede ser a su vez calculado con la Ecuación (2.11).

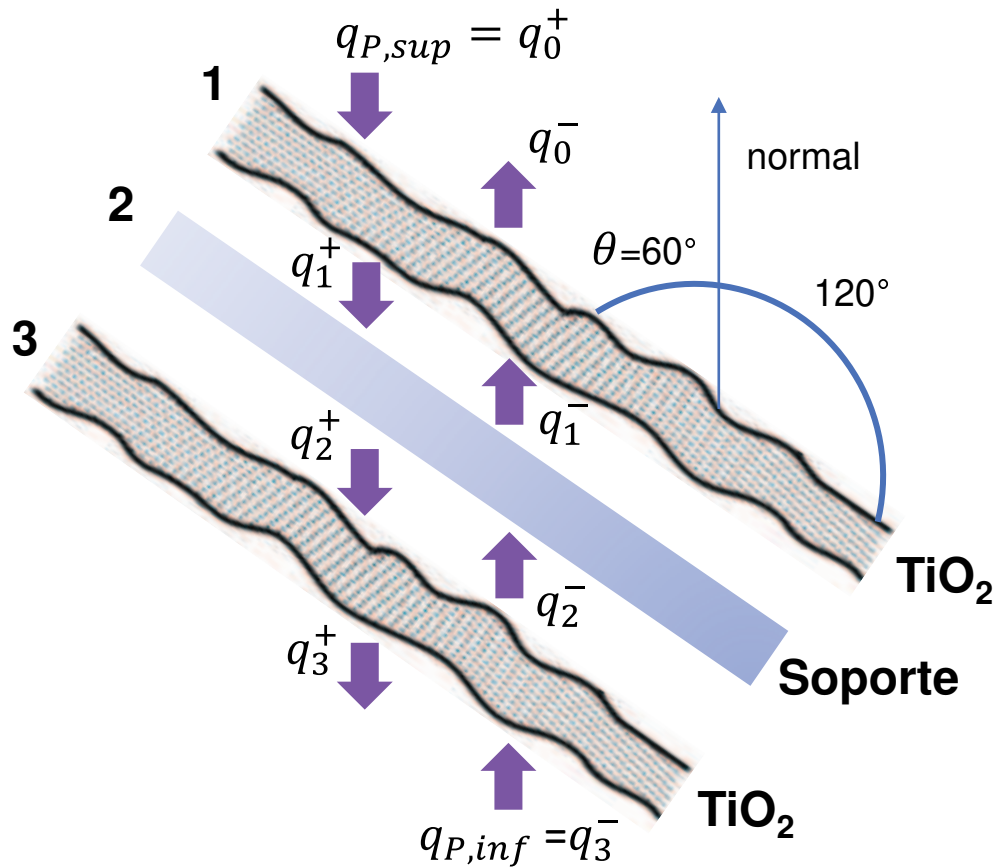
$$\left. \frac{-dUFP}{dt} \right|_{\Delta t=t-0} = \frac{\int_0^t P(t) \times V dt}{\int_0^t dt} = \frac{UFP|_{t=0} \times (1 - \exp(-k_T \times t))}{t} \quad (2.11)$$

Donde  $UFP|_{t=0}$  son las unidades formadoras de placa iniciales, obtenidas a partir del producto de la ecuación ajustada evaluada a tiempo cero ( $\left. \frac{UFP}{ml} \right|_{t=0} = P_0$ ) (Ecuación 2.3') y el volumen de la suspensión fágica nebulizado en el equipo (10 ml), y  $k_T$  es la constante cinética aparente, obtenida a partir del ajuste de los ensayos fotocatalíticos, según lo explicado previamente.

Dado que los soportes están recubiertos con el catalizador en ambas caras, se utilizó un modelo de tres capas para calcular el flujo de radiación que llega a cada capa de catalizador (Figura 4.4). De acuerdo a esta figura, la LSRPA de una película de catalizador inmovilizado  $m$ , está dada por la absorción de la radiación directa e indirecta (Ecuación 4.8).

$$e_{\lambda,m}^{a,s}(\underline{x}) = \alpha_{f,\lambda} \times q_{m-1,\lambda}^+(\underline{x}) + \alpha_{f,\lambda} \times q_{m,\lambda}^-(\underline{x}) \quad m = 1,2,3 \quad (4.8)$$

Donde  $q_{m-1,\lambda}^+(\underline{x})$  representa el flujo que incide sobre la capa de catalizador  $m$  proveniente de las lámparas superiores y  $q_{m,\lambda}^-(\underline{x})$  es el flujo que proviene de las lámparas inferiores. En el caso de la capa 1, por ejemplo,  $q_{m-1,\lambda}^+ = q_0^+ = q_{P,sup}$  representa el flujo directo recibido desde las lámparas superiores y  $q_{m,\lambda}^- = q_1^- = q_{P,inf}$  representa el flujo indirecto proveniente de las lámparas inferiores, que atraviesa el sistema multicapa hasta alcanzar la capa superior.



**Figura 4.4.** Representación esquemática de los recubrimientos de catalizador sobre el soporte y los flujos de radiación incidentes y transmitidos en cada capa, donde la capa 1 es la capa superior del catalizador y la 3, la inferior.

Considerando que el flujo incidente es en su mayoría uniforme sobre la superficie irradiada, se pueden utilizar valores promedios de los flujos netos en el área fotocatalítica irradiada,  $A_{irr}$ , para obtener la velocidad superficial promedio espectral de absorción de fotones (Ecuación 4.9).

$$\langle e_{\lambda,m}^{a,s} \rangle_{A_{irr}} = \alpha_{f,\lambda} \times \langle q_{m-1,\lambda}^+ \rangle_{A_{irr}} + \alpha_{f,\lambda} \times \langle q_{m,\lambda}^- \rangle_{A_{irr}} \quad (4.9)$$

Si bien el soporte filtro es poroso y se depositó catalizador en sus intersticios, este soporte fue aproximado también a este modelo de 3 capas, ya que las lámparas irradian la superficie del soporte con catalizador, produciéndose allí la reacción fotocatalítica. Los soportes vidrio común esmerilado y filtro no son transparentes a la radiación UV-A, por lo que el flujo de radiación transmitido (indirecto) será nulo y la Ecuación (4.9), aplicada a la capa 1 por ejemplo, se simplifica a la Ecuación (4.10) para ambos soportes.

$$\langle e_{\lambda,1}^{a,s} \rangle_{A_{irr}} = \alpha_{f,\lambda} \times \langle q_{0,\lambda}^+ \rangle_{A_{irr}} \quad (4.10)$$

Dado que las fuentes de luz empleadas tienen una emisión espectral, es necesario integrar la Ecuación (4.9) a lo largo del espectro de longitudes de onda (Ecuación 4.11).

$$\langle e_{\lambda,m}^{a,s} \rangle_{A_{irr}} = \int_{\lambda} \frac{E_{\lambda}}{E_T} \times \alpha_{f,\lambda} \times \langle q_{m-1,\lambda}^+ \rangle_{A_{irr}} + \alpha_{f,\lambda} \times \langle q_{m,\lambda}^- \rangle_{A_{irr}} d\lambda \quad (4.11)$$

Donde  $\frac{E_{\lambda}}{E_T}$  es la emisión espectral relativa de las lámparas, siendo  $E_{\lambda}$  la emisión espectral de las lámparas determinada utilizando un espectrómetro portátil (Ocean Optics USB 2000 + UV – VIS – ES) según lo descrito en la Sección 4.2.2.3 y  $E_T$  la sumatoria de  $E_{\lambda}$  para todas las longitudes de onda.

Aplicando un balance de flujo radiante en cada capa de la Figura 4.4, se obtiene la Ecuación (4.12), para calcular el flujo incidente en una capa de fotocatalizador (Salvadores et al., 2016).

$$q_{m,\lambda}^+ = R_{m,\lambda} \times q_{m,\lambda}^- + T_{m,\lambda} \times q_{m-1,\lambda}^+ \quad m = 1,2,3 \quad (4.12)$$

Donde  $R_m$  y  $T_m$  representan la reflectancia y transmitancia difusas de la capa  $m$ , respectivamente, y  $q_{m-1,\lambda}^+$  y  $q_{m,\lambda}^-$  representan los flujos de radiación incidentes en la capa  $m$ . Realizando este balance para todas las capas del sistema y operando, se puede lograr una expresión del flujo que llega indirectamente a la capa 1, atravesando previamente las capas 2 y 3 (Ecuación 4.13).

$$q_{1,\lambda}^-(x) = \frac{q_{P,sup}(x) \times (R_s \times T_f - R_s^2 \times R_f \times T_f + T_s^2 \times R_f \times T_f) + T_s \times T_f \times q_{P,inf}(x)}{(1 - 2 \times R_s \times R_f + R_s^2 \times R_f^2 - T_s^2 \times R_f^2)} \quad (4.13)$$

Donde  $q_{P,sup}(x)$  y  $q_{P,inf}(x)$  son los flujos locales de radiación que inciden desde la parte superior e inferior, respectivamente, a la placa recubierta,  $T_s$  y  $R_s$  representan la transmitancia y reflectancia difusas del soporte sin recubrir y  $T_f$  y  $R_s$  representan la transmitancia y reflectancia difusas de la película de catalizador. En el caso en que  $q_{P,sup}(x) = q_{P,inf}(x) = q_{i,\lambda}(x)$ , la ecuación se simplifica a la Ecuación (4.13').

$$q_{1,\lambda}^-(x) = q_{i,\lambda}(x) \times \frac{R_s \times T_f - R_s^2 \times R_f \times T_f + T_s \times T_f + T_s^2 \times R_f \times T_f}{1 - 2 \times R_s \times R_f + R_s^2 \times R_f^2 - T_s^2 \times R_f^2} \quad (4.13')$$

Las propiedades ópticas fueron calculadas utilizando mediciones experimentales de transmitancias y reflectancias difusas del soporte sin recubrir y del soporte recubierto de ambos lados con catalizador ( $T_s$ ,  $R_s$ ,  $T_{fsf}$  y  $R_{fsf}$  respectivamente), determinados de manera similar a lo explicado en el Capítulo 2 (Ecuaciones 2.17 y 2.18).

$$R_f = \frac{R_{fsf} \times T_s - T_{fsf} \times R_s}{T_{fsf} \times T_s^2 - T_{fsf} \times R_s^2 + T_s} \quad (2.17)$$

$$T_f = \sqrt{\frac{(R_{fsf} - R_f) \times \left[ 1 - R_f \times \left( R_s + \frac{T_s^2 \times R_f}{1 - R_s \times R_f} \right) \right]}{R_s + \frac{T_s^2 \times R_f}{1 - R_s \times R_f}}} \quad (2.18)$$

Donde  $T_s$ ,  $R_s$ ,  $T_{fsf}$  y  $R_{fsf}$  son los valores de transmitancia y reflectancia difusa del soporte sin recubrir (s) y del soporte recubierto con el catalizador (película de catalizador + soporte + película de catalizador, *fsf* por sus siglas en inglés).

Resolviendo el balance de radiación en el catalizador, la fracción de energía absorbida ( $\alpha_f$ ) puede ser calculada como se muestra en la Ecuación (2.16) (Siegel y Howell, 2002).

$$\alpha_f = 1 - T_f - R_f \quad (2.16)$$

#### 4.2.5. Análisis estadístico

Todas las experiencias se realizaron por triplicado en ensayos independientes. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía utilizando el software R, con un error típico ( $\alpha$ ) de 5 %. Todos los supuestos del modelo fueron verificados. Las comparaciones entre las constantes de inactivación en los distintos ensayos, entre los diversos soportes y entre las distintas fuentes de radiación se realizaron con el Test de Duncan, para poder detectar diferencias significativas con mayor facilidad, ya que no se realiza un gran número de comparaciones.

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Deposición de catalizador en los distintos soportes**

Como se mencionó en la Sección 4.2.2.1, la cantidad de catalizador depositada en los distintos soportes fue estimada realizando una diferencia entre el peso del soporte previo a la deposición del catalizador y posterior a la misma. En el caso de las placas de vidrio borosilicato o común esmerilado, se pesaron las seis placas de ambos soportes y se calculó la cantidad de  $\text{TiO}_2$  depositada para cada una de ellas, siendo el valor reportado en la presente tesis un promedio entre las seis placas de cada soporte. Para el filtro, si bien se utilizó uno solo en el reactor durante los ensayos, también se recubrieron seis unidades. Entonces, para calcular la cantidad de catalizador depositado se pesaron todos filtros antes y después del recubrimiento, y se promediaron los valores obtenidos.

De acuerdo a lo previamente descripto, cada soporte fue recubierto con dos capas de catalizador. Sin embargo, cabe destacar que cuando se realizó la primera deposición de catalizador sobre el filtro, la cantidad depositada fue mayor que para dos capas de catalizador sobre los otros soportes. Por lo tanto, para el soporte filtro sólo se realizó un único recubrimiento.

De esta manera, la cantidad promedio de catalizador depositada para ambas caras del soporte vidrio borosilicato fue de  $27,7 \pm 2,2$  mg  $\text{TiO}_2$ , mientras que para el vidrio común esmerilado y el filtro las cantidades depositadas fueron  $32,1 \pm 2,1$  mg  $\text{TiO}_2$  y  $494,5 \pm 59,3$  mg  $\text{TiO}_2$ , respectivamente.

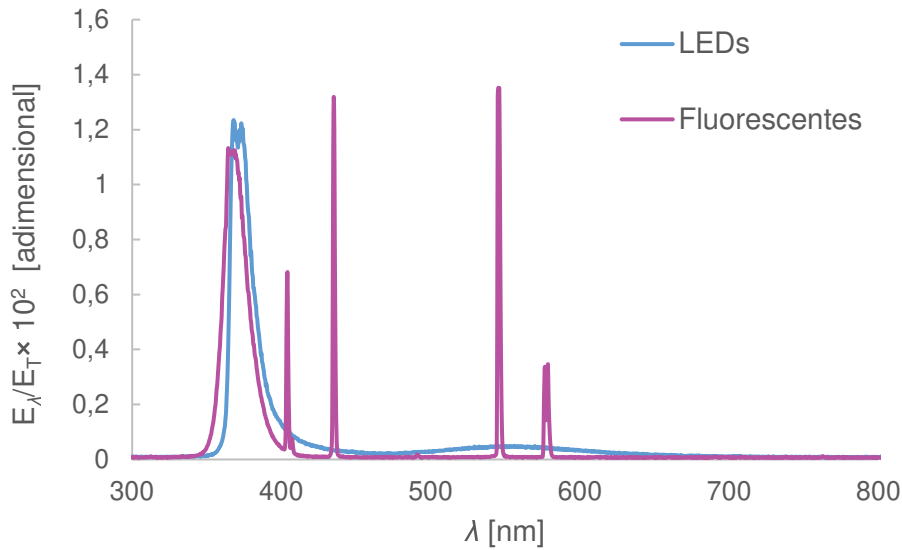
Como se puede observar, la cantidad de catalizador depositada para el filtro es al menos un orden mayor que la correspondiente a los otros dos soportes, y esto se debe a que el filtro es un material poroso y el catalizador se deposita no sólo en el área superficial geométrica de una cara de  $166,32 \text{ cm}^2$ , sino también entre los intersticios del material, la cual se supone no participaría de la reacción fotocatalítica al no recibir radiación de forma directa o atenuada.

#### **4.3.2. Campo radiante**

Para medir el flujo de radiación de las lámparas fluorescentes UV-A se procedió según lo explicado en la Sección 4.2.2.3, ubicando el sensor UV SED005 #847 frente a las lámparas, sobre el soporte diseñado para la medición de la radiación en toda la superficie de la ventana del reactor. Luego de medir por duplicado en las dieciocho posiciones establecidas por el dispositivo soporte y promediar dichas mediciones, se obtuvo un flujo de radiación incidente igual a  $4,33 \times 10^{-3} \pm 1,39 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  para un grupo de lámparas fluorescentes.

De igual manera, para medir el flujo de radiación de las lámparas LEDs, también se ubicó el sensor frente a las lámparas, siguiendo las indicaciones detalladas en la Sección 4.2.2.3. Se midió el flujo para cada posición indicada, pero debido a que las lámparas LEDs superiores trabajaron con un voltaje de 11,35 V y las inferiores con uno de 11 V, se realizaron las mediciones con cada grupo de lámparas. El valor del flujo de radiación incidente para las lámparas superiores fue de  $4,1 \times 10^{-4} \pm 2,6 \times 10^{-8} \text{ W/cm}^2$  y para las lámparas inferiores,  $2,2 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-8} \text{ W/cm}^2$ .

Para obtener el flujo de radiación incidente entre las longitudes de onda de 250 y 450 nm, radiación útil para el fotocatalizador empleado, es necesario considerar la emisión espectral  $\left(\frac{E_\lambda}{E_T}\right)$  de las lámparas empleadas (Figura 4.5). Los valores resultantes para el sistema de radiación con lámparas fluorescentes fueron  $\langle q_{P,\lambda} \rangle_{sup}^{fluorescentes} = \langle q_{P,\lambda} \rangle_{inf}^{fluorescentes} = 4,33 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  y para el sistema de radiación con lámparas LEDs fueron  $\langle q_\lambda \rangle_{sup}^{LEDs} = 3,24 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$  y  $\langle q_\lambda \rangle_{inf}^{LEDs} = 1,74 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$ . Cabe destacar que los flujos de radiación para el sistema de iluminación LED resultaron casi un orden menor que los correspondientes a las lámparas fluorescentes.

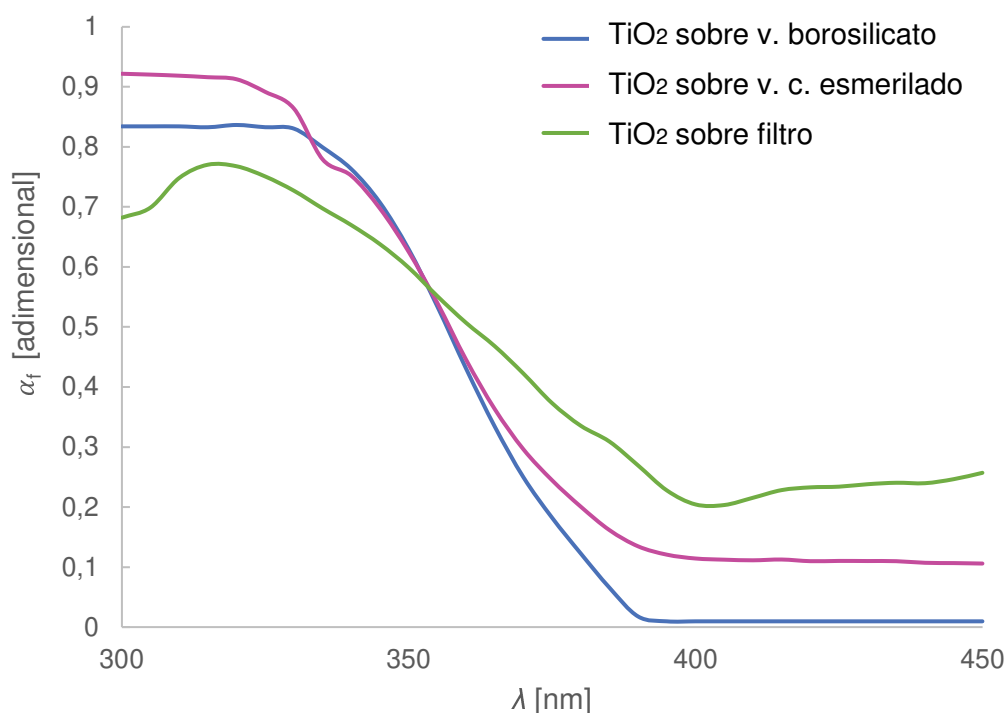


**Figura 4.5.** Distribución espectral de emisión de las lámparas UV-A fluorescentes y LEDs.

La fracción de radiación absorbida por el  $\text{TiO}_2$  ( $\alpha_f$ ) fue determinada mediante la medición de las propiedades ópticas de los recubrimientos para cada soporte (reflectancia y transmitancia difusas, Ecuaciones 2.13 – 2.15) y se muestra en la Figura 4.6. La velocidad local superficial de absorción de fotones (LSRPA) espectral fue calculada de acuerdo a la Ecuación (4.9). Integrando en todas las longitudes de onda emitidas por las lámparas fluorescentes según la Ecuación (4.11), la LSRPA total resultó

en  $1,44 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  ( $4,39 \times 10^{-9} \text{ Einstein/(s} \times \text{cm}^2)$ ) para el  $\text{TiO}_2$  depositado sobre vidrio común esmerilado y  $1,88 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  ( $5,77 \times 10^{-9} \text{ Einstein/(s} \times \text{cm}^2)$ ) para el  $\text{TiO}_2$  depositado sobre el filtro.

Es importante recordar que el vidrio borosilicato es un material transparente a la radiación UV-A, por lo que parte de la radiación transmitida por el vidrio llegará a la cara opuesta del soporte, a la segunda capa del catalizador, y debe ser considerada para el cálculo de la LSRPA. Como el sistema de radiación posee lámparas tanto en la parte superior del reactor como en la parte inferior del mismo, la radiación transmitida proveniente de las lámparas superiores alcanzará la capa de  $\text{TiO}_2$  que se encuentra en la parte inferior de la placa y lo mismo sucede con la radiación transmitida proveniente de las lámparas inferiores que alcanzará la capa superior del recubrimiento, y viceversa. Al considerar esta radiación “extra” que llega a las placas, la LSRPA para las lámparas fluorescentes al usar el soporte vidrio borosilicato fue de  $1,90 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  ( $5,81 \times 10^{-9} \text{ Einstein/(s} \times \text{cm}^2)$ ), según Ecuación (4.11).



**Figura 4.6.** Fracción espectral de energía absorbida por la película de  $\text{TiO}_2$  ( $\alpha_f$ ) al ser depositado en los distintos soportes.

#### 4.3.3. Ensayos de inactivación con distintos soportes

Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo explicado en la Sección 4.2.3, con distintos soportes para el catalizador. Los resultados para los ensayos con cada soporte utilizando las lámparas fluorescentes se graficaron como  $\log(P)$  vs tiempo.

Luego del funcionamiento del reactor durante 30 h utilizando los mismos recubrimientos, se alcanzaron similares reducciones en la concentración de partículas fágicas en la muestra de aire que cuando se utilizaron los soportes recubiertos por primera vez. Por lo tanto, se puede afirmar que no se observó desactivación del fotocatalizador después de estar operando el reactor por al menos 30 h empleando los mismos recubrimientos fotocatalíticos.

A fin de obtener las constantes de inactivación, el tratamiento de los datos se realizó de forma semejante con los tres soportes para el catalizador. Los datos obtenidos a partir de cada ensayo fueron ajustados con la Ecuación (2.3') y se realizó el análisis estadístico para comparar las constantes obtenidas a partir de los distintos ensayos realizados con el mismo soporte.

El parámetro  $k_{reactor}$ , que se obtuvo a través del ajuste de los datos del Control iii con la Ecuación (2.3'), representa la reducción de fagos presentes en el aire debido a la circulación (y recirculación) de los mismos a lo largo del reactor, durante las cuales las partículas fágicas podrían ser depositadas en distintas partes del equipo, tales como la cámara de acero inoxidable, las paredes del reactor y el tubo de recirculación. Al quedar depositados en las diversas superficies, estas partículas fágicas no son detectadas al tomar muestras de aire y, por lo tanto, no son cuantificadas. Dada la configuración del reactor, la reducción de fagos en el aire causada por la operación del reactor está presente en todos los ensayos, por lo que debe ser tomada en cuenta al momento de discriminar cada efecto.

La constante de inactivación fotoquímica ( $k_{light}$ ) representa únicamente el efecto de la radiación UV-A sobre las partículas fágicas. Para obtener esta constante, es necesario restar el valor de  $k_{reactor}$  a la constante obtenida a partir de la regresión de los valores correspondientes al Control i (placas sin recubrir bajo radiación UV-A,  $k_{control i}$ ) con la Ecuación (2.3'). De la misma manera, cuando se desea obtener la constante que representa la reducción de partículas fágicas presentes en el aire debida exclusivamente a la presencia del catalizador en los soportes ( $k_{coating}$ ), en ausencia de radiación, también es necesario restarle el valor de  $k_{reactor}$  a la constante obtenida a partir de la regresión con la Ecuación (2.3') de los valores correspondientes al Control ii (placas recubiertas en ausencia de radiación,  $k_{control ii}$ ).

Como se explicó anteriormente, estos tres efectos son denominados “no - fotocatalíticos”, ya que la inactivación fágica no se produce por el proceso de fotocátalisis en sí mismo, sino por otros efectos que, si bien se presentan y ocurren simultáneamente, no son puramente fotocatalíticos. Por lo tanto, estas tres constantes pueden ser agrupadas en otra constante, denominada  $k_{nph}$  (Ecuación 2.5).

A partir del ajuste de los valores de los ensayos fotocatalíticos con la Ecuación (2.3'), se determinó el valor de  $k_T$ . Restando el valor de  $k_{nph}$  al valor de  $k_T$  (Ecuación 2.4), finalmente se obtuvo el valor de  $k_{ph}$ , la constante cinética aparente exclusivamente fotocatalítica.

Finalmente, para todos los ensayos de cada soporte se calcularon las tasas de reducción fágica [órdenes log/min], calculadas como la diferencia entre el punto de la curva de inactivación correspondiente a los 30 min, que es el tiempo en el que se detectaron títulos constantes dentro del reactor y se apagó el nebulizador, y el último punto en el cual se detectaron partículas fágicas infectivas (60 u 80 min) dividido por el período de tiempo en el cual se logró dicha reducción (30 o 50 min) y promediados entre todas las réplicas de dicho ensayo.

Similar a los capítulos anteriores, es posible calcular el parámetro  $t_{99}$ , que representa el tiempo necesario para inactivar el 99 % de las partículas fágicas iniciales, es decir, reducir la infectividad fágica en 2 órdenes log. Al igual que en los Capítulos 2 y 3, el  $t_{99}$  se determinó a partir de graficar las partículas fágicas infectivas luego del tratamiento fotocatalítico en función del tiempo ( $\log(P)$  vs. tiempo), en esta oportunidad empleando las curvas de los ensayos fotocatalíticos realizados con los distintos soportes.

#### 4.3.3.1. Vidrio borosilicato

En el gráfico correspondiente al vidrio borosilicato (Figura 4.7), se observa que las curvas de inactivación del Control i, Control ii y Control iii tienen pendientes similares, mientras que la curva del ensayo fotocatalítico presenta una pendiente mayor, confirmado luego a partir de las regresiones (Tabla 4.1), indicando una mayor inactivación fágica bajo estas condiciones de operación. En la Tabla 4.1. se muestran los parámetros obtenidos ( $k$ ,  $\log(P_0)$ ) a partir del ajuste de la Ecuación (2.3') a los datos experimentales de cada ensayo junto a la bondad del ajuste ( $R^2$ ).

En la Tabla 4.1 se observan los valores de las constantes cinéticas de inactivación aparente para los distintos ensayos ( $k_{control\ i}$ ,  $k_{control\ ii}$ ,  $k_{reactor}$  y  $k_T$ ). A partir de estos valores y empleando las Ecuaciones (4.1, 4.2, 2.4 y 2.5) se obtuvieron los valores de las constantes  $k_{light}$  (0,0280 1/min),  $k_{coating}$  (0,007 1/min),  $k_{nph}$  (0,126 1/min) y  $k_{ph}$  (0,030 1/min).

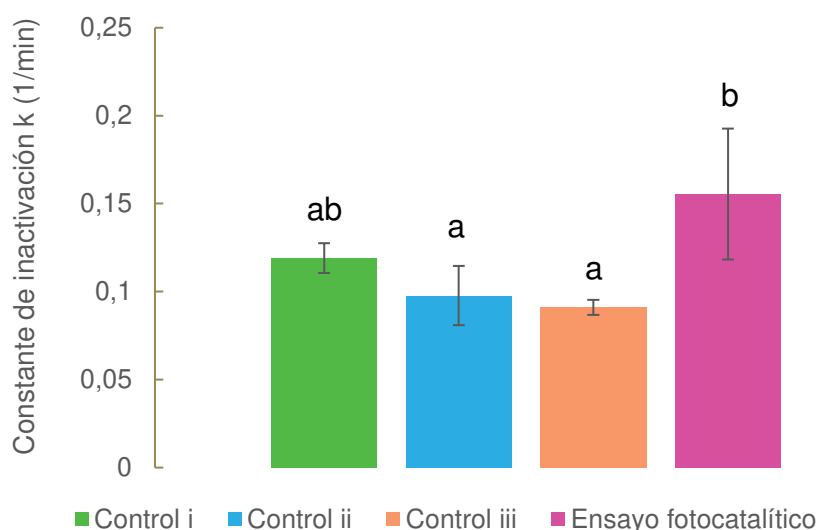
c

**Figura 4.7.** Inactivación fágica en función del tiempo y regresiones lineales,  $\log(P)$  vs. tiempo, para los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, con el catalizador depositado en el soporte vidrio borosilicato en presencia de radiación UV-A (lámparas fluorescentes).

**Tabla 4.1.** Parámetros de las regresiones lineales obtenidas para los ensayos con vidrio borosilicato como soporte y lámparas fluorescentes.

|                              | $k$<br>[1/min]      | $\log(P_0)$<br>[log(UFP/ml)] | $R^2$ |
|------------------------------|---------------------|------------------------------|-------|
| <b>Control i</b>             | $0,1190 \pm 0,0085$ | $6,15 \pm 0,21$              | 0,97  |
| <b>Control ii</b>            | $0,098 \pm 0,013$   | $5,40 \pm 0,48$              | 0,96  |
| <b>Control iii</b>           | $0,0910 \pm 0,0042$ | $6,24 \pm 0,34$              | 0,98  |
| <b>Ensayo fotocatalítico</b> | $0,156 \pm 0,037$   | $6,16 \pm 0,91$              | 0,99  |

Al analizar los valores de las constantes obtenidas para las distintas corridas con el soporte vidrio borosilicato, se observa que no hay diferencias significativas entre las constantes correspondientes a las curvas del Control i, Control ii y Control iii con un 95 % de nivel de confianza, mientras que hay diferencias significativas entre el ensayo fotocatalítico con los Controles ii y iii ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.8). La falta de diferencias significativas entre las constantes del Control i y del ensayo fotocatalítico probablemente esté relacionada con el error considerable obtenido en los ensayos fotocatalíticos.



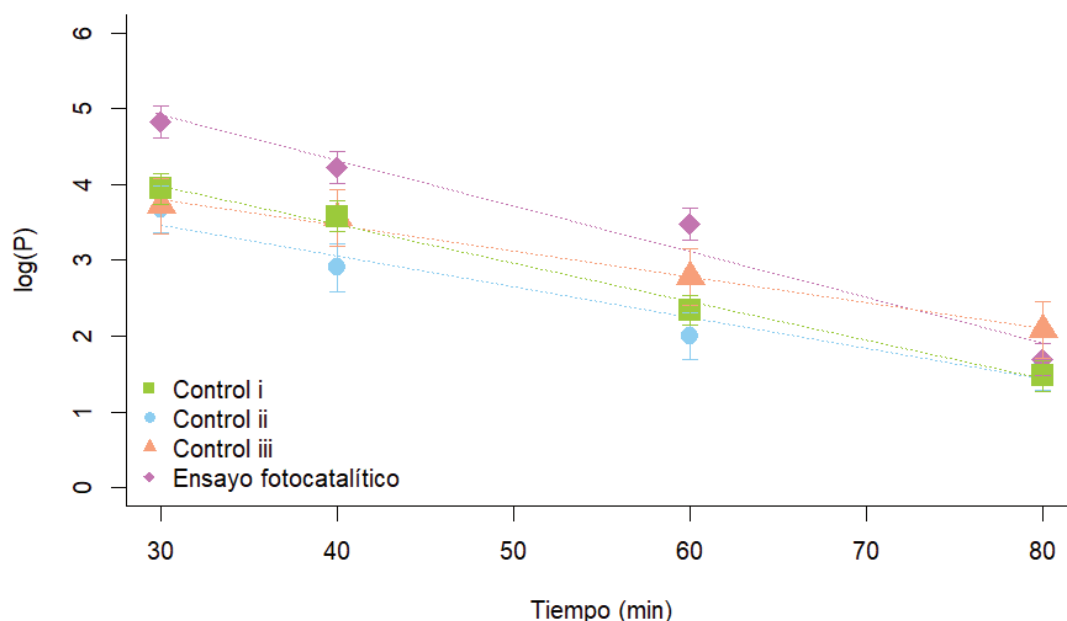
**Figura 4.8.** Constantes de inactivación ( $k_T$ ,  $k_{control\ i}$ ,  $k_{control\ ii}$ ,  $k_{reactor}$ ) obtenidas en los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, empleando el soporte vidrio borosilicato para el catalizador en presencia de radiación UV-A (lámparas fluorescentes). Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, las tasas de reducción fágica obtenidas para los distintos ensayos con el soporte vidrio borosilicato fueron  $0,0531 \pm 0,0075$  órdenes log/min para el Control i,  $0,0438 \pm 0,0075$  órdenes log/min para el Control ii,  $0,0389 \pm 0,0043$  órdenes log/min para el Control iii y  $0,074 \pm 0,012$  órdenes log/min para el ensayo fotocatalítico.

El valor del parámetro  $t_{99}$  obtenido a partir de los ensayos fotocatalíticos con el soporte vidrio borosilicato fue de 61,80 min, lo cual nos indica que ese es el tiempo necesario para lograr una inactivación del 99 % del fago ATCC 8014-B1 en las condiciones del ensayo.

#### 4.3.3.2. Vidrio común esmerilado

En el gráfico correspondiente al vidrio común esmerilado (Figura 4.9) se observa que, al contrario del gráfico de vidrio borosilicato, la curva del Control i presentó una mayor pendiente comparada a las curvas de los Controles ii y iii. Esto nos indicaría que el efecto fotoquímico tendría un rol relevante en la inactivación fágica para este soporte. Por otro lado, la curva del ensayo fotocatalítico presentó una pendiente aún mayor a la del Control i. En la Tabla 4.2 se muestran los parámetros obtenidos ( $k$ ,  $\log(P_0)$ ) a partir del ajuste de la Ecuación (2.3') a los datos experimentales de cada ensayo junto a la bondad del ajuste ( $R^2$ ).



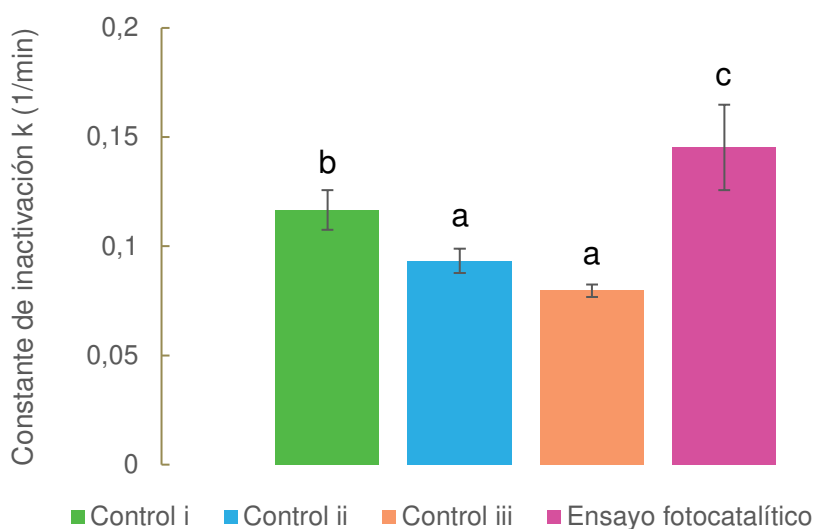
**Figura 4.9.** Inactivación fágica en función del tiempo y regresiones lineales,  $\log(P)$  vs. tiempo, para los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, con el catalizador depositado en el soporte vidrio común esmerilado en presencia de radiación UV-A (lámparas fluorescentes).

**Tabla 4.2.** Parámetros de las regresiones obtenidas para los ensayos con vidrio común esmerilado como soporte y lámparas fluorescentes.

|                              | $k$<br>[1/min]      | $\log(P_0)$<br>[log(UFP/ml)] | $R^2$ |
|------------------------------|---------------------|------------------------------|-------|
| <b>Control i</b>             | $0,1167 \pm 0,0091$ | $5,51 \pm 0,76$              | 0,97  |
| <b>Control ii</b>            | $0,0933 \pm 0,0055$ | $5,63 \pm 0,53$              | 0,95  |
| <b>Control iii</b>           | $0,0797 \pm 0,0029$ | $5,75 \pm 0,85$              | 0,97  |
| <b>Ensayo fotocatalítico</b> | $0,145 \pm 0,020$   | $6,68 \pm 0,29$              | 0,98  |

Al igual que con el vidrio borosilicato, en la Tabla 4.2 se observan los valores de las constantes cinéticas de inactivación aparente para los distintos ensayos. Con estas constantes y las Ecuaciones (4.1, 4.2, 2.4 y 2.5) se obtuvieron los valores de  $k_{light}$  (0,0370 1/min),  $k_{coating}$  (0,0137 1/min),  $k_{nph}$  (0,1303 1/min) y  $k_{ph}$  (0,015 1/min).

Al analizar los valores de las constantes obtenidas para las distintas corridas con el soporte vidrio común esmerilado, se observó que existen diferencias significativas entre la constante obtenida con el ensayo fotocatalítico y el resto de los ensayos, como así también entre la constante obtenida con el Control i y el resto de los ensayos, con un 95 % de nivel de confianza, mientras que no hay diferencias significativas entre los Controles ii y iii ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Constantes de inactivación ( $k_T$ ,  $k_{control\ i}$ ,  $k_{control\ ii}$ ,  $k_{reactor}$ ) obtenidas en los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, empleando el soporte vidrio común esmerilado para el catalizador en presencia de radiación UV-A (lámparas fluorescentes). Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

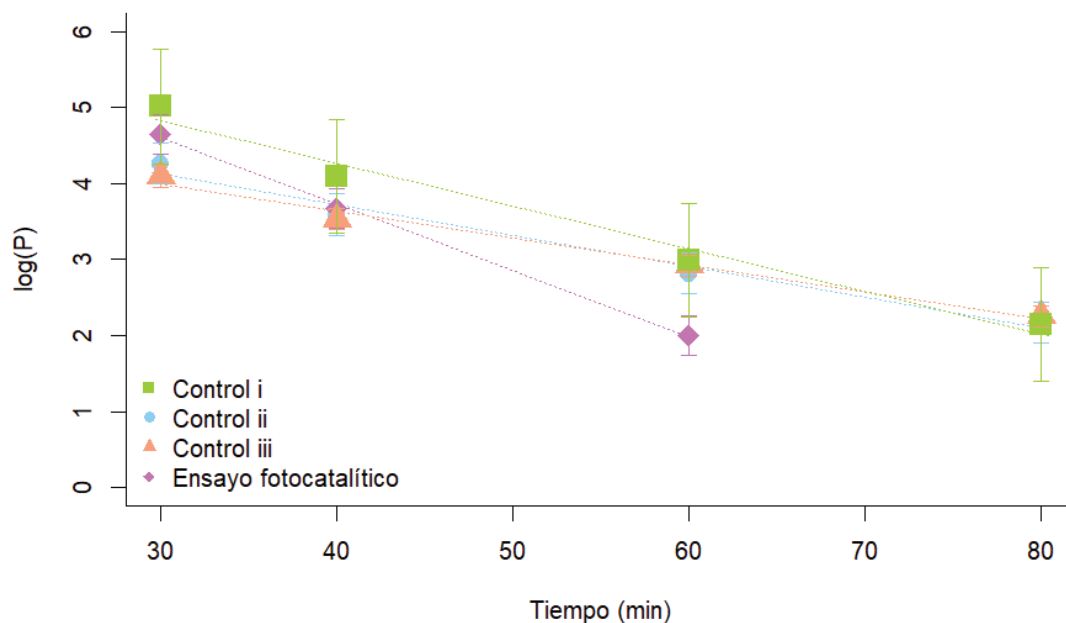
Finalmente, las tasas de reducción fágica obtenidas para los distintos ensayos con el soporte vidrio común esmerilado fueron  $0,0552 \pm 0,0086$  órdenes log/min para el Control i,  $0,0437 \pm 0,0056$  órdenes log/min para el Control ii,  $0,03304 \pm 0,00042$  órdenes log/min para el Control iii y  $0,071 \pm 0,015$  órdenes log/min para el ensayo fotocatalítico.

El valor del parámetro  $t_{99}$  obtenido a partir de los ensayos fotocatalíticos con el soporte vidrio común esmerilado fue de 63,11 min.

#### 4.3.3.3. Filtro

Se realizaron corridas equivalentes a un tiempo de 30 h con el mismo filtro recubierto con catalizador y no se observó que la corriente de la suspensión fágica haya tenido mayores dificultades en atravesarlo, por lo cual se considera que no hay problemas de taponamientos u obstrucción de los poros del filtro al reutilizarlo.

En el gráfico correspondiente al filtro (Figura 4.11) se observó que las curvas del Control ii y Control iii presentaron pendientes similares, mientras que la curva del Control i presentó una pendiente mayor al compararla con los otros dos controles, lo que indicaría una posible relevancia del efecto fotoquímico en la inactivación fágica también para este soporte. La curva del ensayo fotocatalítico presentó una pendiente aún mayor, indicando una mayor inactivación fágica bajo estas condiciones. En la Tabla 4.3 se muestran los parámetros obtenidos ( $k$ ,  $\log(P_0)$ ) a partir del ajuste de la Ecuación (2.3') a los datos experimentales de cada ensayo junto a la bondad del ajuste ( $R^2$ ).



**Figura 4.11.** Inactivación fágica en función del tiempo y regresiones lineales,  $\log(P)$  vs. tiempo, para los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, con el catalizador depositado en el soporte filtro en presencia de radiación UV-A (lámparas fluorescentes).

**Tabla 4.3.** Parámetros de las regresiones obtenidas para los ensayos con filtro como soporte y lámparas fluorescentes.

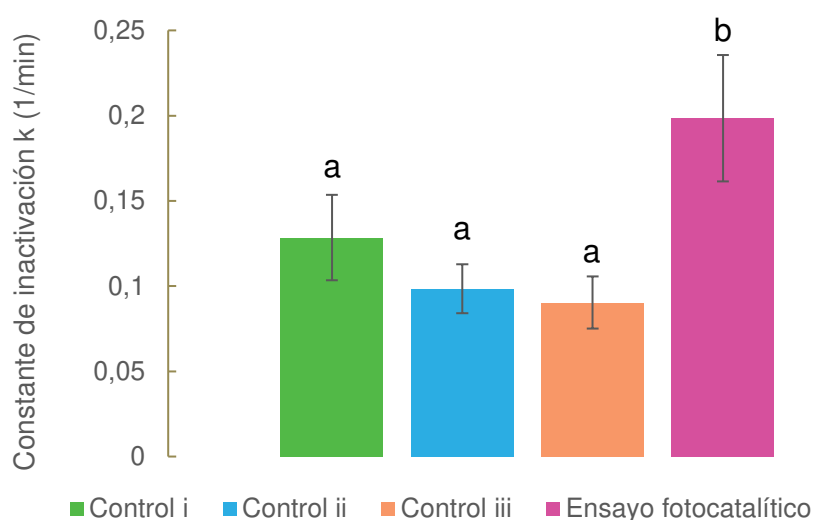
|                              | $k$<br>[1/min]    | $\log(P_0)$<br>[log(UFP/ml)] | $R^2$ |
|------------------------------|-------------------|------------------------------|-------|
| <b>Control i</b>             | $0,129 \pm 0,025$ | $6,54 \pm 0,28$              | 0,98  |
| <b>Control ii</b>            | $0,098 \pm 0,014$ | $5,89 \pm 0,45$              | 0,96  |
| <b>Control iii</b>           | $0,090 \pm 0,015$ | $5,89 \pm 0,77$              | 0,98  |
| <b>Ensayo fotocatalítico</b> | $0,199 \pm 0,037$ | $7,02 \pm 0,85$              | 0,99  |

De manera semejante a lo realizado para los otros soportes, la Tabla 4.3 muestra los valores de las constantes cinéticas de inactivación aparente obtenidas a partir de los distintos ensayos. Considerando estos valores y las Ecuaciones (4.1, 4.2, 2.4 y 2.5) se obtuvieron los valores de  $k_{light}$  (0,038 1/min),  $k_{coating}$  (0,008 1/min),  $k_{nph}$  (0,137 1/min) y  $k_{ph}$  (0,062 1/min).

Al analizar los valores de las constantes obtenidas para las distintas corridas con el filtro como soporte, se observó que no hay diferencias significativas entre las constantes correspondientes a las curvas del Control i, Control ii y Control iii con un 95 % de nivel de confianza, mientras que hay diferencias significativas entre el ensayo fotocatalítico y el resto de las corridas ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.12).

Finalmente, las tasas de reducción fágica obtenidas para los distintos ensayos con el soporte filtro fueron  $0,0561 \pm 0,0018$  órdenes log/min para el Control i,  $0,0454 \pm 0,0057$  órdenes log/min para el Control ii,  $0,03705 \pm 0,00031$  órdenes log/min para el Control iii y  $0,0912 \pm 0,0082$  órdenes log/min para el ensayo fotocatalítico.

El valor del parámetro  $t_{99}$  obtenido a partir de los ensayos fotocatalíticos con el soporte filtro fue de 52,86 min.

**Figura 4.12.** Constantes de inactivación ( $k_T$ ,  $k_{control i}$ ,  $k_{control ii}$ ,  $k_{reactor}$ ) obtenidas en los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, empleando el soporte filtro para

el catalizador en presencia de radiación UV-A (lámparas fluorescentes). Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3.4. Comparación entre los distintos soportes

En la Tabla 4.4 se presenta un resumen de los valores de las constantes cinéticas obtenidas para cada soporte en cada condición y se muestra el análisis estadístico realizado al comparar las constantes obtenidas de los datos experimentales entre los tres soportes.

Al comparar las constantes obtenidas con el Control iii ( $k_{reactor}$ ) con los tres soportes, se observó que no hubo diferencias significativas con un 95 % de nivel de confianza. De manera similar, al comparar las constantes obtenidas con el ensayo fotocatalítico ( $k_T$ ), se observó que tampoco hubo diferencias significativas entre los distintos soportes, con un 95 % de nivel de confianza. Esta herramienta estadística nos indicaría entonces que, si bien el valor de  $k_T$  obtenido para el filtro es numéricamente mayor, no lo sería significativamente y sería posible utilizar cualquiera de los soportes para el ensayo fotocatalítico obteniendo similares tasas de inactivación.

**Tabla 4.4.** Valores de las constantes cinéticas obtenidas para cada soporte en cada ensayo. Letras iguales en una misma fila indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

|                           | Vidrio borosilicato   | Vidrio común esmerilado | Filtro              |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|
| $k_{control\ i}$ [1/min]  | $0,1190 \pm 0,0085^a$ | $0,1167 \pm 0,0091^a$   | $0,129 \pm 0,025^a$ |
| $k_{control\ ii}$ [1/min] | $0,098 \pm 0,013^a$   | $0,0933 \pm 0,0055^a$   | $0,098 \pm 0,014^a$ |
| $k_{reactor}$ [1/min]     | $0,0910 \pm 0,0042^a$ | $0,0797 \pm 0,0029^a$   | $0,090 \pm 0,015^a$ |
| $k_{light}$ [1/min]       | 0,0280                | 0,0370                  | 0,038               |
| $k_{coating}$ [1/min]     | 0,007                 | 0,0137                  | 0,008               |
| $k_{nph}$ [1/min]         | 0,126                 | 0,130                   | 0,137               |
| $k_{\tau}$ [1/min]        | $0,156 \pm 0,037^a$   | $0,145 \pm 0,020^a$     | $0,199 \pm 0,037^a$ |
| $k_{ph}$ [1/min]          | 0,030                 | 0,015                   | 0,062               |

Entre los valores de  $k_{control\ ii}$  y así como también entre los valores de  $k_{control\ i}$  obtenidos para los distintos soportes tampoco existen diferencias significativas, con un 95 % de nivel de confianza (Tabla 4.4).

El análisis de los valores de las constantes de inactivación obtenidas en los ensayos realizados con los distintos soportes (Tabla 4.4) permite establecer comparaciones de interés.

Al comparar los valores de  $k_{nph}$  y  $k_{ph}$  se puede observar que el primer valor fue entre 2,21 (soporte filtro) y 8,7 (soporte vidrio común esmerilado) veces mayor que el segundo. Al analizar las  $k$  que componen a la constante  $k_{nph}$ , se observa que  $k_{reactor}$  fue alta, lo cual es lógico ya que durante la operación del reactor los fagos se van depositando en distintas superficies del equipo a medida que circulan por el mismo y no quedan suspendidos en el aire. Esta  $k_{reactor}$  representa entre un 61,3 y un 72 % del valor total de  $k_{nph}$ . Por otro lado,  $k_{coating}$  resultó en un valor pequeño para todos los soportes, y solo representa entre un 5,5 a 10,5 % del valor total de  $k_{nph}$ . Esto indica que los fagos no quedarían adheridos al fotocatalizador en mayor medida, o que el fotocatalizador no produce ninguna inactivación química. Finalmente,  $k_{light}$  tomó un valor intermedio comparada con  $k_{reactor}$  y  $k_{coating}$ , representando entre un 22 y un 28 % del valor total de  $k_{nph}$ .

Los valores de  $k_{nph}$  para los tres soportes resultaron ser muy similares. Este parámetro está compuesto por las constantes  $k_{reactor}$ ,  $k_{coating}$  y  $k_{light}$ . Al realizar el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre los valores de la constante  $k_{reactor}$  para los distintos soportes, con un 95 % de nivel de confianza. Por otro lado, la constante  $k_{light}$  para el soporte vidrio borosilicato fue levemente menor que en los otros dos casos. Como esta constante se obtiene a partir de la diferencia de las constantes  $k_{control\ i}$  y  $k_{reactor}$  y no experimentalmente, no fue posible realizar un análisis estadístico para analizar si existen diferencias entre los distintos soportes. A su vez, se observa que la  $k_{coating}$  toma un valor menor para los soportes filtro y vidrio borosilicato al compararlo con el obtenido para el vidrio común esmerilado, pero al igual que con la constante  $k_{light}$  no es posible realizar el análisis estadístico al no ser valores directamente experimentales. Los valores de la constante  $k_{coating}$  para los soportes filtro y vidrio borosilicato se encontraron en el orden de  $10^{-3}$  1/min, por lo que se podría concluir que, al analizar los efectos por separado, no influye en gran medida en la inactivación fágica ya que son 2 órdenes de magnitud menores a la constante de inactivación total  $k_T$ .

Por otro lado, en la Tabla 4.5 se muestra un resumen de los valores de las tasas de reducción fágica obtenidas en cada ensayo con los distintos soportes.

**Tabla 4.5.** Tasas de reducción fágica por unidad de tiempo [órdenes log/min] alcanzadas en cada ensayo con los distintos soportes.

|                                    | <b>Vidrio<br/>borosilicato</b> | <b>Vidrio común<br/>esmerilado</b> | <b>Filtro</b>     |
|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Control i<br>[órdenes log/min]     | 0,0531 ± 0,0075                | 0,0552 ± 0,0086                    | 0,0561 ± 0,0018   |
| Control ii<br>[órdenes log/min]    | 0,0438 ± 0,0075                | 0,0437 ± 0,0056                    | 0,0454 ± 0,0057   |
| Control iii<br>[órdenes log/min]   | 0,0389 ± 0,0043                | 0,0531 ± 0,0075                    | 0,03705 ± 0,00031 |
| Fotocatálisis<br>[órdenes log/min] | 0,074 ± 0,012                  | 0,071 ± 0,015                      | 0,0912 ± 0,0082   |

Al analizar la Tabla 4.5, se observa que las máximas tasas de reducción fágica se alcanzaron en el ensayo fotocatalítico, mientras que las menores se alcanzaron con los ensayos del Control iii. Esto coincide con lo esperado y está en consonancia con lo observado a partir de los valores de las constantes previamente analizados. Si a su vez analizamos cuál fue el soporte que logró la mayor tasa de reducción fágica en el ensayo fotocatalítico, se observa que fue el soporte filtro, alcanzando un valor de  $0,0912 \pm 0,0082$  órdenes log/min.

Por otro lado, el parámetro  $t_{99}$  está relacionado con la velocidad o tasa de inactivación fágica, por lo que nos brinda información semejante a la obtenida a partir de las constantes de inactivación que surgen del ajuste de la Ecuación (2.3'). El soporte filtro fue el que requirió el menor tiempo (52,86 min) para inactivar el 99 % de las partículas fágicas, seguido del soporte vidrio borosilicato (61,80 min) y finalmente del vidrio común esmerilado (63,11 min).

#### 4.3.4. Cálculo de eficiencias

Con el objetivo de evaluar los distintos soportes de acuerdo a la eficiencia del proceso de inactivación, se calcularon las eficiencias fotónica, cuántica y energética para cada soporte. Como ya se mencionó, la eficiencia cuántica ( $\eta_{qu}$ ) se define como la relación entre la velocidad de inactivación aparente ( $-dUFP/dt|_{\Delta t}$ ) y la velocidad de absorción de radiación del  $TiO_2$  ( $A_T \times \int_{\lambda} (\langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{sup} + \langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{inf}) d\lambda$ ), Ecuación 4.2), mientras que la eficiencia fotónica ( $\eta_{ph}$ ) se define como la relación entre la velocidad de inactivación aparente ( $-dUFP/dt|_{\Delta t}$ ) y el flujo de radiación incidente en el reactor ( $A_T \times (\langle q_{net} \rangle_{sup} + \langle q_{net} \rangle_{inf})$ ), Ecuación 4.1). Los valores obtenidos para ambas eficiencias se expresaron en unidades de UFP/Einstein, al igual que en el Capítulo 2. Además, la eficiencia energética ( $\eta_{ene}$ ) se define como la relación entre la velocidad de inactivación aparente ( $-dUFP/dt|_{\Delta t}$ ) y la potencia de las lámparas (Ecuación 4.3). En este caso, las eficiencias se expresaron en unidades de UFP/J, ya que es posible que

parte de la potencia de la lámpara no se traduzca en radiación, sino que puede perderse de otras formas, por ejemplo como calor por efecto Joule.

En la Tabla 4.6 se presentan los valores obtenidos de los parámetros necesarios para calcular las eficiencias. Los valores de  $k_T$  se expresaron en unidades de 1/s para unificar unidades, pero se mantienen las conclusiones obtenidas con estos valores en la Sección 4.3.3.4, esto es que no hay diferencias significativas entre los valores de  $k_T$  obtenidos con los distintos soportes, con un 95 % de nivel de confianza. Como consecuencia, al calcular las velocidades de inactivación aparente medias en un lapso de tiempo de 50 min para los distintos soportes se observó que los valores fueron muy similares (143,54; 143,58 y 143,64 UFP/s).

**Tabla 4.6.** Parámetros obtenidos y utilizados para calcular las eficiencias fotocatalíticas al emplear los distintos soportes para el catalizador y radiación UV-A (lámparas fluorescentes).

|                                                                                                                                          | Vidrio<br>borosilicato | Vidrio común<br>esmerilado | Filtro                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|
| $k_T$ [1/s]                                                                                                                              | $0,00258 \pm 0,00062$  | $0,00242 \pm 0,00033$      | $0,00331 \pm 0,00062$ |
| $-dUFP/dt _{\Delta t}$ [UFP/s]                                                                                                           | 143,58                 | 143,54                     | 143,64                |
| $(A_T \times (\langle q_{net} \rangle_{sup} + \langle q_{net} \rangle_{inf}))$<br>[Einstein/s]                                           | $1,84 \times 10^{-5}$  | $1,15 \times 10^{-5}$      | $2,22 \times 10^{-6}$ |
| $A_T \times \int_{\lambda} (\langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{sup} + \langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{inf}) d\lambda$<br>[Einstein/s] | $5,02 \times 10^{-6}$  | $3,80 \times 10^{-6}$      | $9,60 \times 10^{-7}$ |
| <b>Potencia lámparas [W]</b>                                                                                                             | 80                     | 80                         | 80                    |
| $\eta_{ph}$ [UFP/Einstein]                                                                                                               | $7,82 \times 10^6$     | $1,25 \times 10^7$         | $6,47 \times 10^7$    |
| $\eta_{qu}$ [UFP/Einstein]                                                                                                               | $2,86 \times 10^7$     | $3,78 \times 10^7$         | $1,50 \times 10^8$    |
| $\eta_{ene}$ [UFP/J]                                                                                                                     | 1,79                   | 1,79                       | 1,80                  |

El flujo de radiación incidente por el área irradiada para el soporte vidrio borosilicato fue de  $1,84 \times 10^{-5}$  Einstein/s y para el vidrio común esmerilado resultó de  $1,15 \times 10^{-5}$  Einstein/s. Si bien ambos comparten la misma configuración del reactor, de seis placas de  $12 \times 12$  cm, la diferencia en estos valores se encuentra en que el vidrio borosilicato es transparente a la radiación UV-A, por lo que, al flujo de radiación incidente proveniente de un grupo de lámparas, se le suma el flujo transmitido por el vidrio borosilicato y por la otra capa de  $TiO_2$ , proveniente del otro grupo de lámparas. Por otro lado, el soporte filtro constó solamente de una placa de  $12 \text{ cm} \times 13,86 \text{ cm}$  con lo cual el área total irradiada fue menor y, por este motivo, el término  $(A_T \times (\langle q_{net} \rangle_{sup} + \langle q_{net} \rangle_{inf}))$  resultó menor e igual a  $2,22 \times 10^{-6}$  Einstein/s.

La velocidad de absorción de radiación del  $\text{TiO}_2$  está relacionada a la fracción de radiación absorbida por el catalizador ( $\alpha_f$ ), que es un valor que se obtiene a partir de las propiedades ópticas de la película de catalizador y los soportes del mismo, de acuerdo a lo explicado en la Sección 4.2.4.2. En esta oportunidad, con el soporte vidrio borosilicato se observó la mayor velocidad de absorción de radiación ( $5,02 \times 10^{-6}$  Einstein/s), seguida muy próximamente por el vidrio común esmerilado ( $3,80 \times 10^{-6}$  Einstein/s) y finalmente por el soporte filtro ( $9,60 \times 10^{-7}$  Einstein/s). Esta proximidad entre los valores para los soportes vidrio borosilicato y vidrio común esmerilado puede explicarse por la semejanza entre los valores de  $\alpha_f$  para estos soportes, como puede observarse en la Figura 4.6.

La potencia total de las lámparas se obtuvo simplemente multiplicando la potencia de cada lámpara fluorescente (4 W) por el número de lámparas que forman el sistema de emisión (20 lámparas), resultando en una potencia total de 80 W. Como se utilizó el mismo sistema de emisión de radiación con los distintos soportes (lámparas fluorescentes), el valor de potencia total del sistema fue el mismo para los tres soportes.

Con los datos discutidos previamente y expresados en la Tabla 4.6 se calcularon las eficiencias fotónica, cuántica y energética para los tres soportes, que se muestran a su vez en la Tabla 4.6. Se puede observar que el soporte filtro presenta la eficiencia fotónica más alta, siendo 5,18 veces más alta que la correspondiente al soporte vidrio común esmerilado ( $1,25 \times 10^7$  UFP/Einstein) y 8,27 veces más alta que la correspondiente al vidrio borosilicato ( $7,82 \times 10^6$  UFP/Einstein). Con respecto a la eficiencia cuántica, nuevamente el filtro presentó el mayor valor ( $1,50 \times 10^8$  UFP/Einstein), resultando 4 veces más grande que la obtenida para el vidrio común esmerilado y 5,24 veces más grande que la correspondiente al vidrio borosilicato, mientras que el soporte vidrio común esmerilado presentó un valor 1,3 veces mayor que el vidrio borosilicato ( $3,78 \times 10^7$  y  $2,86 \times 10^7$  UFP/Einstein, respectivamente). Finalmente, los soportes presentaron prácticamente las mismas eficiencias energéticas ( $1,79 - 1,80$  UFP/J), ya que los valores de las velocidades de inactivación aparentes fueron muy similares para los tres soportes y se utilizaron las mismas lámparas para estos ensayos, por lo que la potencia total del sistema de emisión de radiación fue la misma.

A partir de estos datos se puede concluir que con el soporte filtro se obtuvo el proceso de inactivación más eficiente ya que las eficiencias fotónica y cuántica fueron mayores para esta condición ( $6,47 \times 10^7$  y  $1,50 \times 10^8$  UFP/Einstein, respectivamente). Más aún, es importante destacar la similitud de algunos parámetros entre los soportes vidrio borosilicato y vidrio común esmerilado. La mayor diferencia se observa para el flujo de radiación incidente (y consecuentemente para la eficiencia fotónica). Este

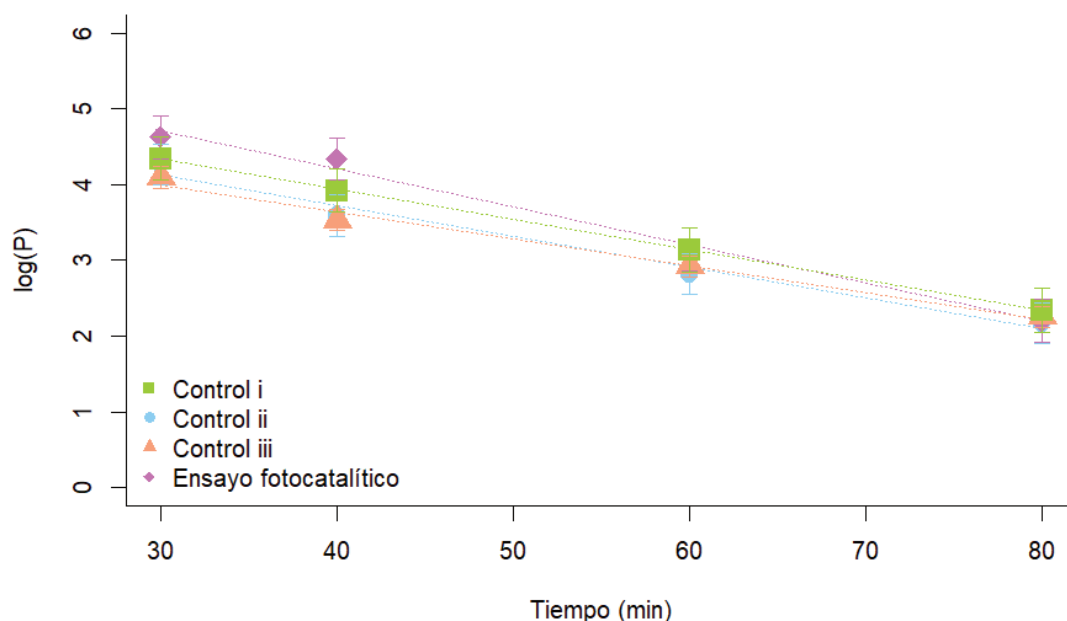
parámetro fue mayor para el vidrio borosilicato ( $1,84 \times 10^{-5}$  Einstein/s) ya que, como se explicó, este soporte es transparente a la radiación UV-A, es decir que parte de la radiación emitida por las lámparas del compartimento superior también llega a la cara opuesta (inferior) de la placa de vidrio recubierta, luego de atravesar las tres capas (dos películas de catalizador y el soporte vidrio borosilicato) y viceversa. De esta manera, la radiación disponible para que se produzca el proceso fotocatalítico en cada cara de la placa es mayor que con un soporte no transparente a la radiación UV-A como en el caso del vidrio común ( $A_T \times (\langle q_{net} \rangle_{sup} + \langle q_{net} \rangle_{inf}) = 1,15 \times 10^{-5}$  Einstein/s) y por eso el flujo de radiación incidente resultó mayor (Tabla 4.6). Sin embargo, a partir de las eficiencias calculadas no se observó una diferencia muy marcada a favor del vidrio borosilicato, debido a que el vidrio común esmerilado sería más eficiente, ya que, aún absorbiendo menos radiación, produjo una inactivación semejante a la del vidrio borosilicato.

#### 4.3.5. Ensayos de inactivación con luces LEDs

##### 4.3.5.1. Constantes de inactivación para filtro irradiado por LEDs

Para analizar la inactivación fágica bajo este nuevo sistema de radiación, primero fue necesario elegir el soporte con el cual trabajar entre los tres estudiados en las secciones anteriores. El soporte seleccionado para llevar adelante estas experiencias fue el soporte filtro, debido a que fue el que presentó las mayores eficiencias fotocatalíticas, tanto fotónica ( $6,47 \times 10^7$  UFP/Einstein) como cuántica ( $1,50 \times 10^8$  UFP/Einstein). Además, este soporte es mucho más económico y factible de utilizar en un equipo que los soportes de vidrio, lo que representa otra ventaja al momento de realizar un escalado del reactor. Por otro lado, si bien el análisis estadístico arrojó que no existen diferencias significativas entre los valores de  $k_T$  de los distintos soportes, esto puede deberse a la gran variabilidad de los resultados obtenidos (coeficientes de variación entre 13 y 24 %). Por lo tanto, a pesar de los resultados obtenidos con el análisis estadístico, se observa que el valor de la constante  $k_T$  para el soporte filtro resultó ser numéricamente más alto (Tabla 4.4).

Al igual que con los distintos soportes analizados para las lámparas fluorescentes, los valores  $\log(P)$  obtenidos para las distintas corridas del soporte filtro con las lámparas LEDs se graficaron vs el tiempo (min) (Figura 4.13), se ajustaron con la Ecuación (2.3') y se obtuvieron las constantes descriptas previamente en la Sección 4.2.4.1. Los parámetros de la regresión ( $k$ ,  $\log(P_0)$ ,  $R^2$ ) se muestran en la Tabla 4.7.



**Figura 4.13.** Inactivación fágica en función del tiempo y regresiones lineales,  $\log(P)$  vs. tiempo, para los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, empleando el filtro como soporte del catalizador y el sistema de radiación UV-A LEDs.

**Tabla 4.7.** Parámetros de las regresiones obtenidas para los ensayos con filtro como soporte y sistema de iluminación LED.

|                              | $k$<br>[1/min]      | $\log(P_0)$<br>[log(UFP/ml)] | $R^2$ |
|------------------------------|---------------------|------------------------------|-------|
| <b>Control i</b>             | $0,100 \pm 0,013$   | $5,66 \pm 0,30$              | 0,97  |
| <b>Control ii</b>            | $0,098 \pm 0,014$   | $5,89 \pm 0,45$              | 0,96  |
| <b>Control iii</b>           | $0,090 \pm 0,015$   | $5,89 \pm 0,77$              | 0,98  |
| <b>Ensayo fotocatalítico</b> | $0,1143 \pm 0,0015$ | $6,12 \pm 0,12$              | 0,97  |

En la Figura 4.13 y en la Tabla 4.7, se observa que las curvas de inactivación del Control i, Control ii y Control iii presentaron pendientes similares, mientras que la curva del ensayo fotocatalítico mostró una pendiente levemente mayor. Sin embargo, al compararlas con las gráficas del mismo soporte para el sistema de emisión de radiación con lámparas fluorescentes (Figura 4.11), se observa que la diferencia entre la pendiente del ensayo fotocatalítico comparada con las pendientes del resto de los ensayos bajo el sistema de radiación LED UV-A no es tan marcada como la diferencia entre el ensayo fotocatalítico y el resto cuando se irradia con las lámparas fluorescentes.

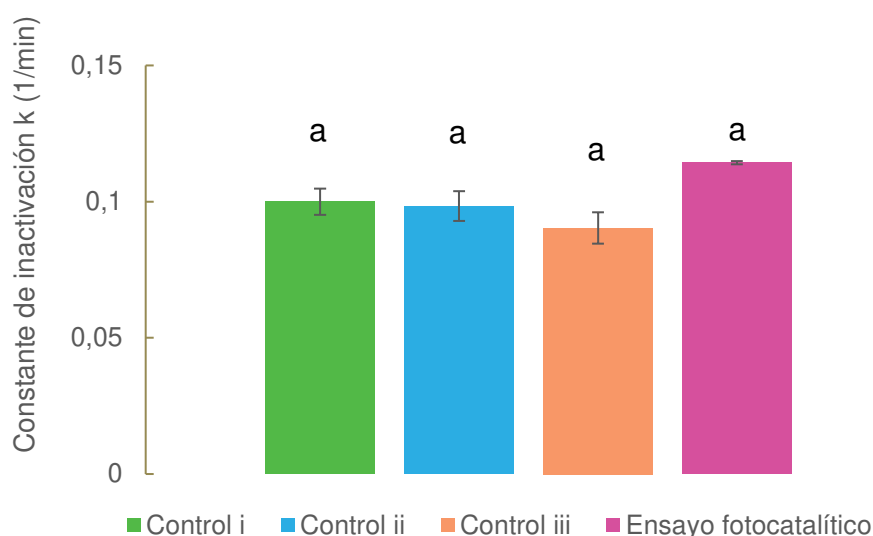
Al igual que con las lámparas fluorescentes, a partir de los valores tabulados en la Tabla 4.7 y las Ecuaciones (4.1, 4.2, 2.4 y 2.5), fue posible obtener los valores de las constantes  $k_{light}$  (0,010 1/min),  $k_{coating}$  (0,008 1/min),  $k_{nph}$  (0,108 1/min) y  $k_{ph}$  (0,006 1/min).

Al realizar el análisis estadístico ANOVA se observó que no hubo diferencias significativas entre las constantes de las distintas corridas con las lámparas LEDs, con

un 95 % de nivel de confianza ( $p\text{-valor} = 0,1911$ ). Esto nos indica que no se observó una mejora en la inactivación fágica al irradiarse el catalizador con las lámparas LED, en relación a los ensayos control (Figura 4.14).

Finalmente, las tasas de reducción fágica obtenidas para los distintos ensayos con el soporte filtro y el sistema de radiación LED fueron  $0,0399 \pm 0,0011$  órdenes log/min para el Control i,  $0,0454 \pm 0,0057$  órdenes log/min para el Control ii,  $0,03705 \pm 0,00031$  órdenes log/min para el Control iii y  $0,0457 \pm 0,0025$  órdenes log/min para el ensayo fotocatalítico.

El valor del parámetro  $t_{99}$  obtenido a partir de los ensayos fotocatalíticos con el soporte filtro fue de 69,84 min.



**Figura 4.14.** Constantes de inactivación ( $k_T$ ,  $k_{control\ i}$ ,  $k_{control\ ii}$ ,  $k_{reactor}$ ) obtenidas en los ensayos Fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii, empleando el soporte filtro bajo el sistema de radiación LED UV-A. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.5.2. Comparación entre las distintas fuentes de radiación

En la Tabla 4.8 se presenta un resumen de los valores de las constantes cinéticas obtenidas para el soporte filtro bajo las distintas fuentes de radiación en cada ensayo y se muestra el análisis estadístico realizado al comparar similares efectos entre ambas fuentes de radiación.

Al comparar las constantes obtenidas a partir del ensayo fotocatalítico ( $k_T$ ) para el soporte filtro con las distintas fuentes de radiación ensayadas, se observó que existen diferencias significativas entre ambas medias con un 95 % de nivel de confianza, habiendo obtenido un valor mayor en presencia de lámparas fluorescentes, esto es  $0,199 \pm 0,037$  1/min frente al valor de  $0,1143 \pm 0,0015$  1/min para las lámparas LED ( $p$ -

$valor = 0,0121$ ). Por lo tanto, se puede concluir que empleando el mismo filtro recubierto con  $TiO_2$ , se obtendría una mayor tasa de inactivación fágica al emplear la radiación de las lámparas fluorescentes que la de las lámparas LEDs.

**Tabla 4.8.** Valores de las constantes cinéticas obtenidas para el soporte filtro en cada ensayo, con los distintos sistemas de radiación. Letras distintas en la fila de  $k_T$  y  $k_{control\ i}$  indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

|                           | Lámparas fluorescentes | Lámparas LEDs         |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| $k_{control\ i}$ [1/min]  | $0,129 \pm 0,025^a$    | $0,100 \pm 0,013^a$   |
| $k_{control\ ii}$ [1/min] | $0,098 \pm 0,014$      | $0,098 \pm 0,014$     |
| $k_{reactor}$ [1/min]     | $0,090 \pm 0,015$      | $0,090 \pm 0,015$     |
| $k_{light}$ [1/min]       | 0,038                  | 0,010                 |
| $k_{coating}$ [1/min]     | 0,008                  | 0,008                 |
| $k_{nph}$ [1/min]         | 0,137                  | 0,108                 |
| $k_T$ [1/min]             | $0,199 \pm 0,037^b$    | $0,1143 \pm 0,0015^a$ |
| $k_{ph}$ [1/min]          | 0,062                  | 0,006                 |

Por otro lado, entre los valores de  $k_{control\ i}$  obtenidos para las distintas fuentes de radiación, no existen diferencias significativas, con un 95 % de nivel de confianza. Como se explicó anteriormente, en esta constante se encuentran involucrados el efecto de reducción de la concentración fágica en el aire por deposición de los fagos en distintas superficies del reactor (representado por  $k_{reactor}$ ) y el efecto de la inactivación fágica debido exclusivamente a la radiación (efecto fotoquímico, representado por  $k_{light}$ ). Por lo tanto, este análisis estadístico indica que la fuente utilizada para emitir la radiación UV-A no afectaría a la inactivación fotoquímica de los fagos, ya que no existen diferencias significativas entre los valores de las constantes obtenidas al ajustar los datos experimentales (Tabla 4.8).

Los Controles ii y iii son válidos tanto para el ensayo con lámparas fluorescentes como para las LEDs ya que el cambio en la fuente de radiación no tiene ningún impacto en los ensayos de oscuridad. Por lo tanto, los valores de las constantes  $k_{reactor}$  y  $k_{control\ ii}$  resultaron iguales para ambas fuentes de radiación.

Al comparar las tasas de reducción fágica obtenidas con las distintas fuentes de radiación, se observa que con la fuente de radiación fluorescente estos valores fueron mayores ( $0,0912 \pm 0,0082$  órdenes log/min) que los correspondientes a los obtenidos con la fuente de radiación LED ( $0,0457 \pm 0,0025$  órdenes log/min). Por otro lado, el parámetro  $t_{99}$  está relacionado con la velocidad o tasa de inactivación fágica, y en esta oportunidad indica que el sistema de radiación fluorescente alcanzaría el 99 % de inactivación fágica más rápidamente (52,86 min) que el sistema de radiación LED (69,84 min). Esto coincide con lo esperado y está en consonancia con lo observado a partir de los valores de las constantes  $k_T$  previamente analizados.

#### 4.3.5.3. Cálculo de eficiencias

Con el objetivo de evaluar las distintas fuentes de radiación UV-A de acuerdo a la eficiencia del proceso de inactivación, se calcularon las eficiencias fotónica, cuántica y energética para cada sistema de iluminación.

En la Tabla 4.9 se presentan los valores obtenidos de los parámetros necesarios para calcular las eficiencias. Los valores de  $k_T$  se expresaron en unidades de 1/s para unificar unidades, pero se mantienen las conclusiones obtenidas con estos valores en la Sección 4.3.5.2, esto es que el mayor valor de  $k_T$  se obtuvo con las lámparas fluorescentes, presentando diferencias significativas respecto al sistema de emisión con lámparas LEDs, con un 95 % de nivel de confianza. Sin embargo, las velocidades de inactivación aparente para ambos sistemas de emisión de radiación se encontraron en el mismo orden de magnitud (143,17 y 143,64 UFP/s).

Si bien en este caso la configuración del reactor es la misma, el flujo de radiación medido para las lámparas LEDs fue de  $6,3 \times 10^{-4} \pm 2,6 \times 10^{-8} \text{ W/cm}^2$  (sumando la radiación proveniente de las lámparas LEDs inferiores y de las superiores), casi un orden menor que el obtenido para las lámparas fluorescentes ( $8,66 \times 10^{-3} \pm 1,84 \times 10^{-7} \text{ W/cm}^2$ , considerando la radiación proveniente de las lámparas fluorescentes inferiores y superiores).

Por este motivo, el flujo de radiación incidente en el reactor fotocatalítico al emplear el sistema de radiación LED fue menor ( $1,33 \times 10^{-7} \text{ Einstein/s}$ ) que el correspondiente al emplear las lámparas fluorescentes ( $2,22 \times 10^{-6} \text{ Einstein/s}$ ). Además, la distribución espectral de las lámparas LEDs fue distinta a la presentada por las lámparas fluorescentes (Figura 4.5).

Por estos mismos motivos es posible justificar el mayor valor ( $9,60 \times 10^{-7} \text{ Einstein/s}$ ) en la velocidad de absorción de radiación del  $\text{TiO}_2$  obtenido con las lámparas fluorescentes en relación al de las lámparas LEDs ( $4,84 \times 10^{-8} \text{ Einstein/s}$ ), ya que tanto el flujo de radiación como la distribución espectral de las lámparas son valores empleados para calcular este parámetro.

Al igual que lo explicado en la Sección 4.3.4, la potencia total de las lámparas fluorescentes se obtuvo simplemente multiplicando la potencia de cada lámpara (4 W) por el número de lámparas que forman el sistema de emisión (20 lámparas), resultando en una potencia total de 80 W. Para el sistema de emisión de radiación LED, en cambio, se consideraron los valores de tensión e intensidad mostrados por las fuentes electrónicas con las que se regularon estas lámparas. La potencia total del sistema de radiación LED se obtuvo sumando el producto de la tensión y la intensidad de las

lámparas inferiores más el producto de la tensión y la intensidad de las lámparas superiores resultando en un valor de 33,15 W.

Con los datos discutidos previamente y expresados en la Tabla 4.9 se calcularon las eficiencias fotónica, cuántica y energética para ambos sistemas de radiación. Se observa que, a raíz del menor flujo de radiación incidente en el reactor para el sistema de radiación LED, éste presenta una eficiencia fotónica 17 veces mayor que la correspondiente a las lámparas fluorescentes. Con respecto a la eficiencia cuántica, nuevamente las lámparas LEDs presentan el mayor valor (20,65 veces mayor que la eficiencia cuántica correspondiente a las lámparas fluorescentes), debido a la menor velocidad de absorción de radiación presentada con el sistema de radiación LED. Finalmente, como la potencia necesaria para la emisión de radiación UV-A LED es menor que para las lámparas fluorescentes, la eficiencia energética correspondiente a las lámparas LEDs resultó 2,4 veces mayor que la obtenida para las lámparas fluorescentes.

**Tabla 4.9.** Parámetros obtenidos y utilizados para calcular las eficiencias fotocatalíticas al emplear las distintas fuentes de radiación UV-A para el soporte filtro.

|                                                                                                                                          | Fluorescentes         | UV-A LEDs               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| $k_T$ [1/s]                                                                                                                              | $0,00332 \pm 0,00062$ | $0,001905 \pm 0,000025$ |
| $-dUFP/dt _{\Delta t}$ [UFP/s]                                                                                                           | 143,64                | 143,17                  |
| $(A_T \times (\langle q_{net} \rangle_{sup} + \langle q_{net} \rangle_{inf}))$<br>[Einstein/s]                                           | $2,22 \times 10^{-6}$ | $1,33 \times 10^{-7}$   |
| $A_T \times \int_{\lambda} (\langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{sup} + \langle e_{\lambda}^{a,s} \rangle_{inf}) d\lambda$<br>[Einstein/s] | $9,60 \times 10^{-7}$ | $4,84 \times 10^{-8}$   |
| <b>Potencia lámparas</b> [W]                                                                                                             | 80                    | 33,15                   |
| $\eta_{ph}$ [UFP/Einstein]                                                                                                               | $6,47 \times 10^7$    | $1,08 \times 10^9$      |
| $\eta_{qu}$ [UFP/Einstein]                                                                                                               | $1,50 \times 10^8$    | $2,96 \times 10^9$      |
| $\eta_{ene}$ [UFP/J]                                                                                                                     | 1,80                  | 4,32                    |

A partir de estos datos se concluye que, a pesar de contar con un valor de  $k_T$  menor, al analizar las eficiencias fotónica, cuántica y energética se observa que las lámparas LEDs son más eficientes en la inactivación fágica que las lámparas fluorescentes, desde el punto de vista de consumo energético, así como de la utilización de la radiación absorbida para llevar a cabo la inactivación.

#### **4.4. Discusión**

Se estudió la inactivación del fago ATCC 8014-B1, infectivo de *Lp. plantarum*, en un sistema fotocatalítico escala semi-piloto. Este equipo consiste en una cámara de acero inoxidable donde se nebuliza la suspensión fágica, que está conectada en un circuito cerrado, con el reactor fotocatalítico. Este reactor fue iluminado por encima y por debajo con lámparas UV-A ( $\lambda = 340 - 400 \text{ nm}$ ) y en su interior posee ranuras para ubicar hasta seis placas (sobre las cuales se depositó el catalizador) con un ángulo de inclinación de  $120^\circ$ . Se emplearon dos fuentes de radiación (lámparas fluorescentes y lámparas LEDs) y se ensayaron tres soportes distintos para la deposición del catalizador (vidrio borosilicato, vidrio común esmerilado y filtro). Las experiencias se realizaron por un tiempo total de 80 min, tomando muestras a tiempos predeterminados. A partir de los resultados obtenidos, se calcularon las constantes de inactivación y las eficiencias fotocatalíticas de inactivación fotónicas, cuánticas y energéticas, tanto en los ensayos fotocatalíticos como en los controles, para distintas combinaciones de soportes y fuentes de radiación.

##### **4.4.1. Deposición de catalizador**

Para realizar estos ensayos, en primer lugar, se debió depositar el  $\text{TiO}_2$  en los distintos soportes a ensayar. Para ello, fue necesario determinar la cantidad de capas de catalizador con la que se iban a recubrir los soportes. Zacarías et al. (2012) determinaron, al trabajar en la inactivación fotocatalítica de esporas de *B. subtilis*, que los mejores resultados se obtuvieron trabajando con dos capas de  $\text{TiO}_2$ , al compararlo con uno y tres recubrimientos del mismo catalizador sobre vidrio borosilicato. La justificación de la mejora de una a dos capas está relacionada con la mayor cantidad de  $\text{TiO}_2$  depositado, lo que producirá una mayor cantidad de radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ) y, como consecuencia, un aumento en el número de microorganismos inactivados. Sin embargo, si bien la cantidad de catalizador en las placas recubiertas con tres capas fue mayor que en las recubiertas con dos capas, no se observó una mejora en la inactivación, de hecho, fue similar a la obtenida con una capa de catalizador. Esto puede explicarse por dos motivos: en primer lugar, la superficie del recubrimiento con tres capas resultó ser más rugosa que con dos. Como consecuencia, las esporas de las bacterias se depositaron, posiblemente, en estas irregularidades del recubrimiento, donde la luz no llega a incidir, no lográndose la inactivación de las mismas. Como la fotocatálisis es un fenómeno superficial, la producción de estos “valles” debidos a la rugosidad de la acumulación del catalizador resulta contraproducente, ya que los microorganismos pueden depositarse en dichos espacios, pero no llega suficiente radiación para activar el fotocatalizador allí depositado, con lo cual se aumenta la

cantidad de catalizador pero no la superficie activa, desacelerándose la inactivación. Además, una producción excesiva de radicales hidroxilos puede conducir a la formación de radicales hidroperoxilos ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), los cuales son menos eficientes para la inactivación de bacterias. Finalmente, un aumento en la tasa de recombinación de electrones y huecos producidos por el exceso de partículas catalíticas podría contribuir a la disminución de la tasa de inactivación. Por este motivo, en la presente tesis se decidió utilizar dos capas de catalizador sobre todos los soportes. Sin embargo, al realizar la primera deposición sobre el filtro, la cantidad de catalizador depositada fue mayor que para dos capas sobre los otros soportes. Por lo tanto, a fin de evitar los inconvenientes previamente mencionados, se decidió realizar un único recubrimiento para el filtro.

El soporte sobre el cual se depositó la menor cantidad de catalizador fue el vidrio borosilicato, seguido del vidrio común esmerilado y finalmente del filtro. Estos resultados eran esperables, ya que el filtro es un material poroso y el catalizador se depositó en los intersticios del material, con lo cual la cantidad depositada de catalizador fue mayor. Por otro lado, probablemente sobre el vidrio común esmerilado se depositó una cantidad mayor de  $\text{TiO}_2$  ya que éste, al estar esmerilado, posee una superficie más rugosa que el vidrio borosilicato.

Con respecto a las propiedades ópticas de las películas del catalizador, la fracción de radiación absorbida ( $\alpha_f$ ) por el  $\text{TiO}_2$  presentó valores similares al ser depositada sobre los tres soportes.

#### 4.4.2. Soporte para el catalizador

El equipo escala semi-piloto empleado en este capítulo fue utilizado también en trabajos previos de nuestro grupo, obteniendo buenos resultados para la inactivación fágica (Briggiler Marcó et al., 2018, 2021). En estos trabajos, el soporte utilizado para el catalizador fue vidrio borosilicato, el cual es transparente a la radiación UV-A y favorece la eficiencia del sistema, ya que los rayos transmitidos a la capa de catalizador depositada sobre el lado opuesto del soporte son también aprovechados. Como desventaja, el vidrio borosilicato es un material costoso, y no sería conveniente para realizar un escalado a un reactor de mayor tamaño. Con el objetivo de optimizar el reactor para un posible escalado, en la presente tesis se estudiaron dos soportes más además del vidrio borosilicato: vidrio común esmerilado y filtro, para compararlos y concluir si sería posible un reemplazo del vidrio borosilicato como soporte para el catalizador.

El filtro fue propuesto como soporte para aprovechar la porosidad de este material y su capacidad filtrante. Se decidió colocar un único filtro en el reactor, abarcando toda la superficie transversal del mismo, de modo de forzar a la suspensión

fágica a atravesar el filtro, estando en contacto con el catalizador irradiado y pudiendo quedar los fagos retenidos en el filtro. Además, si se hubiesen colocado seis filtros que cubran toda la superficie transversal del reactor, la caída de presión en el interior del reactor hubiese sido muy grande al forzar a los fagos a pasar a través del filtro, por lo que no hubiese sido factible trabajar de esta manera.

En primer lugar, los resultados obtenidos indican que efectivamente el proceso fotocatalítico influyó positivamente en la inactivación fágica, independientemente del soporte empleado. Además, al comparar los valores de  $k_T$  obtenidos con los distintos soportes, se observó que el soporte filtro presentó un valor numéricamente mayor ( $0,199 \pm 0,037$  1/min) que los soportes vidrio borosilicato y vidrio común esmerilado ( $0,156 \pm 0,037$  y  $0,145 \pm 0,020$  1/min, respectivamente), aunque los tres valores no presentaron diferencias significativas. Como se explicó anteriormente, el filtro fue el soporte en el cual se depositó la mayor cantidad de  $\text{TiO}_2$ . Si bien en un principio se consideró que la diferencia en la cantidad de catalizador depositada se debía al  $\text{TiO}_2$  presente en los intersticios, es probable que efectivamente una parte de esta cantidad extra de catalizador que aporta mayor área superficial participe en la reacción fotocatalítica, y contribuya a una mayor inactivación. Esto está en línea con varios estudios (Flores et al., 2024; Habibi-Yangjeh et al., 2020; D. Tian et al., 2022), donde concluyeron que un aumento en la concentración de catalizador mejora el proceso de desinfección. Sin embargo, Zacarías et al. (2012) también indicaron que hay un umbral máximo de concentración de catalizador, a partir del cual ya no se mejora el proceso de inactivación, como se discutió previamente para el número de capas de catalizador.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los valores de  $k_{\text{reactor}}$  para los tres soportes evaluados. Como se mencionó previamente, se propuso el soporte filtro ya que éste podría cumplir dos funciones, tanto la de soportar el  $\text{TiO}_2$  como la de actuar propiamente como filtro, reteniendo una fracción de las partículas fágicas que lo atravesaran, debido a que los filtros están formados por una red compleja y porosa, de estructura fibrosa, que obligaría a las partículas del bioaerosol a cambiar constantemente de dirección al atravesarlos, perdiendo velocidad hasta quedar atrapados (Flores et al., 2024). Este comportamiento no fue observado, ya que si este soporte hubiese actuado propiamente como filtro, se hubiese esperado que el valor de  $k_{\text{reactor}}$  fuese mayor para este soporte que para el resto. De esta manera, podría plantearse que el filtro no mejora la retención de partículas fágicas obtenidas con los soportes de vidrio, probablemente debido a que la cantidad de placas de vidrio recubiertas donde los fagos podrían depositarse eran seis y solamente se utilizó un filtro. O bien que la mayor parte de pérdida de partículas fágicas en el aire obtenida durante el Control iii se produce por deposición en las superficies del equipo experimental, como

la cámara de acero inoxidable, las paredes del reactor o el tubo de polipropileno, no siendo tan relevante la deposición sobre los distintos soportes. Chuaybamroong et al. (2010) analizaron la eficiencia de un filtro HEPA recubierto con  $\text{TiO}_2$  para la remoción de microorganismos (*A. niger*, *P. citrinum*, *S. epidermis* y *B. subtilis*) en una cámara con circuito cerrado, similar al reactor empleado en el presente capítulo. Los autores reportaron que al hacer incidir radiación UV-A sobre el filtro recubierto se lograron porcentajes de inactivación entre 60 y 80 % cuando se produjeron las reacciones de oxidación fotocatalítica. En el caso de los microorganismos *A. niger*, *P. citrinum* y *B. subtilis* no se observaron grandes diferencias entre los porcentajes de destrucción de los microorganismos entre los distintos ensayos realizados por los autores a 75 % HR (equivalentes a los ensayos fotocatalítico, Control i, Control ii y Control iii del presente capítulo). Los autores no realizaron ensayos con otros soportes o en ausencia del filtro, por lo que no es posible estimar si existen otros factores que favorezcan la reducción de los microorganismos en el aire, como por ejemplo la deposición de los mismos en las paredes de la cámara o cañerías, o si realmente este porcentaje de inactivación se produce exclusivamente por la presencia del filtro. Inicialmente también se esperaba que la mayor rugosidad del soporte vidrio común esmerilado provocara una mayor retención de los fagos sobre su superficie, además de proveer una mayor superficie de contacto para soportar el  $\text{TiO}_2$ . Pero, al igual que con el filtro, este fenómeno no se evidenció ya que no se observaron diferencias significativas en los valores de  $k_{\text{reactor}}$  para los tres soportes, como se mencionó previamente.

Por otro lado, la constante  $k_{\text{control ii}}$ , que involucra el efecto de reducción de la concentración fágica en el aire por deposición de los fagos en distintas superficies del reactor (representado por  $k_{\text{reactor}}$ ) y por deposición sobre los soportes recubiertos con el catalizador (representado por  $k_{\text{coating}}$ ), no presentó diferencias estadísticas entre los tres soportes ( $p < 0,05$ ). Esto indica que los fagos se adsorberían de manera similar sobre el catalizador, independiente del soporte utilizado.

Por otra parte, en la constante  $k_{\text{control i}}$  están involucrados el efecto de reducción de la concentración fágica en el aire por deposición de los fagos en distintas superficies del reactor (representado por  $k_{\text{reactor}}$ ) y el efecto de la inactivación fágica debido exclusivamente a la radiación (efecto fotoquímico, representado por  $k_{\text{light}}$ ). Por lo tanto, al no observar diferencias significativas entre los valores de estas constantes para los distintos soportes ( $p < 0,05$ ), se puede concluir que, independientemente del soporte utilizado para la construcción del reactor, la reducción en los títulos fágicos obtenida por la combinación de la inactivación fotoquímica y de la reducción por el propio funcionamiento del reactor no se vería afectada. Esto quiere decir que, si los soportes retienen en mayor o menor medida a los fagos o si los protegen o exponen en mayor o

menor medida a la radiación UV-A, no afectan significativamente los valores de las constantes obtenidas a partir del ajuste de los datos experimentales.

Otros parámetros confiables para comparar la inactivación fotocatalítica de los fagos al trabajar con los distintos soportes son las eficiencias fotónica, cuántica y energética. Se observó que la eficiencia fotónica tomó valores mayores para el soporte filtro ( $6,47 \times 10^7$  UFP/Einstein), mientras que los soportes vidrio borosilicato y vidrio común esmerilado presentaron valores de  $7,82 \times 10^6$  y  $1,25 \times 10^7$  UFP/Einstein, respectivamente. Esto está relacionado con el flujo de radiación incidente en el reactor, involucrado en el denominador de la fórmula para calcular la eficiencia fotónica (Ecuación 4.1). Como el flujo de radiación incidente por el área irradiada para el soporte filtro fue menor ( $2,22 \times 10^{-6}$  Einstein/s), debido a la menor área superficial, la eficiencia fotónica fue mayor para este soporte. Por otro lado, el flujo de radiación incidente es mayor para el vidrio borosilicato ya que éste es transparente a la radiación UV-A, y al flujo de radiación incidente se le suma el flujo de radiación transmitido desde el grupo de lámparas del lado opuesto. Sin embargo, esta radiación mayor que llega a las capas de catalizador no se traduce en una mayor inactivación fágica y la eficiencia fotónica calculada para el soporte vidrio borosilicato es la menor de las tres. Esto indica que, si se debe optar entre los soportes vidrio borosilicato y vidrio común esmerilado, sería recomendable elegir este último, ya que su rendimiento es similar, pero es más económico, lo que representa una ventaja al analizar los costos de construcción del reactor en cualquier escala de tamaño. En agosto del año 2025, el precio de la pieza de vidrio borosilicato utilizado en esta tesis ( $12 \times 12 \times 0,3$  cm) era de U\$S 79,86, mientras que la pieza de vidrio común del mismo tamaño costaba solamente U\$S 1,15. Estos precios demuestran que el soporte vidrio común es efectivamente mucho más económico que el vidrio borosilicato, el cual tiene un precio casi 70 veces mayor que el primero. Por otro lado, es posible obtener piezas de vidrio común de mayor tamaño, lo que facilitaría un posible escalado del reactor, ya que luego de esmerilarlas estarían disponibles para la construcción del reactor en el tamaño deseado.

Por otro lado, la eficiencia cuántica tomó el menor valor para el soporte vidrio borosilicato ( $2,86 \times 10^7$  UFP/Einstein), seguido del vidrio común esmerilado ( $3,78 \times 10^7$  UFP/Einstein) y el mayor valor correspondió al soporte filtro ( $1,50 \times 10^8$  UFP/Einstein). Esto está relacionado con la velocidad de absorción de radiación del  $\text{TiO}_2$ , que está involucrada en el denominador de la fórmula para calcular la eficiencia cuántica (Ecuación 4.2), que tomó el menor valor ( $9,60 \times 10^{-7}$  Einstein/s) para el soporte filtro y el mayor valor ( $5,02 \times 10^{-6}$  Einstein/s) para el vidrio borosilicato.

#### 4.4.3. Fuentes de radiación UV-A

El soporte seleccionado para llevar adelante estas experiencias fue el soporte filtro, debido a que fue el que presentó las mayores eficiencias fotocatalíticas, tanto fotónica como cuántica. Además, este soporte es mucho más económico que los soportes de vidrio (cuesta menos de 10 centavos de dólar la placa del tamaño del reactor), lo que representa otra ventaja para este soporte al momento de realizar un escalado del reactor. Por lo tanto, los resultados obtenidos con la fuente de radiación LED y soporte filtro fueron comparados con los resultados obtenidos con igual soporte y lámparas fluorescentes.

Al comparar los distintos ensayos realizados con el soporte filtro y lámparas LEDs, no se observó una mejora en la inactivación fágica al irradiarse el catalizador (Ensayo fotocatalítico), en relación a los ensayos Control i, Control ii y Control iii.

En cambio, al analizar las constantes  $k_T$  obtenidas con las distintas fuentes de radiación, se observaron diferencias significativas entre ambos valores, con un 95 % de nivel de confianza, siendo mayor el valor correspondiente a las lámparas fluorescentes ( $0,199 \pm 0,037$  1/min) frente al valor de  $0,1143 \pm 0,0015$  1/min para las lámparas LEDs. En consecuencia, empleando el mismo filtro recubierto con  $\text{TiO}_2$ , se obtendría una mayor tasa de inactivación fágica [1/min] al emplear lámparas fluorescentes en lugar de lámparas LEDs.

De la misma manera, se observó que la tasa de reducción fágica obtenida con las lámparas fluorescentes fue 1,6 veces mayor ( $0,0456$  órdenes log/min) que la correspondiente a la obtenida con el sistema de iluminación LED ( $0,0286$  órdenes log/min). Esto significa que la reducción en el título fágico se da a una tasa mayor con las lámparas fluorescentes, es decir que, para lograr una determinada reducción con ambos sistemas, dicha reducción se alcanzará en menor tiempo con las lámparas fluorescentes. Esta misma conclusión puede obtenerse a partir de analizar el valor de los  $t_{99}$ , ya que resultó menor para las lámparas fluorescentes (52,86 min) que para las lámparas LEDs (69,84 min).

Sholtes et al. (2016) compararon las dosis necesarias para lograr reducciones semejantes (4 órdenes log) del fago MS2, infectivo de *E. coli*, utilizando lámparas de mercurio de baja presión y lámparas LEDs, con una longitud de onda de 260 nm. Los autores no observaron diferencias significativas entre las cinéticas de inactivación del fago con las distintas fuentes de radiación. En realidad, realizar una comparación confiable bajo idénticas condiciones de tratamiento de las dos fuentes de radiación UV-C es prácticamente imposible, ya que las lámparas LEDs poseen picos de emisión más anchos que las lámparas de baja presión, lo cual puede afectar la eficacia germicida

(Koutchma et al., 2009). De acuerdo a la Figura 4.5, en cambio, ambos tipos de lámparas UV-A empleados en esta tesis tienen picos de emisión de anchos semejantes, lo cual no representaría un problema a 365 nm.

Al calcular las eficiencias fotónica, cuántica y energética para las distintas fuentes de radiación, se observó que la fuente de radiación LED presentó los valores mayores ( $1,08 \times 10^9$  UFP/Einstein para eficiencia fotónica,  $2,96 \times 10^9$  UFP/Einstein para eficiencia cuántica y 4,32 UFP/J para eficiencia energética). En los tres casos, esto se justifica debido al valor un orden menor del flujo de radiación incidente en el reactor para las lámparas LEDs. De igual manera para el caso de la eficiencia cuántica, la velocidad de absorción de radiación del  $\text{TiO}_2$  fue un orden menor ( $4,84 \times 10^{-8}$  Einstein/s) al correspondiente para las lámparas fluorescentes ( $9,60 \times 10^{-7}$  Einstein/s). Finalmente, como el sistema de radiación LED requiere una potencia menor (33,15 W) que el fluorescente (80 W), la eficiencia energética fue 2,4 veces mayor para el sistema de radiación LED que para el fluorescente.

A partir de estos datos se concluye que, a pesar de contar con un valor de  $k_T$  menor, al analizar las eficiencias fotónica, cuántica y energética se observó que las lámparas LEDs son más eficientes en la inactivación fágica que las lámparas fluorescentes, por lo que sería recomendable operar el reactor con un sistema de radiación formado por lámparas UV-A LEDs. Además, estas lámparas LEDs son una tecnología *eco-friendly*, que permiten obtener radiación UV de una manera libre de mercurio (Cho et al., 2017, Nair y Dhoble, 2015).

Estos resultados, junto a la mayor vida útil de las lámparas LEDs (30.000 h de duración para las lámparas LED frente a 18.000 h como máximo de las lámparas de baja presión (Koutchma et al., 2009)) y al menor costo considerando el uso a largo plazo (Kneissl et al., 2019), indican que el sistema de radiación UV-A LED sería efectivo para la inactivación fágica por fotocátalisis, generando una reducción considerable en los costos de operación del equipo.

#### 4.4.4. Bioaerosoles

A diferencia de los dos capítulos anteriores, en los cuales las suspensiones fágicas se encontraban depositadas y secas sobre un vidrio, en el presente capítulo los fagos se estudiaron formando parte de bioaerosoles, los cuales son la principal fuente de dispersión fágica en la industria láctea.

Además de los trabajos previos del grupo desarrollados en el reactor semipiloto (Briggiler Marcó et al., 2018, 2021), existen otros trabajos reportados en bibliografía donde se estudió la inactivación de diversos microorganismos en forma de bioaerosoles. Por ejemplo, L. Liu et al. (2022) ensayaron la inactivación fotocatalítica ( $\text{TiO}_2/\text{MXene}$ ,

UV-C) de *E. coli*, esporos de *A. versicolor*, *S. aureus* y del fago MS2. Estos autores reportaron valores del parámetro  $Z$  [1/dosis], equivalente a las constantes de inactivación  $k_T$  del presente capítulo, entre  $3,02 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\mu\text{J}$  (*A. versicolor*) y  $19,48 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\mu\text{J}$  (*E. coli*), presentando este último una pendiente muy pronunciada, mostrando una elevada sensibilidad, a diferencia de los esporos de *A. versicolor*, que al presentar una pendiente bastante plana, demuestran la gran resistencia de los esporos a la inactivación con esta tecnología.

De manera similar, Zacarías et al. (2021) estudiaron la inactivación de esporos de *B. subtilis* en forma de bioaerosoles en un reactor fotocatalítico de lecho empacado ( $\text{TiO}_2$ , UV-A), logrando una reducción logarítmica de 0,5 órdenes log después de 8 h de tratamiento, con una constante cinética de inactivación de 0,14 1/h. Si bien no sería adecuado comparar estos resultados con los obtenidos en el presente capítulo ya que los reactores utilizados presentan diferentes configuraciones, además de la mayor resistencia a la inactivación por parte de los esporos bacterianos (reflejado en su mayor valor de  $k$ ), resulta útil informar estos resultados reportados en bibliografía para mostrar que también es posible la inactivación de otros microorganismos presentes en bioaerosoles mediante la aplicación de esta tecnología.

#### 4.4.5. Comparación con otras tecnologías

En el presente capítulo se observó que el valor de la constante puramente fotocatalítica ( $k_{ph}$ ) tomó un valor considerablemente menor al de la constante no fotocatalítica ( $k_{nph}$ ), representando únicamente entre el 10,34 y el 31,16 % de la  $k_T$  para los distintos soportes, mientras que la  $k_{nph}$  representó entre el 68,84 y el 89,66 % de la  $k_T$ . Más aún, para el sistema de iluminación LED, la constante  $k_{ph}$  representó únicamente el 5,51 % de  $k_T$  mientras que la constante  $k_{nph}$  representa un 94,49 % de  $k_T$ . Al ensayar la inactivación de este fago con la pintura fotocatalítica del Capítulo 2, se observó que la constante  $k_{nph}$  representó el 50,5 % de la  $k_T$  y la constante  $k_{ph}$ , el 49,5 %. Es decir que, en este último caso, ambas constantes contribuyeron prácticamente de igual forma a la inactivación fágica. Esta diferencia con los resultados obtenidos en este capítulo puede estar relacionada, más allá de la fuente de radiación utilizada o de si se empleó pintura fotocatalítica o catalizador, con la configuración del reactor. La constante  $k_{nph}$  está conformada por  $k_{reactor}$ ,  $k_{coating}$  y  $k_{light}$ , de acuerdo a la Ecuación (2.5). En el Capítulo 2, las constantes  $k_{reactor}$  y  $k_{coating}$  tomaron valores prácticamente nulos, siendo despreciables frente al valor de  $k_{light}$ , por lo que  $k_{nph} = k_{light}$ . En el presente capítulo, en cambio, la constante  $k_{reactor}$  representó entre un 61,3 % y un 72 % del valor total de  $k_{nph}$ , siendo el efecto con mayor peso en la inactivación fágica, indicando que gran parte de las partículas fágicas quedan pegadas o retenidas en las distintas superficies del

reactor. Por otro lado,  $k_{coating}$  representó entre un 5,5 y un 10,5 % del valor de  $k_{nph}$ . Estos valores bajos indican que los fagos que quedarían adheridos al  $TiO_2$  no representan un gran porcentaje en la reducción del nivel de fagos presentes en la corriente gaseosa. Finalmente, la constante  $k_{light}$  representó entre un 22 a un 28 % del valor de  $k_{nph}$ , lo que indica que la inactivación fotoquímica también aporta a la inactivación fágica, siendo entre 17,95 a 25,52 % de  $k_T$ , porcentajes similares a aquellos calculados para el aporte de  $k_{ph}$ . Esto significa que, al realizarse los ensayos en reactores fotocatalíticos con distintas configuraciones y estando los fagos depositados en superficie o presentes en bioaerosoles, la comparación entre ambas tecnologías no es completamente correcta.

Al comparar los valores de  $k_T$  obtenidos con los distintos soportes para el fago ATCC 8014-B1 con otras tecnologías, se observó que el valor obtenido con la pintura fotocatalítica bajo radiación visible fue más de un orden menor ( $0,01081 \pm 8,7 \times 10^{-4}$  1/min) que las obtenidas con fotocatálisis ( $TiO_2$  prístino + UV-A) usando los distintos soportes. Esto indica que la tasa de inactivación del fago ATCC 8014-B1 es mayor para la fotocatálisis ( $TiO_2$  prístino + UV-A), lo cual puede deberse a que en el presente capítulo se utilizó una fuente de radiación con mayor energía, con la cual la generación de radicales libres reactivos por parte de la superficie fotocatalítica se vuelve más intensa, lo que resulta en un aumento en la velocidad de inactivación de los agentes biológicos (Poormohammadi et al., 2021). Además, el área activa en los ensayos con pintura fotocatalítica fue menor que las correspondientes a fotocatálisis ( $TiO_2$  prístino + UV-A). Por otro lado, la constante  $k_{reactor}$  en el presente capítulo representó un gran porcentaje del valor total de  $k_T$  (entre un 45,23 y un 58,33 % dependiendo el soporte empleado), con lo cual gran parte de la reducción en el título fágico está asociada en realidad a la deposición de las partículas fágicas en distintas partes del reactor y no a la inactivación en sí, efecto que no está presente al trabajar en el reactor escala laboratorio empleado en el Capítulo 2. Más aún, en el Capítulo 2 los fagos estuvieron en estrecho contacto con el fotocatalizador ya que fueron depositados y secados sobre los recubrimientos, mientras que en el presente capítulo el fago se encontraba como bioaerosol. Por otro lado, como al estudiar la inactivación del fago ATCC 8014-B1 con ozono se graficaron los datos en función de la dosis de ozono, el valor de la constante  $k_g$  se obtuvo en unidades de  $m^3/mL \times min$  (Lloréns, 2024), por lo que no es posible realizar la comparación directa de las constantes de inactivación de las distintas tecnologías. Finalmente, si se comparan las constantes de inactivación  $k_T$  alcanzadas con fotocatálisis ( $TiO_2$  prístino, UV-A) con las  $k_{max}$  obtenidas a partir de ajustar los modelos cinéticos a los datos de UV-C para el fago ATCC 8014-B1, se observa que las  $k_{max}$  de UV-C resultaron entre 22,61 y 31,03 veces mayores, dependiendo el soporte empleado para el fotocatalizador. Sin embargo, es importante destacar que a pesar de presentar

valores altos de  $k_{max}$ , las curvas de inactivación con UV-C también presentaron un efecto de cola y no se lograría una completa inactivación fágica empleando esta estrategia, a menos que se combine con otras tecnologías, como fue demostrado para los fagos MLC-A y LDG en el Capítulo 3.

También es posible comparar estas tecnologías a partir de las tasas de reducción fágica alcanzadas o de sus  $t_{99}$ . Considerando los tiempos necesarios para alcanzar el 99 % de inactivación fágica, el menor  $t_{99}$  se obtuvo al trabajar con radiación UV-C, ya que fueron necesarios sólo 1,07 min para reducir la infectividad del fago ATCC 8014-B1 en 2 órdenes log. En segundo lugar, se encuentra el ozono gaseoso, que solo necesitó 13,2 min para inactivar el 99 % de las partículas fágicas (Lloréns, 2024). En tercer lugar, se encuentra la fotocatálisis, que mostró valores de  $t_{99}$  variables entre 52,86 min y 63,11 min, dependiendo el soporte empleado. Finalmente, el tratamiento con pintura fotocatalítica y radiación visible evidenció un valor de 425,82 minutos para dicho fago. Sin embargo, como se vio en el capítulo anterior, la reducción de órdenes log en corto tiempo en presencia de radiación UV-C sólo se produce hasta un valor umbral, debido al efecto de cola, a partir del cual no se obtienen mayores reducciones. Cabe destacar que, si bien es la estrategia más lenta, la pintura fotocatalítica presenta la ventaja de ser una tecnología pasiva, que está funcionando continuamente.

Considerando las tasas de reducción fágica para las otras tecnologías, se observa que la aplicación de pintura fotocatalítica bajo radiación visible estudiada en el primer capítulo presentó la menor reducción para el fago ATCC 8014-B1, con un valor de 0,0049 órdenes log/min, seguida de la fotocatálisis estudiada en el presente capítulo, con valores entre 0,0457 órdenes log/min y 0,0912 órdenes log/min, dependiendo el soporte utilizado. Finalmente, al estudiar la inactivación del fago ATCC 8014-B1 con ozono gaseoso, se obtuvo la mayor tasa de reducción fágica, con un valor de 0,177 órdenes log/min (Lloréns, 2024). No se realizó la comparación de las tasas de reducción fágica con radiación UV-C porque, debido al efecto de cola evidenciado en las curvas de inactivación obtenidas, no fue posible calcular tasas de reducción fágica con esta tecnología, sino simplemente las reducciones en la infectividad logradas en un período de tiempo determinado.

# **CAPÍTULO 5 - CONCLUSIONES**

### **5.1. Inactivación con pintura fotocatalítica**

Se estudió la inactivación de dieciséis fagos infectivos de BAL empleando una pintura fotocatalítica formulada con  $\text{TiO}_2$  dopado con carbono bajo radiación visible ( $\lambda = 360 - 720 \text{ nm}$ ).

Se observó un comportamiento fago – dependiente, ya que ocho de los fagos estudiados fueron completamente inactivados en períodos de tiempo entre 1,5 y 5 h, mientras que los ocho fagos restantes se inactivaron parcialmente con tiempos de tratamiento de entre 5 y 20 h.

Al realizar los ensayos en ausencia de radiación y presencia de pintura (Control ii) y en ausencia tanto de radiación como de pintura (Control iii) no se observó pérdida en la infectividad de ningún fago. Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de los ensayos del Control i (radiación sin recubrimiento de pintura) representarían el efecto fotoquímico. Este control mostró una disminución en la infectividad fágica, presentando nuevamente un comportamiento fago – dependiente, pero sin observarse la inactivación completa de ninguno de los dieciséis fagos estudiados. Todas las curvas de inactivación, tanto fotocatalíticas como fotoquímicas, siguieron una cinética de primer orden.

De acuerdo a las constantes cinéticas de inactivación aparente fotocatalíticas, el fago más sensible fue 892-LB (7,52 1/h) y el más resistente, el fago LDG (0,30 1/h). Por otro lado, los valores de  $t_{99}$  estuvieron comprendidos en el rango entre 0,6 (fago 892-LB) y 17,9 h (fago LDG).

Las tasas de reducción fágica variaron entre 0,12 órdenes log/h (fago LDG) y 3,11 órdenes log/h (fago 892-LB). Las eficiencias de inactivación fotónica y cuántica se calcularon para cada fago, siendo las correspondientes al fago QF9 las mayores ( $4,06 \times 10^{12}$  UFP/Einstein y  $9,17 \times 10^{12}$  UFP/Einstein, respectivamente) y las correspondientes al fago Cb1/204 las menores ( $3 \times 10^9$  UFP/Einstein y  $6 \times 10^9$  UFP/Einstein, respectivamente).

Se ajustó un modelo cinético de primer orden en el que se relacionó la constante de inactivación aparente con la humedad relativa a través de una función logística y con el flujo de radiación a través de una función potencial. Se obtuvo una alta concordancia entre los valores experimentales y las predicciones del modelo.

Se demostró la eficiencia de la pintura fotocatalítica formulada para la inactivación fágica. La aplicación de la pintura fotocatalítica constituye una estrategia útil e innovadora, que puede ser complementada con fotocatálisis prístina (UV-A,  $\text{TiO}_2$ ) y otras estrategias para reducir la carga fágica en las industrias lácteas, considerando su sencilla implementación, asociada a la aplicación de la pintura en diversas superficies y

paredes, sobre las cuales la inactivación fágica se produciría continuamente bajo la radiación emitida por el propio sistema de iluminación de la planta.

## **5.2. Inactivación con radiación UV-C**

Se demostró la viabilidad de la radiación UV-C para la inactivación de fagos de bacterias lácticas, logrando la inactivación completa de seis fagos (832-B1, 892-LB, 009-ML, BYM, Ib<sub>3</sub> y Cb1/204). Los diez fagos restantes (CHD, Ln-9, ATCC 8014-B1, QF9, M1-G1b, M13-G1b, MLC-A, LDG, J-1 y 0BJ) alcanzaron elevadas reducciones en cortos períodos de tiempo, pero presentaron un marcado efecto de cola. Con el objetivo de disminuir esta concentración residual se llevaron adelante ensayos complementarios, sin lograr eliminar el efecto de cola ni disminuir el valor de la concentración fágica residual en ninguno de estos ensayos.

Los datos experimentales fueron ajustados con varios modelos, resultando los modelos de Geeraerd y de Baranyi y Roberts los que presentaron el mejor ajuste (valores de RMSE entre  $6,86 \times 10^{-6}$  y 3,54 %).

El parámetro cinético  $k_{max}$ , ajustado con los modelos de Geeraerd y de Baranyi y Roberts, estuvo comprendido en el rango entre  $4,6 \times 10^{-2}$  1/s (fago LDG) y  $9,0 \times 10^{-2}$  1/s (fago CHD). Por otro lado, los tiempos necesarios para lograr una disminución de 2 órdenes log en los títulos fágicos ( $t_{99}$ ) tomaron valores entre 53 s (fago CHD) y 102 s (fago LDG).

Debido a la presencia del efecto de cola, con esta tecnología no se calcularon tasas de reducción fágica, sino reducciones en la infectividad de los fagos, que se encontraron entre 3,16 (fago 0BJ) y 4,45 órdenes log (fago M1-G1b), al aplicar dosis de 0,13 o 0,32 J/cm<sup>2</sup>, dosis a las cuales se alcanza el efecto de cola.

Se demostró que los fagos MLC-A y LDG obedecen la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe, dado que la fracción de fagos infectivos luego del tratamiento con UV-C no se vio afectada por cambios en el flujo de radiación UV-C o el tiempo de exposición, al mantenerse la dosis aplicada en un mismo valor. Entonces, cuando el flujo de radiación incidente sea menor, será necesaria una exposición más prolongada para obtener una inactivación semejante.

La radiación UV-C se presenta como una tecnología muy útil para la inactivación de fagos debido a la elevada reducción obtenida de la infectividad de los mismos en un breve período de tiempo, aunque se debe considerar el efecto de cola que podría estar presente.

### **5.3. Inactivación con fotocátalisis (UV-A, TiO<sub>2</sub>)**

En estudios previos del grupo se estudió la fotocátalisis heterogénea para la inactivación de fagos de BAL, obteniendo resultados prometedores. En esta tesis se optimizó el funcionamiento de un reactor semi-piloto, diseñado con anterioridad, utilizando el fago ATCC 8014-B1, infectivo de *Lp. plantarum*. Para optimizar el reactor, se ensayaron tres materiales como soporte para el fotocatalizador (vidrio borosilicato, vidrio común esmerilado y filtro) como así también dos fuentes de radiación UV-A (lámparas incandescentes y lámparas LEDs).

Con cada soporte se realizaron cuatro ensayos: fotocatalítico (radiación + TiO<sub>2</sub>), Control i (radiación sin TiO<sub>2</sub>), Control ii (oscuridad con TiO<sub>2</sub>) y Control iii (oscuridad sin TiO<sub>2</sub>). Las curvas de inactivación para todos los ensayos siguieron una cinética de inactivación de primer orden y se obtuvieron constantes cinéticas, discriminando cada uno de los efectos que participaron en la reducción de los títulos fágicos, esto es inactivación fotocatalítica y fotoquímica, adsorción sobre el catalizador y deposición en distintas partes del reactor.

Las constantes cinéticas de inactivación totales ( $k_T$ ) obtenidas con los distintos soportes no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), tomando valores entre 0,145 1/min (vidrio común esmerilado) y 0,199 1/min (filtro). Los  $t_{99}$  se encontraron entre 52,86 min (filtro) y 63,11 min (vidrio común esmerilado).

Las tasas de reducción fágica obtenidas a partir de los ensayos fotocatalíticos estuvieron comprendidas en el rango entre 0,071 órdenes log/min (vidrio común esmerilado) y 0,0912 órdenes log/min (filtro). Finalmente, las mayores eficiencias fotocatalíticas se obtuvieron con el soporte filtro ( $6,47 \times 10^7$  UFP/Einstein la eficiencia fotónica y  $1,50 \times 10^8$  UFP/Einstein la eficiencia cuántica) y las menores se obtuvieron con el vidrio borosilicato ( $7,82 \times 10^6$  UFP/Einstein la eficiencia fotónica y  $2,86 \times 10^7$  UFP/Einstein la eficiencia cuántica). La eficiencia energética con las lámparas fluorescentes tomó un valor aproximado de 1,80 UFP/J. Se observó que las mayores eficiencias fotocatalíticas se obtuvieron con el soporte filtro, por lo que, junto a su menor costo económico, resultaría ser el soporte más adecuado para la deposición del catalizador.

Al modificar la fuente de radiación por lámparas LEDs, utilizando el filtro como soporte, se observó que tanto la constante de inactivación total ( $k_T = 0,1143$  1/min) como las tasas de reducción fágica (0,0457 órdenes log/min) resultaron menores que con las lámparas fluorescentes y el mismo soporte, lo que indicaría una mayor inactivación empleando las lámparas fluorescentes. El  $t_{99}$  en esta oportunidad fue de 69,84 min. Sin embargo, las eficiencias fotónica, cuántica y energética ( $1,08 \times 10^9$  UFP/Einstein, 2,96

$\times 10^9$  UFP/Einstein y 4,32 UFP/J, respectivamente) resultaron mayores, lo que indica que el proceso fue más eficiente al emplear lámparas LEDs. Esta fuente de radiación es amigable con el medio ambiente, posee una mayor vida útil y representa un menor costo a largo plazo. Por todos estos motivos, se sugiere el empleo de la fuente de radiación con lámparas LEDs para operar el reactor.

#### **5.4. Influencia de condiciones ambientales y de operación**

Se estudió el efecto de la humedad relativa en la inactivación fágica mediante las tecnologías de pintura fotocatalítica y radiación UV-C. Con la pintura se observó que, al aumentar la humedad relativa a un valor de 80 %, las tasas de reducción fágica fueron mayores, mientras que al trabajar con el mayor nivel de humedad relativa con radiación UV-C (90 %), se obtuvieron las menores reducciones logarítmicas. Esto indica que la humedad relativa es un parámetro que influye significativamente en la inactivación fágica y lo puede hacer positiva o negativamente, según la estrategia de inactivación aplicada. Por ejemplo, en el caso de la pintura fotocatalítica un mayor porcentaje de humedad favorece la formación de ROS, mientras que con radiación UV-C se produciría una atenuación de la radiación debido a la sorción del agua en la superficie viral. Por este motivo, resulta necesario estudiar el efecto de la humedad relativa en la inactivación fágica utilizando diferentes tecnologías, para poder elegir la estrategia de inactivación más adecuada en función de las condiciones ambientales del lugar donde se quiera reducir el nivel de fagos.

Con ambas tecnologías también se estudió el efecto del flujo de radiación incidente sobre la inactivación fágica. En ambos casos se observó que la reducción fágica aumentó al incrementar el flujo de radiación, logrando una reducción similar en un período de tiempo menor al aplicar mayor flujo de radiación.

El medio de suspensión no influyó en la tasa de inactivación fágica bajo radiación UV-C, ya que no se observaron diferencias significativas entre las reducciones logarítmicas alcanzadas por los fagos MLC-A y LDG al encontrarse suspendidos en los distintos medios, con excepción de las reducciones alcanzadas por el fago LDG en leche, con un 95 % de nivel de confianza.

Por otro lado, la radiación más efectiva para la inactivación por fotocátalisis resultó ser la radiación UV-A, ya que cuando se empleó el catalizador modificado en la pintura con radiación visible fueron necesarios tiempos de tratamiento mucho más prolongados (1,5 – 20 h) que con radiación UV-A (4 h) para lograr una reducción considerable en los títulos fágicos. Asimismo, si bien al emplear el catalizador  $\text{TiO}_2$  con radiación UV-C se observó que la velocidad de inactivación de los fagos MLC-A y LDG aumentó para tiempos bajos al recubrir las placas de vidrio con  $\text{TiO}_2$  (mayor valor de

$k_{max}$  del modelo de Geeraerd), el efecto de cola se presentó a una concentración final mayor que la alcanzada al trabajar con radiación UV-C sin catalizador, debido posiblemente a la baja penetración a dicha longitud de onda y a los fagos ocultos entre los intersticios del material fotocatalítico; por lo cual el tratamiento UV-C + TiO<sub>2</sub> no sería tan efectivo para la inactivación fágica como el tratamiento UV-A + TiO<sub>2</sub> o la combinación de UV-C y UV-A + TiO<sub>2</sub> como se demostró en el Capítulo 3.

### 5.5. Conclusiones generales

Al comparar la sensibilidad o resistencia de los fagos frente a la pintura fotocatalítica y a la radiación UV-C, se observó que los fagos 892-LB y 009-ML, ambos infectivos de *Lb. helveticus*, fueron los fagos más sensibles, presentando los mayores valores de las constantes  $k_T$  y los menores  $t_{99}$  en el caso de la pintura y no pudiendo detectar partículas infectivas en el menor tiempo de tratamiento con radiación UV-C. Por el contrario, el fago LDG fue el más resistente frente a ambas tecnologías (menor valor de  $k_T$  o  $k_{max}$  y mayor valor de  $t_{99}$ ). Sin embargo, si bien estos fagos coinciden en los extremos, al ordenar los fagos del más sensible al más resistente, el resto de los fagos presentaron una secuencia diferente dependiendo la tecnología, indicando un comportamiento fago-dependiente.

En la Tabla 5.1 se muestra un resumen de los valores de  $k_T$ ,  $t_{99}$ , reducciones fágicas y eficiencias fotocatalíticas obtenidas con las distintas tecnologías evaluadas en esta tesis.

**Tabla 5.1.** Valores de  $k_T$ ,  $t_{99}$ , reducciones en la infectividad y eficiencias fotocatalíticas obtenidas con las distintas tecnologías ensayadas.

|                                           | <b>Pintura<br/>fotocatalítica<br/>+ radiación<br/>visible</b> | <b>Radiación<br/>UV-C</b>                  | <b>Fotocatálisis<br/>(UV-A, TiO<sub>2</sub>)</b> | <b>Fotocatálisis<br/>LEDs</b> |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------|
| $k_T$ o $k_{max}$                         | 0,3 – 7,52 1/h                                                | 0,046 –<br>0,090 1/s                       | 0,145 – 0,199<br>1/min                           | 0,1143 1/min                  |
| $t_{99}$                                  | 0,6 – 17,9 h                                                  | 53 – 102 s                                 | 52,86 – 63,11<br>min                             | 69,84 min                     |
| Reducción en<br>la infectividad<br>fágica | 0,12 – 3,11<br>órdenes log/h                                  | 3,16 – 4,45<br>órdenes log<br>en 2 – 5 min | 0,071 – 0,0912<br>órdenes log/min                | 0,0457<br>órdenes<br>log/min  |
| $\eta_{ph}$<br>(UFP/Einstein)             | $3 \times 10^9$ –<br>$4,06 \times 10^{12}$                    | –                                          | $7,82 \times 10^6$ –<br>$6,47 \times 10^7$       | $1,08 \times 10^9$            |
| $\eta_{qu}$<br>(UFP/Einstein)             | $6 \times 10^9$ –<br>$9,17 \times 10^{12}$                    | –                                          | $2,86 \times 10^7$ –<br>$1,5 \times 10^8$        | $2,96 \times 10^9$            |

Se observó que las mayores constantes de inactivación y menores valores de  $t_{99}$  se obtuvieron con la radiación UV-C, lo que indica una gran sensibilidad por parte de los

fagos frente a esta tecnología. A continuación se encontró la fotocátalisis (UV-A +  $\text{TiO}_2$ ) para el fago ATCC 8014-B1 con lámparas fluorescentes y finalmente la fotocátalisis con pintura. El rango de las constantes para la pintura fotocatalítica bajo radiación visible resultó muy amplio, lo que indica el comportamiento fago-dependiente frente a esta tecnología.

Fue posible expresar las reducciones en la infectividad fágica como tasas de reducción (órdenes log/tiempo) con pintura fotocatalítica y fotocátalisis ya que las curvas de inactivación siguieron cinéticas de primer orden, lográndose las menores tasas con fotocátalisis. En cambio, como las curvas con radiación UV-C presentaron un efecto de cola, no fue posible calcular una tasa de reducción de forma precisa y se expresó la reducción en la infectividad en un tiempo determinado, observando que se logró una elevada reducción en un corto período de tiempo.

Cabe destacar que, si bien la radiación UV-C fue la estrategia que logró las mayores constantes de inactivación y los menores  $t_{99}$ , junto a una elevada reducción en los títulos fágicos en corto tiempo, la concentración residual de fagos infectivos, evidenciados por el efecto de cola, podría continuar ocasionando problemas en la industria láctea. Para evitar que esto suceda, sería recomendable complementar la radiación UV-C con otras estrategias de inactivación, tales como ozono o fotocátalisis, lo cual resulta en una mejora en la inactivación fágica, como se demostró en el Capítulo 3.

Al comparar las eficiencias fotónicas y cuánticas de los procesos fotocatalíticos (pintura fotocatalítica y fotocátalisis UV-A +  $\text{TiO}_2$ ), se observó que los procesos más eficientes se obtuvieron con las pinturas. Es decir que, si bien el proceso de inactivación es más lento (constantes menores y mayores  $t_{99}$ ), resulta muy eficiente. Además, el catalizador es activado con el propio sistema de radiación de la planta, por lo que la inactivación se produciría de forma continua durante las jornadas laborales, sin necesidad de utilizar lámparas especiales como las UV.

Es importante destacar que todas las estrategias planteadas fueron efectivas para la inactivación fágica, presentando distintas ventajas cada una de ellas, al considerar su eficiencia y velocidad de inactivación. Cuando sea posible, es recomendable combinar las distintas tecnologías a fin de lograr una mayor inactivación fágica y minimizar así el riesgo de infecciones.

Estas estrategias podrían sumarse a las que habitualmente se aplican en los ambientes industriales para reducir el nivel de fagos, principalmente los que se encuentran presentes en superficies y bioaerosoles y, de esta manera, disminuir la frecuencia de infecciones fágicas. La elección de la tecnología dependerá del objetivo perseguido, es decir, si se pretende aplicar la tecnología de manera preventiva con el

objetivo de mantener un nivel bajo de fagos a lo largo del tiempo, o bien de forma correctiva ante episodios de infecciones fágicas que han comprometido los procesos fermentativos. Además, la decisión de la tecnología a seleccionar también puede verse influenciada por el equipamiento disponible en la planta, la escalabilidad de los procesos, los costos involucrados, el sector de la planta a tratar, entre otros.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas Syed, Q., Hassan, A., Sharif, S., Ishaq, A., Saeed, F., Afzaal, M., Hussain, M., & Anjum, F. M. (2021). Structural and functional properties of milk proteins as affected by heating, high pressure, Gamma and ultraviolet irradiation: a review. In *International Journal of Food Properties* (Vol. 24, Issue 1, pp. 871–884). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1937209>
- Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Editorial: Phage therapy: past, present and future. *Frontiers in Microbiology*, 8(981), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00981>
- Achouri, F., Said, M. Ben, Wahab, M. A., Bousselmi, L., Corbel, S., Schneider, R., & Ghrabi, A. (2021). Effect of photocatalysis (TiO<sub>2</sub> /UVA) on the inactivation and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors expression. *Environmental Technology*, 42(27), 4237–4246. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1751729>
- Ackermann, H.-W. (2009). Phage classification and characterization. In *Bacteriophages. Methods and Protocols* (Vol. 501, pp. 127–140). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13)
- Adityosulindro, S., Barthe, L., González-Labrada, K., Jáuregui Haza, U. J., Delmas, H., & Julcour, C. (2017). Sonolysis and sono-Fenton oxidation for removal of ibuprofen in (waste)water. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.06.008>
- Albert, I., & Mafart, P. (2005). A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1–3), 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.016>
- Ale, E. C., Perezlindo, M. J., Burns, P., Tabacman, E., Reinheimer, J. A., & Binetti, A. G. (2016). Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its functional characterization as a yogurt additive. *Journal of Dairy Research*, 83, 487–492.
- Aljohani, A., Rashwan, N., Vasani, S., Alkhawashki, A., Wu, T. T., Lu, X., Castillo, D. A., & Xiao, J. (2025). The health benefits of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum*: A systematic review and meta-analysis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 17(5), 3358–3377. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10287-3>
- Ameta, S. C., & Ameta, R. (2018). *Advanced oxidation processes for waste water treatment* (S. C. Ameta & R. Ameta, Eds.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-00384-4>
- Amorim, S. M., Suave, J., Andrade, L., Mendes, A. M., José, H. J., & Moreira, R. F. P. M. (2018). Towards an efficient and durable self-cleaning acrylic paint containing mesoporous TiO<sub>2</sub> microspheres. *Progress in Organic Coatings*, 118, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.01.005>
- ANMAT. (2006a). *Código Alimentario Argentino (CAA) – Capítulo VIII- Alimentos Lácteos. Artículo 576 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)*. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo\\_viii\\_lacteosactualiz\\_2025-03.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteosactualiz_2025-03.pdf).
- ANMAT. (2006b). *Código Alimentario Argentino (CAA) – Capítulo VIII- Alimentos Lácteos. Artículo 605 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)*.

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo\\_viii\\_lacteosactualiz\\_2025-03.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteosactualiz_2025-03.pdf).

- Ansari, J. A., Ismail, M., & Farid, M. (2019). Investigate the efficacy of UV pretreatment on thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in different types of milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.02.002>
- Arimi, A., Dillert, R., Dräger, G., & Bahnemann, D. W. (2019). Light-induced reactions of Chlorpromazine in the presence of a heterogeneous photocatalyst: formation of a long-lasting sulfoxide. *Catalysts*, 9(0627), 2–18.
- Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2011). Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*, 21(5), 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.005>
- Atamer, Z., Dietrich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2009). Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *International Dairy Journal*, 19(4), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.012>
- Atamer, Z., Dietrich, J., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2010). Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages. *International Dairy Journal*, 20(6), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.12.014>
- Atamer, Z., & Hinrichs, J. (2010). Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. *International Dairy Journal*, 20(3), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.09.006>
- Atamer, Z., Meike, S., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2013). Review: Elimination of bacteriophages in whey and whey products. In *Front. Microbiol.* (Vol. 4, pp. 1–9).
- Ballari, M. de los M., Carballada, J., Minen, R. I., Salvadores, F., Brouwers, H. J. H., Alfano, O. M., & Cassano, A. E. (2016). Visible light TiO<sub>2</sub> photocatalysts assessment for air. *Process Safety and Environmental Protection*, 101, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2015.08.003>
- Banerjee, S., Pillai, S. C., Falaras, P., O'Shea, K. E., Byrne, J. A., & Dionysiou, D. D. (2014). New insights into the mechanism of visible light photocatalysis. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5, 2543–2554.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Bartowsky, E. (2024). Lactic acid bacteria in grape fermentations: an example of LAB as contaminants in food processing. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 284–298). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Bayarri, B., Cruz-Alcalde, A., López-Vinent, N., Micó, M. M., & Sans, C. (2021). Can ozone inactivate SARS-CoV-2? A review of mechanisms and performance on viruses. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 415). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125658>

- Beauchamp, S., & Lacroix, M. (2012). Resistance of the genome of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* to irradiation evaluated by the induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts using gamma and UV-C radiations. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1193–1197.
- Bhullar, M. S., Patras, A., Kilanzo-Nthenge, A., Pokharel, B., Yannam, S. K., Rakariyatham, K., Pan, C., Xiao, H., & Sasges, M. (2018). Microbial inactivation and cytotoxicity evaluation of UV irradiated coconut water in a novel continuous flow spiral reactor. *Food Research International*, 103, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.004>
- Binda, S., & Ouwehand, A. C. (2024). Lactic acid bacteria for fermented dairy products. In G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 186–208). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Briggiler Marcó, M., Ballari, M. de los M., Gornati, J. S., Alfano, O. M., & Quiberoni, A. (2021). Photocatalytic inactivation of dairy bacteriophages contained in aerosol: Comparative evaluation of efficiencies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 409, 987–993. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113130>
- Briggiler Marcó, M., De Antoni, G. L., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. (2009). Thermal, chemical, and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1012–1019. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1012>
- Briggiler Marcó, M., Machado, N., Quiberoni, A., & Suárez, V. (2022). *Streptococcus thermophilus* phages in whey derivatives: from problem to application in the dairy industry. *Viruses*, 14(4), 810. <https://doi.org/10.3390/v14040810>
- Briggiler Marcó, M., & Mercanti, D. J. (2021). Bacteriophages in dairy plants. In *Advances in Food and Nutrition Research. Toldrá Fidel (ed). Springer* (Vol. 97, pp. 1–54). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.015>
- Briggiler Marcó, M., Moineau, S., & Quiberoni, A. del L. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, 2(3), 149–158. <https://doi.org/10.4161/bact.21868>
- Briggiler Marcó, M., Negro, A. C., Alfano, O. M., & Quiberoni, A. del L. (2018). New semi-pilot-scale reactor to study the photocatalytic inactivation of phages contained in aerosol. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21385–21392. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8994-5>
- Briggiler Marcó, M., Quiberoni, A. del L., Negro, A. C., Reinheimer, J. A., & Alfano, O. M. (2011). Evaluation of the photocatalytic inactivation efficiency of dairy bacteriophages. *Chemical Engineering Journal*, 172(2–3), 987–993. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.012>
- Briggiler Marcó, M., Suárez, V. B., Quiberoni, A., & Pujato, S. A. (2019). Inactivation of dairy bacteriophages by thermal and chemical treatments. *Viruses*, 11(5), 480. <https://doi.org/10.3390/v11050480>
- Bulman, D. M., Mezyk, S. P., & Remucal, C. K. (2019). The impact of pH and irradiation wavelength on the production of reactive oxidants during chlorine photolysis. *Environmental Science & Technology*, 53(8), 4450–4459. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07225>

- Bunsen, R. W., & Roscoe, Henry. E. (1857). Photochemische Untersuchungen. In *Poggendorff's Annalen* (Vol. 100, pp. 51–51).
- Burton, H. (1951). Ultraviolet irradiation of milk. *Dairy Science Abstracts*, 13(3), 229–244.
- Byrne, J., Dunlop, P., Hamilton, J., Fernández-Ibáñez, P., Polo-López, I., Sharma, P., & Vennard, A. (2015). A review of heterogeneous photocatalysis for water and surface disinfection. *Molecules*, 20(4), 5574–5615. <https://doi.org/10.3390/molecules20045574>
- Campagna, C., Villion, M., Labrie, S. J., Duchaine, C., & Moineau, S. (2014). Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.012>
- Capra, M. L., Neve, H., Sorati, P. C., Atamer, Z., Hinrichs, J., Heller, K. J., & Quiberoni, A. (2013). Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: Updating traditional phage detection methodologies. *International Dairy Journal*, 30(2), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.009>
- Capra, M. L., Quiberoni, A. D. L., Ackermann, H. W., Moineau, S., & Reinheimer, J. A. (2006). Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2414–2423. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72314-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72314-1)
- Capra, M. L., Quiberoni, A. del L., Reinheimer, J. A., & Guglielmotti, D. M. (2018). Bacteriophage: biological aspects. In *Reference Module in Food Sciences* (pp. 1–9).
- Carminati, D., Giraffa, G., Zago, M., Briggiler Marcó, M., Guglielmotti, D. M., Binetti, A. G., & Reinheimer J. (2016). Lactic acid bacteria for dairy fermentations: specialized starter cultures to improve dairy products. In F. Mozzi, R. Raya, & G. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications* (pp. 191–208). Wiley-Blackwell.
- Castellote, M., & Bengtsson, N. (2011). Principles of TiO<sub>2</sub> Photocatalysis. In Y. Ohama & D. Van Gemert (Eds.), *Applications of titanium dioxide photocatalysis to construction materials* (Vol. 5, pp. 5–10). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1297-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1297-3_2)
- Chalatsi-Diamanti, P., Isari, E. A., Grilla, E., Kokkinos, P., & Kalavrouziotis, I. K. (2025). Recent prospects, challenges and advancements of photocatalysis as a wastewater treatment method. In *Water Emerging Contaminants and Nanoplastics* (Vol. 4, Issue 12). OAE Publishing Inc. <https://doi.org/10.20517/wecn.2025.03>
- Chen, G.-C., Wang, Y., Tong, X., Szeto, I. M. Y., Smit, G., Li, Z.-N., & Qin, L.-Q. (2017). Cheese consumption and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. *European Journal of Nutrition*, 56, 2565–2575. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1292-z>
- Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 161–171. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00064-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00064-3)
- Chen, Y., Liu, W., Xue, J., Yang, J., Chen, X., Shao, Y., Kwok, L., Bilige, M., Mang, L., & Zhang, H. (2014). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of

- Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6680–6692. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7962>
- Cheng, R., Kang, M., Shen, Z., Shi, L., & Zheng, X. (2019). Visible-light-driven photocatalytic inactivation of bacteriophage f2 by Cu-TiO<sub>2</sub> nanofibers in the presence of humic acid. *Journal of Environmental Sciences*, 77, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.09.017>
- Cho, J., Park, J. H., Kim, J. K., & Schubert, E. F. (2017). White light-emitting diodes: history, progress, and future. In *Laser and Photonics Reviews* (Vol. 11, Issue 2, pp. 1–17). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/lpor.201600147>
- Cho, M., Chung, H., Choi, W., & Yoon, J. (2005). Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 270–275. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.270-275.2005>
- Choi, S. W., Shahbaz, H. M., Kim, J. U., Kim, D. H., Yoon, S., Jeong, S. H., Park, J., & Lee, D. U. (2020). Photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalytic treatment under UVC/VUV irradiation for simultaneous degradation of pesticides and microorganisms. *Applied Sciences*, 10(13), 1–20. <https://doi.org/10.3390/app10134493>
- Chuaybamroong, P., Chotigawin, R., Supothina, S., Sribenjalux, P., Larpiattaworn, S., & Wu, C. Y. (2010). Efficacy of photocatalytic HEPA filter on microorganism removal. *Indoor Air*, 20(3), 246–254. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2010.00651.x>
- Cole, M. B., Davies, K. W., Munro, G., Holyoak, C. D., & Kilsby, D. C. (1993). A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 12(3–5), 232–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01584195>
- Colombo, S., Arioli, S., Gargari, G., Neri, E., Della Scala, G., & Mora, D. (2018). Characterization of airborne viromes in cheese production plants. *Journal of Applied Microbiology*, 125(5), 1444–1454. <https://doi.org/10.1111/jam.14046>
- Correa, M., Mera, S., Guacho, F., Villarreal, E., & Valencia, S. (2020). Desinfección mediante el uso de luz UV-C germicida en diferentes medios como estrategia preventiva ante la COVID-19. *Revista Minerva de Investigación Científica*, 1(2), 46–53. <https://doi.org/10.47460/minerva.v1i2.11>
- Cutler, T., Wang, C., Qin, Q., Zhou, F., Warren, K., Yoon, K. J., Hoff, S. J., Ridpath, J., & Zimmerman, J. (2011). Kinetics of UV254 inactivation of selected viral pathogens in a static system. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 389–395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05046.x>
- Daghrir, R., Drogui, P., & Robert, D. (2013). Modified TiO<sub>2</sub> for environmental photocatalytic applications: a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(10), 3581–3599.
- Datta, N., Harimurugan, P., & Palombo, E. A. (2015). Ultraviolet and pulsed light technologies in dairy processing. In N. Datta & P. M. Tomasula (Eds.), *Emerging Dairy Processing Technologies: Opportunities for the Dairy Industry* (First Edition, pp. 181–204). John Wiley & Sons, Ltd.

- De Amorim, S. M., Sapatieri, J. C., Moritz, D. E., Di Domenico, M., Da Costa Laqua, L. A., Moura-Nickel, C. D., Aragão, G. M. F., & De Fátima Peralta Muniz Moreira, R. (2019). Antifungal and photocatalytic activity of smart paint containing porous microspheres of TiO<sub>2</sub>. *Materials Research*, 22(6). <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2019-0470>
- De Angelis, M., de Candia, S., Calasso, M. P., Faccia, M., Guinee, T. P., Simonetti, M. C., & Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous multiple strain cultures for the manufacture of high-moisture traditional Mozzarella cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.043>
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). *Lactobacillus* spp.: general characteristics. In J. Fuquay, P. Fox, & P. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science* (2nd ed., Vol. 3, pp. 78–90). Academic Press, Elsevier Science.
- De Plano, L. M., Franco, D., Rizzo, M. G., Zammuto, V., Gugliandolo, C., Silipigni, L., Torrisi, L., & Guglielmino, S. P. P. (2021). Role of phage capsid in the resistance to UV-C radiations. *International Journal of Molecular Science*, 22(3408), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22073408>
- del Rio, B., Binetti, A. G., Martín, M. C., Fernández, M., Magadán, A. H., & Alvarez, M. A. (2007). Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology*, 24(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.001>
- Delorme, M. M., Guimarães, J. T., Coutinho, N. M., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, R., Margalho, L. P., Pimentel, T. C., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Granato, D., Sant'Ana, A. S., Duarte, M. C. K. H., & Cruz, A. G. (2020). Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 102, pp. 146–154). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.001>
- Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M.-C., & Moineau, S. (2006). Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4338–4346. <https://doi.org/10.1128/AEM.02517-05>
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Dubuis, M. E., Dumont-Leblond, N., Laliberté, C., Veillette, M., Turgeon, N., Jean, J., & Duchaine, C. (2020). Ozone efficacy for the control of airborne viruses: bacteriophage and norovirus models. *PLoS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231164>
- Dunlop, P. S. M., Sheeran, C. P., Byrne, J. A., McMahon, M. A. S., Boyle, M. A., & McGuigan, K. G. (2010). Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 216, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.07.004>
- Ebrecht, A. C., Guglielmotti, D. M., Tremmel, G., Reinheimer, J. A., & Suárez, V. B. (2010). Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance. *Food Microbiology*, 27(4), 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.12.012>

- Eddy, D. R., Permana, M. D., Sakti, L. K., Sheha, G. A. N., Solihudin, Hidayat, S., Takei, T., Kumada, N., & Rahayu, I. (2023). Heterophase polymorph of TiO<sub>2</sub> (anatase, rutile, brookite, TiO<sub>2</sub> (B)) for efficient photocatalyst: fabrication and activity. *Nanomaterials*, 13(704), 1–31. <https://doi.org/10.3390/nano13040704>
- Eischeid, A. C., & Linden, K. G. (2011). Molecular indications of protein damage in adenoviruses after UV disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1145–1147. <https://doi.org/10.1128/AEM.00403-10>
- Elmolla, E. S., & Chaudhuri, M. (2010). Comparison of different advanced oxidation processes for treatment of antibiotic aqueous solution. *Desalination*, 256(1–3), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.02.019>
- Fadda, S., Castellano, P., Terán, L., Raya, R., & Vignolo, G. (2024). Lactic acid bacteria in meat fermentations: role of autochthonous starter cultures on quality, safety and health. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 228–246). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Fagnant, H. S., Isidean, S. D., Wilson, L., Bukhari, A. S., Allen, J. T., Agans, R. T., Lee, D. M., Hatch-McChesney, A., Whitney, C. C., Sullo, E., Porter, C. K., & Karl, J. P. (2023). Orally ingested probiotic, prebiotic, and synbiotic interventions as countermeasures for gastrointestinal tract infections in nonelderly adults: a systematic review and meta-analysis. *Advances in Nutrition*, 14(3), 539–554. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2023.02.002>
- FAO/OMS. (2011). *Codex Alimentarius - Leche y productos lácteos*. <https://www.fao.org/3/l2085s/l2085s.pdf>.
- Fergus, W. J., Collins, M. C. R., Hill, C., & Ross, R. P. (2019). Antimicrobials from lactic acid bacteria and their potential applications. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional aspects* (5th ed., pp. 151–174). CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Fernández, L., Escobedo, S., Gutiérrez, D., Portilla, S., Martínez, B., García, P., & Rodríguez, A. (2017). Bacteriophages in the dairy environment: from enemies to allies. *Antibiotics*, 6(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040027>
- Flores, M., Passalía, C., Labas, M. D., & Brandi, R. J. (2024). Study of photocatalytic inactivation of airborne microorganisms on various functionalized filter media: comparative analysis. *Air Quality, Atmosphere and Health*. <https://doi.org/10.1007/s11869-024-01539-w>
- Forssten, S. D., & Ouwehand, A. C. (2024). Lactic acid bacteria in vegetable, fruit, and seed fermentations. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 247–275). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Foster, H. A., Ditta, I. B., Varghese, S., & Steele, A. (2011). Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 90, Issue 6, pp. 1847–1868). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3213-7>

- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2017). Cheese: an overview. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (4th ed., pp. 5–21). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00001-6>
- Fujikawa, H., & Itoh, T. (1996). Tailing of thermal inactivation curve of *Aspergillus niger* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3745–3749. <https://doi.org/10.1128/aem.62.10.3745-3749.1996>
- Gabriel, A. A., Ballesteros, M. L. P., Rosario, L. M. D., Tumlos, R. B., & Ramos, H. J. (2018). Elimination of *Salmonella enterica* on common stainless steel food contact surfaces using UV-C and atmospheric pressure plasma jet. *Food Control*, 86, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.011>
- Gabriel, A. A., Manalo, M. R., Feliciano, R. J., Garcia, N. K. A., Dollete, U. G. M., Acanto, C. N., & Paler, J. C. B. (2018). A *Candida parapsilosis* inactivation-based UV-C process for calamansi (Citrus microcarpa) juice drink. *LWT*, 90, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.020>
- Galeano, L. A., Guerrero-Flórez, M., Sánchez, C. A., Gil, A., & Vicente, M. A. (2019). Disinfection by chemical oxidation methods. In *Applications of Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Drinking Water Treatment* (Vol. 67, pp. 257–295). The Handbook of Environmental Chemistry, Springer.
- Gänzle, M. G. (2024). Lactic acid bacteria in the fermentation of non-alcoholic cereal products. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 209–227). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Gao, X., Zhang, H., Zhang, J., Weng, N., & Huo, S. (2025). Inactivation performance, influencing factors, and mechanisms of advanced oxidation processes for the control of toxic algae. *Journal of Water Process Engineering*, 72(107538), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107538>
- García, J. R., Brandi, R. J., & Ballari, M. de los M. (2025). Toluene oxidation by photocatalytic paint under different indoor environmental conditions and its competitive effect in the presence of another VOC. *Environmental Quality Management*, 35(1). <https://doi.org/10.1002/tqem.70141>
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 185–209. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00362-7)
- Gerrity, D., Ryu, H., Crittenden, J., & Abbaszadegan, M. (2008). Photocatalytic inactivation of viruses using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 43(11), 1261–1270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10934520802177813>
- Ghosh, S., Patra, R., Majumdar, D., & Sen, K. (2021). Developing scenario of titania-based building materials for environmental remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(7), 2077–2102. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02952-1>

- Giannakis, S., Liu, S., Carratalà, A., Rtimi, S., Bensimon, M., & Pulgarin, C. (2017). Effect of Fe(II)/Fe(III) species, pH, irradiance and bacterial presence on viral inactivation in wastewater by the photo-Fenton process: Kinetic modeling and mechanistic interpretation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 204, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.11.034>
- Gille, D., Schmid, A., Walther, B., & Vergères, G. (2018). Fermented food and non-communicable chronic diseases: a review. *Nutrients*, 10(448), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu10040448>
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>
- Giraffa, G., & Rossetti, L. (2004). Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 237(1), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.022>
- Gobbetti, M., & Calasso, M. (2014). *Streptococcus* | Introduction. In C. A. Batt & M. Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., pp. 535–553). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00324-4>
- Gómez-López, V. M., Jubinville, E., Rodríguez-López, M. I., Trudel-Ferland, M., Bouchard, S., & Jean, J. (2021). Inactivation of foodborne viruses by UV light: A review. In *Foods* (Vol. 10, Issue 3141, p. 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods10123141>
- Gopalan, A. I., Lee, J. C., Saianand, G., Lee, K. P., Sonar, P., Dharmarajan, R., Hou, Y. L., Ann, K. Y., Kannan, V., & Kim, W. J. (2020). Recent progress in the abatement of hazardous pollutants using photocatalytic TiO<sub>2</sub>-based building materials. *Nanomaterials*, 10(9), 1–50. <https://doi.org/10.3390/nano10091854>
- Guimarães, J. R., & Barretto, A. S. (2003). Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* and Coliphages in water. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20(04), 403–411. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322003000400007>
- Guo, K., Wu, Z., Chen, C., & Fang, J. (2022). UV/Chlorine process: an efficient advanced oxidation process with multiple radicals and functions in water treatment. *Accounts of Chemical Research*, 55, 286–297. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00269>
- Habibi-Yangjeh, A., Asadzadeh-Khaneghah, S., Feizpoor, S., & Rouhi, A. (2020). Review on heterogeneous photocatalytic disinfection of waterborne, airborne, and foodborne viruses: can we win against pathogenic viruses? *Journal of Colloid and Interface Science*, 580, 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.047>
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*, 2(4), 435–449. <https://doi.org/10.1002/biot.200700045>
- Hernández Madagán, A. (2007). *Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de Streptococcus thermophilus en la industria láctea* [Tesis doctoral]. Universidad de Oviedo.

- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*, 6(751), 1–9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10896.1>
- Hille, F., Deptula, P., Biere, N., Franz, C. M. A. P., & Vogensen, F. K. (2024). Bacteriophage and anti-phage mechanisms in lactic acid bacteria. In G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wrigth (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 138–166). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Høier, E., Janzen, T., Rattray, F., Sørensen, K., Børsting, M. W., Brockmann, E., & Johansen, E. (2010). The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In B. A. Law & A. Y. Tamime (Eds.), *Technology of Cheesemaking* (2nd ed., pp. 166–192). Wiley-Blackwell.
- Hom, L. W. (1972). Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 98(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1061/JSEDAI.0001370>
- Horie, Y., David, D. A., Taya, M., & Tone, S. (1996). Effects of light intensity and titanium dioxide concentration on photocatalytic sterilization rates of microbial cells. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 35(11), 3920–3926.
- Hoyles, L., McCartney, A. L., Neve, H., Gibson, G. R., Sanderson, J. D., Heller, K. J., & van Sinderen, D. (2014). Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Research in Microbiology*, 165(10), 803–812. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.006>
- Huang, S., Weng, C., Tzeng, J., Huang, Y., Anotai, J., & Yen, L. (2019). Kinetic study and performance comparison of TiO<sub>2</sub>-mediated visible-light-responsive photocatalysts for the inactivation of *Aspergillus niger*. *Science of the Total Environment*, 692, 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.329>
- Hudson, J. B., Sharma, M., & Vimalanathan, S. (2009). Development of a practical method for using ozone gas as a virus decontaminating agent. *Ozone: Science and Engineering*, 31(3), 216–223. <https://doi.org/10.1080/01919510902747969>
- Hynes, A. P., Labrie, S. J., & Moineau, S. (2016). Programming native CRISPR arrays for the generation of targeted immunity. *MBio*, 7(3), 1–4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00202-16>
- Ibhadon, A., & Fitzpatrick, P. (2013). Heterogeneous photocatalysis: recent advances and applications. *Catalysts*, 3(1), 189–218. <https://doi.org/10.3390/catal3010189>
- Ismail, E. A., Neve, H., Geis, A., & Heller, K. J. (2009). Characterization of temperate *Lactobacillus gasseri* phage Lgal and its impact as prophage on autolysis of its lysogenic host strains. *Current Microbiology*, 58(6), 648–653. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9384-0>
- Jacob, M. F., Quiberoni, A. del L., Alfano, O. M., Ballari, M. de los M., & Briggiler Marcó, M. (2023). Photocatalytic paint for phage inactivation in dairy industry: inactivation constants and efficiencies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(110617), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110617>
- Jolicoeur, A. P., Lemay, M.-L., Beaubien, E., Bélanger, J., Bergeron, C., Bourque-Leblanc, F., Doré, L., Dupuis, M.-È., Fleury, A., Garneau, J. E., Labrie, S. J., Labrie,

- S., Lacasse, G., Lamontagne-Drolet, M., Lessard-Hurtubise, R., Martel, B., Menasria, R., Morin-Pelchat, R., Pageau, G., ... Moineau, S. (2023). Longitudinal study of *Lactococcus* phages in a canadian cheese factory. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(5), e00421-23. <https://doi.org/10.1128/aem.00421-23>
- Jordan, P., Werth, H. M., Shelly, M., & Mark, H. (2001). Effects of relative humidity on the ultraviolet induced inactivation of airborne bacteria. *Aerosol Science and Technology*, 35, 728–740. <https://doi.org/10.1080/02786820152546770>
- Kakita Y, Obuchi E, Nakano K, Murata K, Kuroiwa A, Miake F, & Watanabe K. (2000). Photocatalytic inactivation of *Lactobacillus* PL-1 phages by a thin film of titania. *Biocontrol Science*, 5, 73–79.
- Kashige, N., Kakita, Y., Nakashima, Y., Miake, F., & Watanabe, K. (2001). Mechanism of the photocatalytic inactivation of *Lactobacillus casei* phage PL-1 by titania thin film. *Current Microbiology*, 42(3), 184–189. <https://doi.org/10.1007/s002840010201>
- Katal, R., Masudy-Panah, S., Tanhaei, M., Farahani, M. H. D. A., & Jiangyong, H. (2020). A review on the synthesis of the various types of anatase TiO<sub>2</sub> facets and their applications for photocatalysis. *Chemical Engineering Journal*, 384(123384), 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123384>
- Khaiboullina, S., Uppal, T., Dhabarde, N., Subramanian, V. R., & Verma, S. C. (2021). Inactivation of human coronavirus by titania nanoparticle coatings and UVC radiation: throwing light on SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(19), 1–15. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.3390/v13010019>
- Khan, F. M., Chen, J.-H., Zhang, R., & Liu, B. (2023). A comprehensive review of the applications of bacteriophage-derived endolysins for foodborne bacterial pathogens and food safety: recent advances, challenges, and future perspective. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1259210>
- Kim, D. K., Kim, S. J., & Kang, D. H. (2017). Inactivation modeling of human enteric virus surrogates, MS2, Qβ, and ΦX174, in water using UVC-LEDs, a novel disinfecting system. *Food Research International*, 91, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.042>
- Kneissl, M., Seong, T. Y., Han, J., & Amano, H. (2019). The emergence and prospects of deep-ultraviolet light-emitting diode technologies. In *Nature Photonics* (Vol. 13, pp. 233–244). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41566-019-0359-9>
- Kokkinos, P., Mantzavinos, D., & Venieri, D. (2020). Current trends in the application of nanomaterials for the removal of emerging micropollutants and pathogens from water. *Molecules*, 25(9), 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules25092016>
- Kokkinos, P., Venieri, D., & Mantzavinos, D. (2021). Advanced oxidation processes for water and wastewater viral disinfection. A systematic review. In *Food and Environmental Virology* (Vol. 13, pp. 283–302). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09481-1>
- Kong, J., Lu, Y., Ren, Y., Chen, Z., & Chen, M. (2021). The virus removal in UV irradiation, ozonation and chlorination. In *Water Cycle* (Vol. 2, pp. 23–31). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.watcyc.2021.05.001>

- Kosel, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Rački, N., Dreo, T., Ravnika, M., & Dular, M. (2017). Efficient inactivation of MS-2 virus in water by hydrodynamic cavitation. *Water Research*, 124, 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.077>
- Koutchma, T. N., Forney, L. J., & Moraru, C. I. (2009). *Ultraviolet light in food technology* (D.-W. Sun, Ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315112862>
- Krishnan, S., Zulkapli, N. S., Din, M. F. B. M., Majid, Z. A., Nasrullah, M., & Sairan, F. M. (2023). Photocatalytic degradation of methylene blue dye and fungi *Fusarium equiseti* using titanium dioxide recovered from drinking water treatment sludge. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(12), 10853–10863. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01990-0>
- Lambert, R. J. W., & Johnston, M. D. (2000). Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 907–913. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01060.x>
- Lavelle, K., Martinez, I., Neve, H., Lugli, G. A., Franz, C. M. A. P., Ventura, M., dal Bello, F., van Sinderen, D., & Mahony, J. (2018). Biodiversity of *Streptococcus thermophilus* phages in global dairy fermentations. *Viruses*, 10(10), 577. <https://doi.org/10.3390/v10100577>
- Lee, B. U. (2011). Life comes from the air: a short review on bioaerosol control. *Aerosol and Air Quality Research*, 11, 921–927. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2011.06.0081>
- Lee, J., Kim, J., Kim, S., Kim, T., Lee, K.-M., Cho, J., Choi, J.-W., Kim, J. Y., Jeong, Y. W., Park, H.-J., & Lee, C. (2025). Enhanced virucidal activity of facet-engineered Cu-doped TiO<sub>2</sub> nanorods under visible light illumination. *Water Research*, 268, 122579. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122579>
- Linton, R. H., Carter, W. H., Pierson, M. D., & Hackney, C. R. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 58(9), 946–954. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.9.946>
- Liu, L., Laghari, A. A., Meng, G., Chen, H., Wang, C., & Xue, Y. (2022). Photocatalytic disinfection of different airborne microorganisms by TiO<sub>2</sub>/MXene filler: inactivation efficiency, energy consumption and self-repair phenomenon. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107641>
- Liu, Y., Ma, D., Wang, X., & Fang, Y. (2022). Probiotics in the treatment of infantile colic: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrición Hospitalaria*, 39, 1135–1143. <https://doi.org/10.20960/nh.04011>
- Lloréns, R. D. (2024). *Uso de ozono como estrategia para la inactivación de bacteriofagos en la industria láctea* [Tesina de Grado]. Universidad Nacional del Litoral.
- Lopez, C. M., Rocchetti, G., Fontana, A., Lucini, L., & Rebecchi, A. (2022). Metabolomics and gene-metabolite networks reveal the potential of *Leuconostoc* and *Weissella* strains as starter cultures in the manufacturing of bread without baker's yeast. *Food Research International*, 162(112023), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112023>

- López-Malo, A., & Palou, E. (2005). *Ultraviolet light and food preservation* (G. V. Barbosa-Canovas, M. S. Tapia, & M. P. Cano, Eds.). CRC Press.
- Lu, S., Meng, G., Wang, C., & Chen, H. (2021). Photocatalytic inactivation of airborne bacteria in a polyurethane foam reactor loaded with a hybrid of MXene and anatase TiO<sub>2</sub> exposing {0 0 1} facets. *Chemical Engineering Journal*, 404, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126526>
- Luévano-Hipólito, E., & Martínez de la Cruz, A. (2016). Enhancement of photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> for NO photo-oxidation by optimized sol – gel synthesis. *Res Chem Intermed*, 42, 7065–7084. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2518-7>
- Luria, S. E., & Dulbecco, R. (1949). Genetic recombinations leading to production of active bacteriophage from ultraviolet inactivated bacteriophage particles. *Genetics*, 34, 93–125.
- Lytle, C. D., & Sagripanti, J.-L. (2005). Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *Journal of Virology*, 79(22), 14244–14252. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14244-14252.2005>
- Mackie, R. M. (2006). Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.008>
- Madera, C., Monjardín, C., & Suárez, J. E. (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7365–7371. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7365-7371.2004>
- Mahony, J., Mills, S., Ross, R. P., Neve, H., Coffey, A., & van Sinderen, D. (2019). Bacteriophage and anti-phage mechanisms in lactic acid bacteria. In G. Vinderola, S. Salminen, A. C. Ouwehand, & A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (5th ed., pp. 139–150). CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780429057465-10>
- Maillard, J. -Y., Beggs, T. S., Day, M. J., Hudson, R. A., & Russell, A. D. (1996a). Damage to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteriophage F116 DNA by biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(5), 540–544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03254.x>
- Maillard, J. -Y., Beggs, T. S., Day, M. J., Hudson, R. A., & Russell, A. D. (1996b). The effect of biocides on proteins of *Pseudomonas aeruginosa* PAO bacteriophage F116. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(3), 291–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03222.x>
- Maillard, J.-Y., Hann, A. C., Baubet, V., & Perrin, R. (1998). Efficacy and mechanisms of action of sodium hypochlorite on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 phage F116. *Journal of Applied Microbiology*, 85(6), 925–932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05255.x>
- Mangia, N. P., Murgia, M. A., Garau, G., Sanna, M. G., & Deiana, P. (2008). Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25(2), 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.09.009>

- Marette, A., Picard-Deland, É., & Fernandez, M. A. (2017). *Yogurt: roles in nutrition and impacts on health* (A. Marette, É. Picard-Deland, & M. A. Fernandez, Eds.; 1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b21826>
- Marjanovic, M., Giannakis, S., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., & Pulgarin, C. (2018). Effect of  $\mu\text{M}$  Fe addition, mild heat and solar UV on sulfate radical-mediated inactivation of bacteria, viruses, and micropollutant degradation in water. *Water Research*, 140, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.054>
- Marolt, T., Škapin, A. S., Bernard, J., Živec, P., & Gaberšček, M. (2011). Photocatalytic activity of anatase-containing facade coatings. *Surface and Coatings Technology*, 206(6), 1355–1361. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.08.053>
- Martha, S., Sahoo, P. C., & Parida, K. M. (2015). An overview on visible light responsive metal oxide based photocatalysts for hydrogen energy production. *RSC Advances*, 5, 61535–61553.
- Marugán, J., van Grieken, R., Sordo, C., & Cruz, C. (2008). Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 82, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.01.002>
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., & De Noni, I. (2017). Technological tools to include whey proteins in cheese: current status and perspectives. *Trends Food Sci. Technol.*, 64, 102–114.
- Mattle, M. J., & Kohn, T. (2012). Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. *Environmental Science and Technology*, 46(18), 10022–10030. <https://doi.org/10.1021/es302058v>
- Mattle, M. J., Vione, D., & Kohn, T. (2015). Conceptual model and experimental framework to determine the contributions of direct and indirect photoreactions to the solar disinfection of MS2, phiX174, and Adenovirus. *Environmental Science & Technology*, 49(1), 334–342. <https://doi.org/10.1021/es504764u>
- Mayer, B. K., Yang, Y., Gerrity, D. W., & Abbaszadegan, M. (2015). The impact of capsid proteins on virus removal and inactivation during water treatment processes. *Microbiology Insights*, 8(S2), 15–28. <https://doi.org/10.4137/mbi.s31441>
- McDevitt, J. J., Rudnick, S. N., & Radonovich, L. J. (2012). Aerosol susceptibility of influenza virus to UV-C light. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1666–1669. <https://doi.org/10.1128/AEM.06960-11>
- McDonnell, B., Mahony, J., Neve, H., Hanemaaijer, L., Noben, J.-P., Kouwen, T., & van Sinderen, D. (2016). Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5153–5165. <https://doi.org/10.1128/AEM.00835-16>
- Menzies, D., Pasztor, J., Rand, T., & Bourbeau, J. (1999). Germicidal ultraviolet irradiation in air conditioning systems: effect on office worker health and wellbeing: a pilot study. *Occupational and Environmental Medicine*, 56, 397–402. <https://doi.org/10.1136/oem.56.6.397>
- Mercanti, D. J., Carminati, D., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. del L. (2011). Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the

- fermentative dairy industry. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 503–510.
- Mercanti, D. J., Guglielmotti, D. M., Patrignani, F., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. (2012). Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application. *Food Microbiology*, 29(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.003>
- Michel, C., Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Franz, C. M. A. P., Hinrichs, J., & Atamer, Z. (2021). Orthogonal processing strategies to create “phage-free” whey – Membrane filtration followed by thermal or ultraviolet C treatment for the reduction of *Lactococcus lactis* bacteriophages. *International Dairy Journal*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105149>
- Milesi, M. M., McSweeney, P. L. H., & Hynes, E. R. (2008). Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 884–892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03813.x>
- Miller, F. A., Gil, M. M., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2009). Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: influence of strain and growth phase. *Food Control*, 20(12), 1151–1157. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.007>
- Mills, S., Griffin, C., O’Sullivan, O., Coffey, A., McAuliffe, O. E., Meijer, W. C., Serrano, L. M., & Ross, R. P. (2011). A new phage on the ‘Mozzarella’ block: bacteriophage 5093 shares a low level of homology with other *Streptococcus thermophilus* phages. *International Dairy Journal*, 21(12), 963–969. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.003>
- Milonova, S., Rudnick, S., McDevitt, J., & Nardell, E. (2016). Occupant UV exposure measurements for upper-room ultraviolet germicidal irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 88–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.009>
- Moineau, S., & Lévesque, C. (2005). Control of bacteriophages in industrial fermentations. *Bacteriophages: Biology and Applications*, 285–296. <https://doi.org/10.1201/9780203491751.ch10>
- Murphy, J., Mahony, J., Bonestroo, M., Nauta, A., & Van Sinderen, D. (2014). Impact of thermal and biocidal treatments on lactococcal 936-type phages. *International Dairy Journal*, 34(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.011>
- Murphy, J., Mahony, J., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2017). Bacteriophages infecting lactic acid bacteria. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition*, P.L.H. Mc Sweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter, D.W. Everett (Eds.) (Vol. 1, pp. 249–272). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00010-7>
- Naddeo, V., Uyguner-Demirel, C. S., Prado, M., Cesaro, A., Belgiorno, V., & Ballesteros, F. (2015). Enhanced ozonation of selected pharmaceutical compounds by sonolysis. *Environmental Technology*, 36(15), 1876–1883. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1014864>

- Nakano, R., Ishiguro, H., Yao, Y., Kajioka, J., Fujishima, A., Sunada, K., Minoshima, M., Hashimoto, K., & Kubota, Y. (2012). Photocatalytic inactivation of influenza virus by titanium dioxide thin film. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11, 1293–1298. <https://doi.org/10.1039/c2pp05414k>
- Neve, H., Berger, A., & Heller, K. J. (1995). A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 47, 193–207.
- Neve, H., Kemper, U., Geis, A., & Heller, K. J. (1994). Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophages in a dairy plant. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 46(2), 167–178.
- Neviani, E., Carminati, D., & Giraffa, G. (1992). Selection of some bacteriophage and lysozyme-resistant variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. *Journal of Dairy Science*, 75(4), 905–913. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77830-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77830-8)
- Nieuwstad, Th. J., & Havelaar, A. H. (1994). The kinetics of batch ultraviolet inactivation of bacteriophage-MS2 and microbiological calibration of an ultraviolet pilot-plant. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 29(9), 1993–2007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10934529409376160>
- Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2003). Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 350–357. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.350-357.2003>
- Ochoa-Velasco, C. E., Salcedo-Pedraza, C., Hernández-Carranza, P., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2018). Use of microbial models to evaluate the effect of UV-C light and trans-cinnamaldehyde on the native microbial load of grapefruit (*Citrus × paradisi*) juice. *International Journal of Food Microbiology*, 282, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.023>
- Ouwehand, A. C. (2024). Silage Fermentation. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 276–283). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Palmisano, L., & Sclafani, A. (1997). Thermodynamics and kinetics for heterogeneous photocatalytic processes. In M. Schiavello (Ed.), *Heterogeneous Photocatalysis* (pp. 109–132). Wiley.
- Pan, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y. J., Sanozky-Dawes, R., & Barrangou, R. (2020). Comparative analysis of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* isolated from human urogenital and gastrointestinal tracts. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03146>
- Pandis, P. K., Kalogirou, C., Kanellou, E., Vaitsis, C., Savvidou, M. G., Sourkouni, G., Zorpas, A. A., & Argiris, C. (2022). Key points of advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater, organic pollutants and pharmaceutical waste treatment: a mini review. In *ChemEngineering* (Vol. 6, Issue 8, pp. 1–22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/chemengineering6010008>

- Peleg, M., & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(5), 353–380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408699891274246>
- Philippe, C., Levesque, S., Dion, M. B., Tremblay, D. M., Horvath, P., Lüth, N., Cambillau, C., Franz, C., Neve, H., Fremaux, C., Heller, K. J., & Moineau, S. (2020). Novel genus of phages infecting *Streptococcus thermophilus*: genomic and morphological characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(13). <https://doi.org/10.1128/AEM.00227-20>
- Pironti, C., Moccia, G., Motta, O., Boccia, G., Franci, G., Santoro, E., Capunzo, M., & De Caro, F. (2021). The influence of microclimate conditions on ozone disinfection efficacy in working places. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 64687–64692. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15457-2>/Published
- Poormohammadi, A., Bashirian, S., Rahmani, A. R., Azarian, G., & Mehri, F. (2021). Are photocatalytic processes effective for removal of airborne viruses from indoor air? A narrative review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 43007–43020. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14836-z>
- Pujato, S. A., Guglielmotti, D. M., Ackermann, H. W., Patrignani, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. (2014). *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.012>
- Pujato, S. A., Guglielmotti, D. M., Martínez-García, M., Quiberoni, A., & Mojica, F. J. M. (2017). *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteriophages: genomics and cross-species host ranges. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.009>
- Pujato, S. A., Quiberoni, A., & Mercanti, D. J. (2019). Bacteriophages on dairy foods. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 14–30. <https://doi.org/10.1111/jam.14062>
- Pujato, S. A., Galliani, V., Irazoqui, J. M., Amadío, A., Quiberoni, A., & Mercanti, D. (2021). Analysis of CRISPR systems of types II-A, I-E and I-C in strains of *Lactocaseibacillus*. *International Dairy Journal*, 118, 105027. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105027>
- Qiao, Z., Ye, Y., Chang, P. H., Thirunarayanan, D., & Wigginton, K. R. (2018). Nucleic acid photolysis by UV254 and the impact of virus encapsidation. *Environmental Science and Technology*, 52(18), 10408–10415. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02308>
- Quiberoni, A. del L., & Reinheimer, J. (2012). *Bacteriophages in dairy processing*. Nova Science Publishers, Inc.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M., & Reinheimer, J. A. (2003). Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 51–62. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00394-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00394-X)

- Quiberoni, A., Stiefel, J. I., & Reinheimer, J. A. (2000). Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 1059–1065. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01214.x>
- Quilodr  n-Vega, S., Albarrac  n, L., Mansilla, F., Arce, L., Zhou, B., Islam, M. A., Tomokiyo, M., Al Kassaa, I., Suda, Y., Kitazawa, H., & Villena, J. (2020). Functional and genomic characterization of *Ligilactobacillus salivarius* TUCO-L2 isolated from lama glama milk: a promising immunobiotic strain to combat infections. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.608752>
- Rai, A. K., Sanjukta, S., & Jeyaram, K. (2017). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2789–2800. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1068736>
- Reddy, P. V. L., Kavitha, B., Kumar Reddy, P. A., & Kim, K. H. (2017). TiO<sub>2</sub>-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: a review. *Environmental Research*, 154(December 2016), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.018>
- Reed, N. G. (2010). The history of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. *Public Health Reports*, 125, 15–27.
- Reinheimer, J. A., Binetti, A. G., Quiberoni, A. del L., Ballo, N. B., Rubiolo, A. C., & Giraffa, G. (1997). Natural milk cultures for the production of Argentinian cheeses. *Journal of Food Protection*, 60(1), 59–63.
- Reinheimer, J. A., Suarez, V. B., Ballo, N. B., & Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection*, 58(7), 796–799.
- Ribeiro Borges, B. M., Fujimoto, T. M., Gvozdenovic Medina Bricio, B., Rochetto Doubek, L. U., & Tomaz, E. (2020). Gas-phase aromatic compounds degradation by a partially TiO<sub>2</sub> coated photoreactor assisted with ozone. *Process Safety and Environmental Protection*, 135, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.037>
- Richter,   ., Janczuk-Richter, M., Niedzi  lka-J  nsson, J., Paczesny, J., & Ho  yst, R. (2018). Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection. *Drug Discovery Today*, 23(2), 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.007>
- Rochetto, U. L., & Tomaz, E. (2015). Degradation of volatile organic compounds in the gas phase by heterogeneous photocatalysis with TiO<sub>2</sub>/UV. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 65, 810–817. <https://doi.org/10.1080/10962247.2015.1020117>
- Rohde, C. L., Bartolini, V., & Jones, N. (2009). The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium difficile* – associated diarrhea. *Nutrition in Clinical Practice*, 24(1), 33–40. <https://doi.org/10.1177/0884533608329297>
- Saborido, R., & Leis, R. (2018). El yogur y recomendaciones diet  ticas en la intolerancia a la lactosa. *Nutrici  n Hospitalaria*, 35, 45–48. <https://doi.org/10.20960/nh.2287>

- Sagir, M., Tahir, M. B., Waheed, U., & Qasim, M. H. (2021). Role of photocatalysts in air purification. In *Encyclopedia of Smart Materials* (pp. 597–603). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815732-9.00003-6>
- Salazar, N., López, P., Garrido, P., Moran, J., Cabello, E., Gueimonde, M., Suárez, A., González, C., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Immune modulating capability of two exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains in a Wistar rat model. *BioMed Research International*, 106290, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/106290>
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18, 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Salvadores, F. (2017). *Purificación de aire a través de pinturas fotocatalíticas*. [Tesis de Posgrado]. Universidad Nacional del Litoral.
- Salvadores, F., Alfano, O. M., & Ballari, M. M. (2020a). Assessment of the indoor air purification by photocatalytic paints. *Latin American Applied Research*, 50(2), 71–76. <https://doi.org/10.52292/j.laar.2020.352>
- Salvadores, F., Alfano, O. M., & Ballari, M. M. (2020b). Kinetic study of air treatment by photocatalytic paints under indoor radiation source: Influence of ambient conditions and photocatalyst content. *Applied Catalysis B: Environmental*, 268(February), 118694. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118694>
- Salvadores, F., Minen, R. I., Carballada, J., Alfano, O. M., & Ballari, M. M. (2016). Kinetic study of acetaldehyde degradation applying visible light photocatalysis. *Chemical Engineering and Technology*, 39(1), 166–174. <https://doi.org/10.1002/ceat.201500507>
- Salvadores, F., Reli, M., Alfano, O. M., Kočí, K., & Ballari, M. de los M. (2020). Efficiencies evaluation of photocatalytic paints under indoor and outdoor air conditions. *Frontiers in Chemistry*, 8(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.551710>
- Samarghandi, M. R., Babaei, S. A., Ahmadian, M., Asgari, G., Shahna, F. G., & Poormohammadi, A. (2014). Performance catalytic ozonation over the carbosieve in the removal of toluene from waste air stream. *Journal of Research in Health Sciences*, 14(3), 227–232. [www.umsha.ac.ir/jrhs](http://www.umsha.ac.ir/jrhs)
- Samson, J. E., & Moineau, S. (2013). Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 347–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182541>
- Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J., & Atamer, Z. (2017). Reduction of *Lactococcus lactis* phage contamination in whey by means of membrane filtration: Impact of phage morphology and of bacterial host cells functioning as “phage fishing tool.” *International Dairy Journal*, 68, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.01.006>

- San Martín, M. F., Sepúlveda, D. R., Altunakar, B., Góngora-Nieto, M. M., Swanson, B. G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). Evaluation of selected mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1271–1279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.011>
- Savaiano, D. A. (2014). Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 1251S-1255S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.073023>
- Schiavano, G. F., De Santi, M., Sisti, M., Amagliani, G., & Brandi, G. (2018). Disinfection of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* in drinking tap water using ultraviolet germicidal irradiation. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 39(24), 3221–3227. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1375028>
- Schmid, S., Bevilacqua, C., & Crutz-Le Coq, A.-M. (2012). Alternative sigma factor  $\sigma^H$  activates competence gene expression in *Lactobacillus sakei*. *BMC Microbiology*, 12(32), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-32>
- Schreck Bird, A., Gregory, P. J., Jalloh, M. A., Risoldi Cochrane, Z., & Hein, D. J. (2017). Probiotics for the treatment of infantile colic: a systematic review. *Journal of Pharmacy Practice*, 30(3), 366–374. <https://doi.org/10.1177/0897190016634516>
- Schubert, C., Biere, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Neve, H., Franz, C. M. A. P., Hinrichs, J., & Atamer, Z. (2023). Does the high biodiversity of lactococcal bacteriophages allow predictions about their different UV-C susceptibilities? *International Journal of Food Microbiology*, 401. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110274>
- Schubert, C., Hock, T., Hinrichs, J., & Atamer, Z. (2023). From lab to technical scale: ultraviolet C treatment for the reduction of *Lactococcus lactis* bacteriophage P008 in whey. *International Dairy Journal*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105785>
- Sengillo, J. D., Kunkler, A. L., Medert, C., Fowler, B., Shoji, M., Pirakitikulr, N., Patel, N., Yannuzzi, N. A., Verkade, A. J., Miller, D., Sliney, D. H., Parel, J. M., & Amescua, G. (2020). UV-photokeratitis associated with germicidal lamps purchased during the COVID-19 pandemic. *Ocular Immunology and Inflammation*, 29(1), 1–5. <https://doi.org/10.1080/09273948.2020.1834587>
- Shabat-Hadas, E., Mamane, H., & Gitis, V. (2017). Rhodamine B in dissolved and nano-bound forms: indicators for light-based advanced oxidation processes. *Chemosphere*, 184, 1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.076>
- Sholtes, K. A., Lowe, K., Walters, G. W., Sobsey, M. D., Linden, K. G., & Casanova, L. M. (2016). Comparison of ultraviolet light-emitting diodes and low-pressure mercury-arc lamps for disinfection of water. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 37(17), 2183–2188. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1144798>
- Siegel, R., & Howell, J. R. (2002). *Thermal radiation heat transfer* (7th ed., Vol. 1). Taylor and Francis.
- Sieuwert, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics

- approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4997–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Smith, D. L., Chang, C.-Y., & Young, R. Y. (2018). The  $\lambda$  holin accumulates beyond the lethal triggering concentration under hyperexpression conditions. *Gene Expression*, 7(1), 39–52.
- Son, S., Oh, J.-D., Lee, S. H., Shin, D., & Kim, Y. (2020). Comparative genomics of canine *Lactobacillus reuteri* reveals adaptation to a shared environment with humans. *Genes & Genomics*, 42(9), 1107–1116. <https://doi.org/10.1007/s13258-020-00978-w>
- Song, K., Mohseni, M., & Taghipour, F. (2016). Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: a review. *Water Research*, 94, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.003>
- Song, K., Mohseni, M., & Taghipour, F. (2019). Mechanisms investigation on bacterial inactivation through combinations of UV wavelengths. *Water Research*, 163, 114875. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114875>
- Sottani, C., Favorido Barraza, G., Frigerio, F., Corica, G., Robustelli della Cuna, F. S., Cottica, D., & Grignani, E. (2023). Effectiveness of a combined UV-C and ozone treatment in reducing healthcare-associated infections in hospital facilities. *Journal of Hospital Infection*, 139, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.06.029>
- Suárez, V., Moineau, S., Reinheimer, J., & Quiberoni, A. (2008). Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03556.x>
- Suárez, V., Zago, M., Quiberoni, A., Carminati, D., Giraffa, G., & Reinheimer, J. (2008). Lysogeny in *Lactobacillus delbrueckii* strains and characterization of two new temperate prolate-headed bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5), 1402–1411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03876.x>
- Sun, J., Marwah, G., Westgarth, M., Buys, N., Ellwood, D., & Gray, P. H. (2017). Effects of probiotics on necrotizing enterocolitis, sepsis, intraventricular hemorrhage, mortality, length of hospital stay, and weight gain in very preterm infants: a meta-analysis. *Advances in Nutrition*, 8, 749–763. <https://doi.org/10.3945/an.116.014605>
- Sun, W., Jing, Z., Zhao, Z., Yin, R., Santoro, D., Mao, T., & Lu, Z. (2023). Dose-response behavior of pathogens and surrogate microorganisms across the ultraviolet-C spectrum: inactivation efficiencies, action spectra, and mechanisms. *Environmental Science and Technology*, 57, 10891–10900. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00518>
- Svensson, U., & Christiansson, A. (1991). Methods for phage monitoring. *FIL-IDF Bull*, 263, 29–39.
- Tavares, R. S. N., Adamoski, D., Girasole, A., Lima, E. N., da Silva Justo-Junior, A., Domingues, R., Caznok Silveira, A. C., Marques, R. E., de Carvalho, M., Ambrosio, A. L. B., Leme, A. F. P., & Gomes Dias, S. M. (2023). Different biological effects of exposure to far-UVC (222 nm) and near-UVC (254 nm) irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 243(112713), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2023.112713>

- Thomas, J. P., Raine, T., Reddy, S., & Belteki, G. (2017). Probiotics for the prevention of necrotising enterocolitis in very low-birth-weight infants: a meta-analysis and systematic review. *Acta Paediatrica*, 106, 1729–1741. <https://doi.org/10.1111/apa.13902>
- Tian, D., Zhou, H., Zhang, H., Zhou, P., You, J., Yao, G., Pan, Z., Liu, Y., & Lai, B. (2022). Heterogeneous photocatalyst-driven persulfate activation process under visible light irradiation: from basic catalyst design principles to novel enhancement strategies. *Chemical Engineering Journal*, 428, 131166. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131166>
- Tian, F.-X., Ye, W.-K., Xu, B., Hu, X.-J., Ma, S.-X., Lai, F., Gao, Y.-Q., Xing, H.-B., Xia, W.-H., & Wang, B. (2020). Comparison of UV-induced AOPs (UV/Cl<sub>2</sub>, UV/NHCl<sub>2</sub>, UV/ClO<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the degradation of iopamidol: kinetics, energy requirements and DBPs-related toxicity in sequential disinfection processes. *Chemical Engineering Journal*, 398, 125570. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125570>
- Tobaldi, D. M., Seabra, M. P., Otero-Irurueta, Gonzalo., De Miguel, Y., Ball, R. J., Singh, M. K., Pullar, R. C., & Labrincha, J. A. (2015). Quantitative XRD characterisation and gas-phase photocatalytic activity testing for visible-light (indoor applications) of KRONOClean 7000®. *RSC Advances*, 5(124), 102911–102918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/c5ra22816f>
- Tseng, C. C., & Li, C. S. (2005). Inactivation of virus-containing aerosols by ultraviolet germicidal irradiation. *Aerosol Science and Technology*, 39(12), 1136–1142. <https://doi.org/10.1080/02786820500428575>
- Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., van Zyl, L. J., Aziz, R. K., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., Kropinski, A. M., Barylski, J., Brister, J. R., Chanisvili, N., Edwards, R. A., Enault, F., Gillis, A., Knezevic, P., Krupovic, M., ... Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(74). <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05694-2>
- Urbańska, M., Gieruszczak-Białek, D., Szymański, H., & Szajewska, H. (2016). Effectiveness of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the prevention of nosocomial diarrhea in children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 35, 142–145. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000948>
- Vaitsis, C., Mechili, M., Argiris, N., Kanellou, E., Pandis, P. K., Sourkouni, G., Zorpas, A., & Argiris, C. (2020). Ultrasound-assisted preparation methods of nanoparticles for energy-related applications. In M. Sen (Ed.), *Nanotechnology and the Environment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92802>
- Vazquez-Bravo, B., Gonçalves, K., Shisler, J. L., & Mariñas, B. J. (2018). Adenovirus replication cycle disruption from exposure to polychromatic ultraviolet irradiation. *Environmental Science & Technology*, 52(6), 3652–3659. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06082>
- Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G. M., Veillette, M., Massé, D., Lindsley, W. G., Moineau, S., & Duchaine, C. (2011). Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 491–497. <https://doi.org/10.1128/AEM.01391-10>

- Vinderola, C. G., Bailo, N., & Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97–102. [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)
- Vinderola, C. G., Mocchiutti, P., & Reinheimer, J. A. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85(4), 721–729. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74129-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74129-5)
- Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905–1911. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75065-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75065-X)
- Vitzilaiou, E., Liang, Y., Castro-Mejía, J. L., Franz, C. M. A. P., Neve, H., Vogensen, F. K., & Knøchel, S. (2022). UV tolerance of *Lactococcus lactis* 936-type phages: impact of wavelength, matrix, and pH. *International Journal of Food Microbiology*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109824>
- von Wright, A., Axelsson, L., & Morelli, L. (2024). Lactic acid bacteria: an introduction to taxonomy, physiology and molecular biology. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (6th ed., pp. 3–27). CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Wagner, N., Samtlebe, M., Franz, C. M. A. P., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J., & Atamer, Z. (2017). Dairy bacteriophages isolated from whey powder: thermal inactivation and kinetic characterisation. *International Dairy Journal*, 68, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.017>
- Walpole, R. E., Myers, R. H., Myers, S. L., & Ye, K. (2012). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias* (L. E. Pineda Ayala, Trans.; 9th ed.). Pearson.
- Wan, Y., Xie, P., Wang, Z., Ding, J., Wang, J., Wang, S., & Wiesner, M. R. (2019). Comparative study on the pretreatment of algae-laden water by UV/persulfate, UV/chlorine, and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: variation of characteristics and alleviation of ultrafiltration membrane fouling. *Water Research*, 158, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.034>
- Wang, H., Meng, X., Xing, S., Guo, B., Chen, Y., & Pan, Y.-Q. (2023). Probiotics to prevent necrotizing enterocolitis and reduce mortality in neonates: a meta-analysis. *Medicine*, 102, e32932. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000032932>
- Wang, J., & Wang, S. (2020). Reactive species in advanced oxidation processes: formation, identification and reaction mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 401, 126158. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126158>
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 133–139.
- Wang, X., Song, J., Zhao, J., Wang, Z., & Wang, X. (2019). In-situ active formation of carbides coated with NP TiO<sub>2</sub> nanoparticles for efficient adsorption-photocatalytic inactivation of harmful algae in eutrophic water. *Chemosphere*, 228, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.120>

- Weckx, S., Allemeersch, J., Van der Meulen, R., Vrancken, G., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., & De Vuyst, L. (2009). Development and validation of a species-independent functional gene microarray that targets lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6488–6495. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-09>
- Wen, Y., Li, J., Long, Q., Yue, C., He, B., & Tang, X. (2020). The efficacy and safety of probiotics for patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis based on seventeen randomized controlled trials. *International Journal of Surgery*, 79, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2020.04.063>
- Wigginton, K. R., & Kohn, T. (2012). Virus disinfection mechanisms: The role of virus composition, structure, and function. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 2, pp. 84–89). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.003>
- Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Sigstam, T., Bosshard, F., & Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental Science Technology*, 21(46), 12069–12078.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. E., & Sheard, M. A. (1999). A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 46(1), 45–55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00172-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00172-X)
- Yang, Z., Jiang, W., Zhang, Y., & Lim, T. M. (2015). Inactivation of dinoflagellate *Scripsiella trochoidea* in synthetic ballast water by advanced oxidation processes. *Environmental Technology*, 36(6), 750–759. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.960478>
- Yu, K., Lee, G. W., Lin, S., & Huang, C. P. (2008). Removal of bioaerosols by the combination of a photocatalytic filter and negative air ions. *Journal of Aerosol Science*, 39, 377–392. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2007.12.005>
- Zaburlin, D., Mercanti, D. J., & Quiberoni, A. del L. (2017). A fast PCR-based method for the characterization of prophage profiles in strains of the *Lactobacillus casei* group. *Journal of Virological Methods*, 248, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.07.016>
- Zacarías, S. M., Manassero, A., Pirola, S., Alfano, O. M., & Satuf, M. L. (2021). Design and performance evaluation of a photocatalytic reactor for indoor air disinfection. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 23859–23867. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11663-6/Published>
- Zacarías, S. M., Marchetti, S., Alfano, O. M., & Ballari, M. de los M. (2018). Photocatalytic paint for fungi growth control under different environmental conditions and irradiation sources. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 364, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.05.034>
- Zacarías, S. M., Satuf, M. L., Vaccari, M. C., & Alfano, O. M. (2012). Efficiency evaluation of different TiO<sub>2</sub> coatings on the photocatalytic inactivation of airborne bacterial spores. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(42), 13599–13608. <https://doi.org/10.1021/ie3009956>

- Zacarías, S. M., Satuf, M. L., Vaccari, M. C., & Alfano, O. M. (2015). Photocatalytic inactivation of bacterial spores using TiO<sub>2</sub> films with silver deposits. *Chemical Engineering Journal*, 266, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.12.074>
- Zhang, Z., Niu, H., Qu, Q., Guo, D., Wan, X., Yang, Q., Mo, Z., Tan, S., Xiang, Q., Tian, X., Yang, H., & Liu, Z. (2025). Advancements in *Lactiplantibacillus plantarum*: probiotic characteristics, gene editing technologies and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65(29), 6623–6644. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2448562>
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A. V., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Imhann, F., Brandsma, E., Jankipersadsing, S. A., Joossens, M., Cenit, M. C., Deelen, P., Swertz, M. A., Weersma, R. K., ... Fu, J. (2016). Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*, 352(6285), 565–569. <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>
- Zhou, X., Yang, B., Stanton, C., Ross, R. P., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2020). Comparative analysis of *Lactobacillus gasseri* from Chinese subjects reveals a new species-level taxa. *BMC Genomics*, 21(119), 2–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6527-y>

## Otros recursos

<https://www.lighting.philips.com.ar/productos/uv-c>. Último acceso: 18/12/2025.

<https://ecoviox.com>. Último acceso: 18/12/2025.

<https://www.fiberli.com.tr/Upload/Urun/Dokuman/Fiberli-MOMI100%28EN%29.pdf>. Último acceso: 18/12/2025.