



INACTIVACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* AEROTRANSPORTADA EN AMBIENTES INTERIORES MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

Rosenberg, Nadia¹

¹Facultad de Ingeniería y Cs. Hídricas UNL e Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química

Director/a: Labas, Marisol

Codirector/a: Flores, Marina

Área: Ingeniería

INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos aerotransportados se ha convertido en las últimas décadas en un tema de interés, debido a su impacto negativo en la salud humana. Estos microorganismos pueden fluir libremente junto con el aire y, en consecuencia, extenderse en un área amplia en un corto período de tiempo, lo que favorece la propagación de enfermedades, especialmente en los ambientes interiores. Las tecnologías típicas para descontaminación de aire interior incluyen métodos físicos, tales como la ventilación, la adsorción y la filtración (Boyjoo y col., 2017). La tendencia actual es desarrollar otros métodos de descontaminación, de fácil implementación y amigables con el ambiente. Dentro de estas tecnologías novedosas se encuentra la fotocatalisis heterogénea: este proceso se presenta como una alternativa viable debido a que es efectivo a bajas concentraciones (ppb o ppm), que son las típicas en el aire interior (Boyjooy col., 2017). La fotocatalisis heterogénea se basa en la irradiación con luz UV de suspensiones de óxidos semiconductores (principalmente dióxido de titanio) en presencia de las especies contaminantes que se quiere degradar. Este proceso ha demostrado ser capaz de eliminar un amplio rango de microorganismos (bacterias, hongos filamentosos y unicelulares). El mecanismo de inactivación implica la degradación de la pared celular y de la membrana plasmática mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente oxhidrilos ($\bullet\text{OH}$), lo que culmina con la lisis del microorganismo. Para que la fotocatalisis sea efectiva, es necesario que la superficie del catalizador se encuentre adecuadamente irradiada. Para esto puede utilizarse un material soporte, de forma que permita la retención de los microorganismos aerotransportados y facilite así el contacto con el fotocatalizador y la radiación UV. Si como material se usan superficies filtrantes, es posible realizar en forma conjunta tanto filtración como fotocatalisis. Este trabajo es una primera aproximación a un estudio cinético de un proceso conjunto de filtración y fotocatalisis, a fin de realizar el diseño de un dispositivo de aplicación práctica.

OBJETIVOS

El objetivo principal es el estudio de procesos de inactivación de *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizando filtros de aire absolutos con un fotocatalizador (TiO_2) soportado en combinación

1

Título del proyecto: Desarrollo de nuevos dispositivos y nuevas estrategias para estudios cinéticos en la descontaminación de aire y agua mediante procesos avanzados de oxidación.

Instrumento: CAID PIC 50420150100012LI

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director/a: Rodolfo Brandi

con radiación UVA. Los objetivos particulares incluyen: 1) comparar la inactivación de *E. coli* lograda mediante fotocatalisis heterogénea y fotólisis; 2) determinar el efecto de la intensidad de radiación en ambos procesos y 3) proponer un esquema de inactivación para el proceso fotocatalítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y siembra de los filtros

Se utilizó dióxido de titanio Aeroxide P25 (Sigma-Aldrich) como catalizador ($S_e=35-65$ m^2/g , $PS=21$ nm) y filtros absolutos para aire (Casiba) como soporte del mismo. La deposición del catalizador sobre la superficie de los filtros se realizó mediante la técnica de inmersión (*dip coating*), desarrollada por Temporetti y col. (2015). Los filtros fueron sumergidos durante un minuto en una solución de 10 gr de TiO_2/L de agua destilada. El secado se realizó en estufa a $60^\circ C$ durante 1 hora. Por su parte, el microorganismo utilizado fue *Escherichia coli* ATCC 8739, un bacilo *gram* negativo. Para cada ensayo experimental se sembró una muestra de *E. coli* en 150 ml de caldo de cultivo (Biokar), que se incubó en estufa a $37^\circ C$ durante 24 horas. Luego, se realizaron cinco diluciones seriadas en agua de peptona (Biokar). Posteriormente, se realizó la dispersión de 0,1 ml del microorganismo sobre los filtros.

Ensayo experimental

Para los ensayos experimentales se utilizó un fotorreactor simple. Este posee un sistema emisor en su parte superior, que consiste en cuatro lámparas UVA actínicas (Sylvania F15W T12, 15 Watts) con $\lambda_{max}= 365$ nm que aportan un flujo de radiación incidente prácticamente uniforme sobre una bandeja que se encuentra en la base. En cada ensayo, los filtros con el catalizador depositado y el microorganismo disperso en su superficie fueron distribuidos sobre la bandeja e irradiados durante media hora, retirándose a distintos tiempos. Esto permitió seguir la inactivación bacteriana mediante fotocatalisis a lo largo del tiempo. También se irradiaron filtros con el microorganismo disperso pero sin catalizador, a fin de evaluar el efecto de la fotólisis.

Los filtros retirados fueron recubiertos con una fina película de EMB (Biokar) y colocados en estufa a $37^\circ C$ durante 24/48 horas. Finalmente, se contabilizaron las colonias en la superficie de los filtros.

Para determinar el efecto de la intensidad de radiación en los procesos se realizaron 4 experiencias con diferente intensidad de radiación (Tabla 1), que fue medida utilizando un radiómetro (Ocean Optics USB 2000+). Para ello se utilizó una menor cantidad de lámparas y mallas metálicas que disminuyan el paso de la luz UVA.

Tabla 1. Condiciones experimentales

	4L	3L	4L + 1M	4L + 2M
Intensidad de radiación [W/m ²]	10.84	8.68	4.26	1.66
Condición experimental	4 lámparas	3 lámparas	4 lámparas y 1 malla metálica	4 lámparas y 2 mallas metálicas

Para realizar el análisis de los resultados se graficaron las curvas de inactivación de *E. coli* con respecto al tiempo, lo que permitió comparar la eficiencia de los procesos.

RESULTADOS

En la figura 1 se presentan los resultados de los ensayos de inactivación en filtros de aire absolutos mediante fotocatalisis heterogénea (UVA + TiO₂) y fotólisis (UVA).

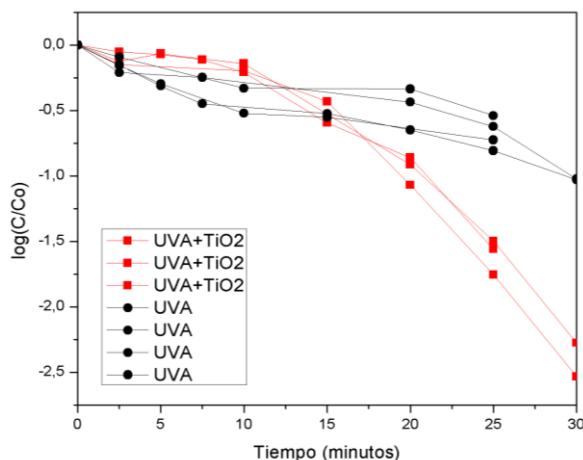


Figura 1. Inactivación de *E. coli* mediante UVA+TiO₂ (■) y UVA (●). 4 lámparas.

Las curvas correspondientes a los ensayos de UVA+TiO₂ muestran que, durante los primeros 10 minutos, la inactivación es lenta, lo cual se observa en la gráfica como un 'hombro'. Esto se corresponde con un período de inducción, en el que las ROS generadas comienzan a atacar la membrana plasmática de las bacterias, pero no es suficiente como para causar un daño grave en la parte externa de la misma (Benabbou y col., 2007). Los microorganismos ofrecen resistencia a este ataque mediante los mecanismos de reparación automáticos, que implican la generación de enzimas reparadoras. Al final del período de inducción, los ataques repetidos en la membrana de *E. coli*

pueden dar como resultado una perforación, que implica pérdida de permeabilidad (Benabbou y col., 2007). Esto acelera el proceso de inactivación bacteriana: luego de 10 minutos de irradiación, se puede observar que hay un cambio de pendiente en la gráfica y la tasa de inactivación se incrementa notoriamente. Por lo tanto, se puede decir que a los 10 minutos se supera el umbral de daño de la bacteria, llegando al punto en el que ya no puede recuperarse. Los daños en la pared celular se incrementan, culminando con la lisis bacteriana.

El comportamiento previamente descrito puede ser explicado mediante un esquema de reacción sencillo (1):



B_a representa las bacterias activas ('sanas'), B_{inj} a aquellas que están injuriadas pero todavía son viables y B_l a las bacterias lisadas ('muertas'). La primera etapa, que involucra el paso de bacterias viables a injuriadas, se corresponde con la etapa lenta de la inactivación. En esta, no se observa una disminución significativa del número de colonias pues tanto las bacterias activas y como las injuriadas se pueden contabilizar pasado el tiempo de incubación: crecen de la misma forma en EMB. La segunda etapa se corresponde con la etapa rápida, en la que disminuye en gran medida el número de colonias contabilizadas luego de la incubación, debido a que las bacterias pasan de injuriadas a lisadas. A t = 30 min el número de colonias sobrevivientes es despreciable.

En lo que respecta a las curvas de fotólisis, no se observa un cambio de pendiente significativo: la tasa de inactivación tiene poca variación. Esto puede deberse a que los ataques de las especies oxidativas dañan una poca cantidad de bacterias a cada paso de

tiempo, pues estas se resisten: los mecanismos de defensa y recuperación de *E. coli* son más efectivos cuando solo se utiliza UVA. Por lo tanto, se obtiene un porcentaje de inactivación menor. Puede proponerse que, durante la fotólisis, no hay etapas tan fácilmente diferenciables como en la fotocatalisis: las bacterias pasan de activas a injuriadas y luego a lisadas a una tasa menor y en forma relativamente constante. Además, se pueden contabilizar colonias al final del ensayo experimental ($t=30$). Por otro lado, se investigó la influencia de la intensidad de la luz en el proceso de inactivación bacteriana. Estos ensayos mostraron que, en todos los casos, mediante la fotocatalisis se logra una mayor inactivación de *E. coli* que por medio de la fotólisis.

Tabla 2. Porcentaje de inactivación logrado en cada tipo de ensayo

	Inactivación [%]			
	4L	3L	4L + 1M	4L + 2M
UVA+TiO ₂	99.587	96.373	92.550	91.361
UVA	90.536	86.827	84.617	85.872

Se observa que en los ensayos con menor intensidad de radiación la fotocatalisis es significativamente menos efectiva. La menor inactivación lograda en estos ensayos puede explicarse mediante una serie de hipótesis. En primer lugar, la eficiencia cuántica para la generación de radicales en la superficie del TiO₂ disminuye al disminuir los niveles de radiación, por lo que la fotocatalisis disminuye su eficiencia. En segundo lugar, la radiación está implicada en forma directa en las lesiones que sufren las células en el proceso. Por lo tanto, si disminuye la intensidad de radiación, disminuyen los daños a las bacterias. Por otro lado, Benabbou y col. (2007) han propuesto que aquellas partículas de TiO₂ que no son activadas debido a la disminución de la intensidad de radiación pueden proteger a las bacterias presentes en los filtros mediante un efecto 'pantalla'.

CONCLUSIONES

La fotocatalisis heterogénea es un proceso altamente efectivo en la inactivación de *E. coli*, lográndose un porcentaje de inactivación mayor (99.587) que cuando solo se utiliza fotólisis (90.536). Esta superioridad se mantiene incluso cuando disminuye la intensidad de radiación en más de un 80%. Debido a esto, es un proceso factible de ser utilizado en la descontaminación biológica del aire interior. Actualmente, se está realizando el estudio cinético preliminar que permita obtener los parámetros cinéticos para poder desarrollar un dispositivo a mayor escala para la descontaminación de aire de espacios interiores.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Boyjoo, Y., Hongqi, S., Liu, J., Pareek, V., Wang, S.,** 2017. A review on photocatalysis for air treatment: From catalyst development to reactor design. *Chemical Engineering Journal*, 310, 537-559.
- Benabbou, A.K., Derriche, Z., Felix, C., Lejeune, P., Guillard, C.,** 2007. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 76, 257-263.
- Temporetti, A.; Labas, M.D., Brandi, R.J.,** 2015. Fotocatalisis heterogénea para la desinfección de aire en ambientes interiores. Libro de resúmenes del XIX Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL, Santa Fe, Argentina.