



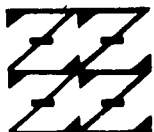
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FES ZARAGOZA, CAMPUS II

APLICACION DE LA RADIACION GAMMA EN LA ELIMINACION DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN PAPEL ANTIGUO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
GEORGINA RUIZ VELASCO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO MESSANO SAE
DE NUESTRA DELEGACION

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESUS A. ARENAS ALATORRE
ASESOR DE TESIS: Q.B.P. MA. LUISA F. DELGADO BRISEÑO

MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION DISCONTINUA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de llevar a cabo una de mis metas: estudiar una carrera profesional.

A mi Director de tesis, Dr. Jesús A. Arenas Alatorre, por permitirme participar en este proyecto, gracias por todo el apoyo brindado, por los consejos y observaciones que le dieron calidad a este trabajo y por su gran amistad.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por la infraestructura que apoyo el trabajo experimental. A Héctor Rojas, Leticia Carapia, Antonio Alva, y en especial al M. en C. Demetrio Mendoza y al Téc. Victor Hernández, gracias por su colaboración y por el tiempo dedicado a esta tesis.

A mi Asesora de tesis y amiga de siempre, Q.B.P. María Luisa Delgado Briseño; y como tengo muchas cosas que mencionarle y no quiero que se me pase alguna "simple y sencillamente" gracias por todo.

A TODOS MIL GRACIAS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

A Dios,... porque la Fé mueve montañas.

A mis padres, José Manuel y Adriana, por todo el apoyo y la paciencia que me tuvieron.

A mi más grande motivación que me dió la fuerza para enfrentar los retos y lograr el éxito, al amor de mi vida. Rafael gracias por estar siempre a mi lado, sin ti no lo hubiera logrado.

A mi familia, Rocío, Luz Adriana y Juan Manuel, mis queridos hermanos, por no dejar de creer en mí. Mis sobrinos Diego, Tania, Thalía, Carlos, Montse y Adrianita, porque son parte esencial en mi vida. También a mi pequeña "niña" Susy que siempre se desveló conmigo y me acompañó en los momentos que eran necesarios.

A mis suegros Francisca y Manuel (donde quiera que se encuentre) y a mis cuñados, en especial a Norma por su comprensión y cariño de siempre.

A todos mis amigos de la Facultad.

A todos y a cada uno de ellos... ¡CON CARIÑO!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE GENERAL

	página
Indice de Figuras y Tablas	IV
Abreviaturas y Símbolos	VI
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
2.1 Deterioro del papel	4
2.2 Cultivo, aislamiento e identificación de microorganismos	6
2.3 Control microbiológico	10
2.3.1 Definiciones	10
2.3.2 Condiciones que influyen en la acción antimicrobiana	12
2.3.3 Modo de acción de los agentes antimicrobianos	13
2.4 Control por agentes físicos	14
2.4.1 Esterilización por radiación	15
2.5 Radiaciones ionizantes	18
2.5.1 Aspectos básicos sobre las radiaciones ionizantes	18
2.5.2 Radiaciones gamma	19
2.5.3 Fuentes de radiación	20
2.5.4 Decaimiento gamma	20
2.5.5 Interacción de la radiación con la materia	21
2.5.6 Interacción de los rayos gamma con la materia	22
2.5.7 Efecto biológico de las radiaciones	23
2.6 Estudio del material irradiado	25
2.6.1 Propiedades del papel	25
2.6.2 Propiedades de resistencia del papel	26
2.6.3 Pruebas de tensión	27

	Página
2.7 El Microscopio Electrónico	31
2.7.1 El concepto de resolución	32
2.7.2 Generación de un haz de electrones	34
2.7.3 Interacción del haz electrónico con la muestra	35
2.7.3.1 Electrones secundarios	37
2.7.3.2 Electrones retrodispersados	38
2.7.4 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)	38
2.7.4.1 Formación de la imagen	40
2.7.4.2 Preparación de muestras	42
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
4. OBJETIVOS	44
4.1 Generales	44
4.2 Particulares	44
5. HIPÓTESIS	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1 Material	46
6.1.1 Cristalería	46
6.1.2 Material diverso	46
6.1.3 Equipo	47
6.1.4 Reactivos	48
6.1.5 Medios de cultivo	48
6.1.6 Material archivístico	48
6.2 Métodos	49
6.2.1 Examen preliminar en SEM	49
6.2.2 Aislamiento	50
6.2.3 Identificación	50

	Página
6.2.4 Procedimiento pre-irradiación	52
6.2.5 Irradiación	52
6.2.6 Ensayos de tensión	53
6.2.7 Análisis microscópico	55
6.3 Diagrama de flujo	55
7. RESULTADOS	57
7.1 Deterioro de documentos	57
7.2 Examen microscópico directo de las muestras	58
7.3 Identificación de microorganismos	60
7.4 Dosis mínima letal de radiación gamma	67
7.5 Ensayos de tensión	68
7.6 Análisis microscópico del papel	71
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	73
9. CONCLUSIONES	79
9.1 Sugerencias	80
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
Anexos	84

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS		Página
1	Esquema de una cámara de irradiación	16
2	Esquema de un irradiador	17
3	Curva típica de un ensayo de tensión	28
4	Curva esfuerzo-deformación (resistencia a la cedencia)	29
5	Propiedades mecánicas obtenidas de una prueba de tensión	30
6	Mecanismo de formación de imagen en un microscopio óptico y un electrónico	32
7	Esquema de la generación del haz de electrones	34
8	Tipos de señales en la interacción haz electrónico-muestra	36
9	Proceso físico para producir electrones secundarios, retrodispersados y rayos X característicos	37
10	Componentes principales de un SEM	40
11	Formación de imagen en un SEM	41
12	Probetas de papel para ensayos de tensión	53
13	Área de trabajo del tensómetro	54
14	Probetas de papel después del ensayo de tensión	54
15	Libro editado en 1911	57
16	Documento del año 1801	57
17	Documento del año 1879	57
18	Micrografías de esporas	58
19	Micrografías de esporas	58
20	Micrografías de esporas	58

	Página	
21	Micrografías de esporas	59
22	Micrografías de bacterias en forma bacilar	59
23	Género <i>Bacillus</i>	61
24	Género <i>Rhizopus</i>	62
25	Género <i>Penicillium</i>	63
26	Género <i>Hormodendrum</i>	64
27	Género <i>Alternaria</i>	65
28	Género <i>Fusarium</i>	66
29	Micrografías de papel couché	71
30	Micrografías de papel antiguo del año de 1911	72

TABLAS

I	Características de cultivos de bacterias	60
II	Dosis de radiación y análisis microbiológico	67
III	Valores promedio de ensayos de tensión en papel couché	68
IV	Valores promedio de ensayos de tensión en papel de un documento del año 1911	69

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Å	Angstroms
ADN	ácido desoxirribonucleico
ASTM-D	American Society for Testing and Materials – Designation
cm	Centímetro
°C	grados Centígrados
eV	electrón-volt
Gy	Gray
γ	Gamma
keV	kiloelectrón-volt
kg	Kilogramo
kN	Kilonewton
kV	Kilovolt
MeV	megaelectrón-volt
mm	Milímetro
mm/min	milímetro por minuto
mmHg	milímetros de mercurio
MPa	Megapascal
μm	Micrómetro
nm	Nanómetro
núm	Número
s	Segundo
TV	Televisión
Vol	Volumen
≈	Aproximadamente

RESUMEN

Un incontrolado crecimiento de microorganismos origina la pérdida de información parcial o total en los documentos de importancia histórica para la Nación. Ante la sospecha de contaminación microbiológica se realizó el análisis (cultivo, aislamiento e identificación) para detectar la presencia de microorganismos que pudieran ser nocivos para los documentos, y con base en ello se estudió un procedimiento para su eliminación. Se encontraron 6 géneros, *Bacillus* en cuanto a bacterias y *Rhizopus*, *Penicillium*, *Hormodendrum*, *Fusarium* y *Alternaria* del reino fungi.

El proceso físico para destruir estas poblaciones microbianas fue la esterilización por radiación ionizante gamma (γ), sin embargo fue necesario evaluar el cambio microestructural que sufrió el material al ser irradiado a la dosis letal para los microorganismos, que fue de 7000 Gy. En este trabajo se presenta la evaluación por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los daños producidos por la radiación gamma en un papel de prueba (papel couché), además esta técnica fue útil en la identificación de los microorganismos. Paralelamente para analizar las propiedades físicas del papel se le aplicó ensayos de tensión antes y después de irradiar, mostrando pocas diferencias respecto a sus características originales, por lo cual no se vieron afectadas significativamente sus propiedades.

La importancia de este método de control microbiológico es que presenta un camino alternativo para la preservación del acervo cultural.

1. INTRODUCCIÓN

Los principales problemas para la conservación documental comienzan en el siglo pasado, a raíz de la sustitución del papel artesanal de trapos por el de pasta de madera elaborado con procedimientos industriales. La situación empeora a mediados de este siglo debido a la reducción progresiva de la calidad del papel, y de manera especial, en los últimos años al incrementarse el uso de papel reciclado, el cual permite disminuir la necesidad de recursos naturales y aliviar el problema de los residuos sólidos. Sin embargo, no deben olvidarse las consecuencias de su uso indiscriminado como soporte documental en la futura conservación del patrimonio archivístico. El proceso de reciclado reduce la calidad del papel en un porcentaje que puede fijarse entre el 25-50%. Además, se debe tomar en cuenta que los papeles reciclados proceden mayoritariamente de materiales que no están destinados a perdurar, y por lo tanto se obtiene una calidad inferior a la de los papeles nuevos.

Como es bien sabido, el papel constituye el soporte más utilizado en la administración. Los factores internos que influyen en su estabilidad vienen determinados por las materias primas y las técnicas de fabricación. Pero también hay factores externos que influyen en su estabilidad, alterando y dañando en menor o mayor grado al papel. Uno de estos factores son las condiciones ambientales del lugar donde se resguardan (luz, temperatura, humedad, etc.), que son factibles de controlar mediante mediciones sistemáticas de los parámetros ambientales para comprobar lo adecuado de las instalaciones y/o realizar las modificaciones oportunas que las mejoren. El control ambiental reduce notablemente los riesgos de alteración, sin embargo, las buenas condiciones por sí solas no son suficientes por lo que es necesario adoptar programas de desinfección y fumigación en los cuales se haga uso de agentes químicos para eliminar posibles plagas y especies no deseadas, así como de microorganismos.

Ante la sospecha de contaminación microbiológica es necesario realizar los análisis oportunos para detectar la presencia de hongos y bacterias que puedan ser nocivos para los documentos. Un incontrolado crecimiento de estos puede originar la pérdida de información parcial o total en los documentos.

Los hongos son heterótrofos pues como saprófitos obtienen su alimento de la materia orgánica muerta. El crecimiento saprófito de los hongos puede ser dañino y causar cuantiosas pérdidas si ocurre en maderas, alimentos, papel u otros artículos comerciales e industriales. Las bacterias por su parte, al ser cosmopolitas también tienen vida saprófita y, al igual que los hongos, pueden producir daño en el lugar donde se desarrollen.

Para estudiar a los microorganismos es necesario como requisito previo el cultivarlos en condiciones de laboratorio. El aislamiento es un procedimiento relativamente sencillo; la identificación y la determinación del significado es mucho más difícil. El procedimiento para la identificación es la acumulación de una serie de características que incluyen: morfología macroscópica y microscópica de la colonia y, en el caso de las bacterias, la actividad metabólica. Después que el microorganismo ha sido aislado e identificado debe determinarse su importancia y esto dependerá del sitio de donde fueron aislados.

Si los microorganismos son capaces de destruir materiales valiosos, existen medidas eficaces que los eliminan, inhiben o matan, esto es por medio de agentes químicos o por procedimientos físicos; cada uno de ellos actuando de manera diferente y teniendo sus propias limitaciones.

Un procedimiento físico que destruye todas las formas de vida microbiana es la esterilización, y entre los métodos que logran esta finalidad se encuentra la aplicación de radiaciones ionizantes, método que se denomina esterilización fría porque las radiaciones ionizantes producen relativamente poco calor en el material irradiado, además de tener la capacidad de penetración en la materia.

La Institución que precede este proyecto es el Archivo General, el cual tiene como finalidad conservar y preservar el patrimonio documental de la Nación. Para tal efecto, es necesario implementar programas de control que reduzcan los riesgos de pérdida de este material bibliográfico, siendo la radiación una alternativa para el control de microorganismos. La radiación que se utilizará para tal efecto es la radiación gamma, utilizando como fuente Cobalto 60 (Co-60).

La tesis está compuesta por diez capítulos y dos anexos. En el capítulo I (Introducción) se sitúa al lector en la importancia que tiene la esterilización por métodos físicos como lo es el uso de radiaciones en documentos antiguos contaminados por microorganismos. En el capítulo II (Fundamentos Teóricos) se dan los antecedentes del deterioro del papel por microorganismos, las técnicas de aislamiento e identificación de estos, así como el control de su desarrollo mediante procedimientos físicos tal como la radiación ionizante gamma, y el efecto en el material irradiado; al final de este capítulo se hace un bosquejo de los principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). En el capítulo III se plantea la problemática a la conservación documental y se propone la alternativa de utilizar radiaciones como método de control microbiológico. En los capítulos IV y V se describen los objetivos a seguir y la hipótesis de trabajo. En el capítulo VI se enlistan los materiales y los métodos utilizados en el desarrollo experimental, así como un diagrama de flujo que marca los pasos a seguir en el desarrollo del trabajo. En el capítulo VII se presentan los resultados obtenidos y en el capítulo VIII se analizan y discuten estos resultados. En el capítulo IX se presentan las conclusiones a las que se llegaron y se proponen algunas sugerencias para futuros estudios. Finalmente, el capítulo X consta de la lista de referencias consultada para la realización de este trabajo, los anexos incluyen los gráficos de los ensayos de tensión y un breve glosario.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Deterioro del papel

El papel constituye el soporte más utilizado para guardar información. Los factores internos que influyen en su estabilidad están determinados por las materias primas y las técnicas de fabricación. Durante siglos se emplearon trapos de lino, cáñamo y algodón que eran triturados mecánicamente hasta su conversión en pasta. Luego, en la fase de encolado, se añadían almidón y gelatina para apresar la hoja y adecuarla así a la escritura. Otro factor positivo fue la cal añadida durante la fase de lavado y desfibrado, ya que sus restos proporcionaron una barrera de protección frente a la acidez. Como se puede comprobar en muchos documentos medievales, el papel resultante tenía una calidad excelente y una gran consistencia.

A principio del siglo pasado se generaliza el uso de cloro, utilizado en el blanqueo de trapos de color, y el empleo de alumbre y colofonia en la fase de apresto. Con los nuevos componentes la permanencia del papel empieza a verse afectada y aparecen los primeros problemas de conservación a causa de la acidez. La situación se agrava con la industrialización del proceso productivo, que conlleva la sustitución de los trapos, el abandono de las colas tradicionales a favor de los nuevos aprestos y la mayor utilización de agentes clorados en el blanqueo de la pasta. Esto ocurre después de que el alemán Köller descubre en 1844 la posibilidad de utilizar troncos de árboles como materia prima.

La presencia en la madera de ciertos ingredientes que oxidan y degradan la celulosa, entre los que destacan la lignina, amenaza la permanencia y durabilidad del papel, aunque el factor determinante es el procedimiento utilizado en la transformación de la madera en pasta. Si éste es mecánico, la permanencia del papel se ve afectada por la violenta tracción que sufre la madera en su desfibrado y por el mantenimiento de los componentes no celulósicos que resultan perjudiciales. Por el contrario, los procedimientos químicos permiten eliminar estos

componentes nocivos, aunque introducen otros productos como sosa cáustica y sulfuros que son un nuevo factor de alteración. En el proceso químico-mecánico se combinan ambos procedimientos, pero los compuestos no celulósicos no son extraídos por completo.

A diferencia del papel artesanal, que ha demostrado con el paso del tiempo que puede perdurar más de 700 años, el papel industrial presenta desde su origen una gran inestabilidad química y su esperanza de vida es relativamente corta: 25-30 años para el de pasta mecánica, 50-75 años para el de pasta química al sulfito y 75-100 años para el de pasta química al sulfato. Desde hace tiempo se sabe que la acidez es la principal causa de alteración del papel actual. Su origen hay que buscarlo principalmente en los ácidos orgánicos encontrados en la pasta, en los aditivos utilizados en el encolado, en los residuos de los agentes empleados en el blanqueo y, más recientemente, en la adición de ciertas sustancias con las que se pretende mejorar las propiedades ópticas y abaratar los costos de producción. El proceso puede agravarse en unas condiciones ambientales adversas, resultando especialmente nocivos los niveles altos de humedad y los gases ácidos de la atmósfera, así como también agentes biológicos.

El papel terminado está expuesto al ataque microbiano. La celulosa, que es el principal componente del papel, es susceptible a ser degradada por muchas especies de hongos y bacterias. Otros componentes del papel, como la goma o la caseína, también sirven de sustrato a los microorganismos. En condiciones que favorezcan el desarrollo de microorganismos, el papel se tiñe o cambia de color a consecuencia del metabolismo microbiano. El crecimiento de microorganismos celulolíticos produce debilitamiento de las fibras, perforaciones, y aun la destrucción total del papel.

Hay muchas enzimas de hongos y bacterias que pueden causar la descomposición hidrolítica de la celulosa. Estas enzimas hidrolizantes se denominan celulasas y originan la degradación de la madera, del algodón y del papel. Cuando una espora de un hongo germina en la madera, se produce una

disolución general de la pared primaria, ocasionada por una estructura fibrosa denominada hifa que segrega enzimas al penetrar en la pared celular por perforaciones o huecos presentes en la madera. Las celulasas atacan inicialmente la pared del lumen, y salen gradualmente conforme se eliminan los polisacáridos de cada capa sucesiva de la pared. Las bacterias producen también enzimas celulasas capaces de degradar la celulosa. En contraste con las perforaciones y el daño causado a la fibra interior en el caso del crecimiento por hongos, el ataque bacteriano parece afectar únicamente la superficie de las fibras.

Resulta necesario durante la hidrólisis enzimática que haya un contacto físico directo entre la celulosa y la enzima. Como la celulosa es un sustrato insoluble y estructuralmente complejo, el contacto puede lograrse únicamente mediante difusión de la enzima por la matriz estructural compleja de la celulosa. Cualquier característica estructural que limite la accesibilidad de la celulosa a las enzimas disminuirá su susceptibilidad a la hidrólisis.

Finalmente, es necesario mencionar que, los microorganismos causan una gran parte de la destrucción del papel, pero igualmente lo hacen en otros materiales tales como textiles, lana, hule y metales, y por supuesto en sustancias alimenticias.^{1,2}

2.2 Cultivo, aislamiento e identificación de microorganismos

El daño causado por un incontrolado crecimiento de microorganismos puede dar origen a una pérdida de información parcial o total en los documentos. Puesto que muchos de los materiales empleados en la fabricación de papel pueden servir como alimento para microorganismos, se hace necesario estudiar que tipo de estos se aloja en él.

Los microorganismos pueden sobrevivir a condiciones del medio ambiente que serían prohibitivas para el crecimiento y demás actividades fisiológicas de casi

todas las formas de vida vegetal y animal. Sin duda, el medio ambiente juega un papel importante para determinar los tipos de microorganismos presentes, pero de igual forma, el alimento disponible podría determinarlo.

La clase de microorganismos que normalmente se encuentran en el papel y en el cartoncillo son saprófitos inoos, como bacterias y hongos.

Para estudiar a los microorganismos se necesita como requisito previo el cultivarlos en condiciones de laboratorio. Se llama cultivo al proceso de propagar microorganismos brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en crecimiento están haciendo réplicas de sí mismos, y requieren los elementos que se encuentran en su composición química. Los nutrimentos deben brindarles estos elementos en forma accesible desde el punto de vista metabólico. Además, estos microorganismos requieren energía metabólica con objeto de sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Los factores que se deben regular durante el crecimiento son nutrimentos, pH, temperatura, aeración, concentración de sales y potencia iónica del medio.³

Para estudiar las propiedades de un microorganismo dado es necesario manejarlo en cultivo puro, libre de otros tipos de microorganismos. Para hacer esto, debe aislarse una sola célula de todas las demás y ser cultivada de tal manera que su progenie también permanezca aislada.

Para aislar las bacterias en cultivo puro existen varias técnicas, algunas de ellas son:

- a) Siembra por estrías en placa.- Con un asa bacteriológica, se pasa una porción de la muestra a la superficie de un medio de cultivo y se siembra por estrías; cuando se raya adecuadamente el agar con el asa de siembras, las células bacterianas quedan lo suficientemente separadas en algunas áreas de la placa lo que permite estar seguros que la colonia que se

desarrolla a partir de una célula no se junte con la que está desarrollándose a partir de otra célula.

- b) Siembra por difusión en placa.- Para realizar esta técnica, por lo común se usa una varilla de cristal estéril para esparcir la muestra. Esta operación hace posible adelgazar la muestra de tal manera que en la superficie del agar quedan las bacterias separadas unas de otras.
- c) Placa vertida.- El principio de esta técnica es la dilución de la muestra en tubos con agar fundido y enfriado. El medio se mantiene al estado líquido a una temperatura de 45°C para permitir que el inóculo se distribuya adecuadamente en el medio; una vez sembrado el medio se pone en cajas de Petri, se deja solidificar y después se incuba.¹

Para aislar hongos resulta práctico usar un medio de cultivo que favorezca su desarrollo pero que no sea óptimo para las bacterias. Medios ácidos (pH 5.6) con concentraciones relativamente elevadas de azúcar son bien tolerados por los hongos pero inhiben a muchas bacterias. La siembra se realiza en tubos con agar inclinado, utilizando un asa gruesa y recta, se toma una pequeña cantidad de muestra y se hacen dos o tres cortes profundos en la superficie del medio. Se incuban a temperatura ambiente y los cultivos se examinan cada 24 horas.⁴

Después de la siembra del medio de cultivo y de la incubación, se pueden determinar las características de cultivo del microorganismo, que nos guiarán hacia la identificación.

Los aspectos más peculiares de una colonia bacteriana son: tamaño (en milímetros); forma (puntiforme, circular, filamentosa, ameboide, rizoide); margen o borde (entero, ondulado, lobulado, filamentoso, crenado); superficie (lisa, brillante, radial, concéntrica, rugosa); elevación (plana, cóncava, convexa); pigmentación (depende del medio de cultivo y de las condiciones de incubación); características ópticas (transparentes, opacas); textura o consistencia (seca, viscosa, pastosa, cremosa, algodonosa).

Además, entre las principales características de las bacterias figuran su tamaño, su forma, su estructura y su tipo de agrupación. Estas características constituyen la morfología de la célula. Las bacterias son esféricas, en forma de bastón o de espiral; se pueden organizar en grupos, siendo las más comunes de ellos pares, racimos, cadenas y filamentos. Se debe tener conocimiento de todas estas formas de agrupación porque con frecuencia son características de un grupo taxonómico, por ejemplo, un género.

La morfología macroscópica de las colonias de hongos incluye: tamaño, los hongos filamentosos dan lugar a colonias mayores que las bacterias (pueden ser en centímetros); aspecto (algodonoso, aterciopelado, crateriforme, cerebriforme); superficie (granular, polvosa); color (pueden ser vistosos y variados); textura (dura, esponjosa, suave); debe observarse el reverso (buscando la presencia de pigmentos característicos); y rapidez o lentitud del crecimiento. Cuando se evalúa y describe la morfología macroscópica de la colonia, debe considerarse el tipo de medio de cultivo empleado, y las condiciones ambientales en las cuales el hongo ha crecido; ya que el aspecto macroscópico del mismo hongo puede variar enormemente cuando se cultiva en medios diferentes.⁵

Los hongos se estudian y clasifican a través de las diferencias en su morfología y en los modos de reproducirse. Los cultivos en medios sólidos, sobre todo en placas, se pueden ver con una lupa o con el objetivo seco débil del microscopio óptico, empezando desde el fondo hasta la parte superior de la placa lo cual nos proporcionará suficiente información para identificar o precisar el género. Sin embargo, su identificación se hace fundamentalmente con base a la morfología del micelio, y en particular, de las esporas que producen para su propagación, que suelen ser características. Así pues, la identificación se basa en su observación microscópica. De tal manera que si se corta un fragmento del micelio en desarrollo y se transfiere a un portaobjetos, las estructuras se desorganizan y rompen, y la disposición característica de la que depende la identificación se pierde y no será

posible clasificarlo. Para poder observar sin distorsión el micelio y las esporas, se utiliza una técnica denominada microcultivo, que permite manejar y observar la especie sin modificar su desarrollo, y el arreglo y acomodo de sus partes permanecen intactos. La técnica consiste en cortar un dado del agar contenido en una placa y depositarlo en un portaobjetos estéril situado en una placa vacía. A cada lado del cubo de agar se inocula el hongo filamentoso a estudiar. Se pone sobre el agar un cubreobjetos y se coloca la tapa de la placa incubándose en ambiente húmedo. Al crecer el micelio se expande como una planta trepadora por la cara inferior del cubreobjetos, que puede arrancarse del agar con cuidado y depositarse sobre otro portaobjetos, y de esta manera pueden observarse sin alteración las estructuras fúngicas.^{1,4,5,6,7}

2.3 Control microbiológico

La razón principal para controlar a los microorganismos es prevenir la contaminación o la proliferación de microorganismos perjudiciales, y con ello prevenir el deterioro o destrucción de materiales causados por estos.

Ya que los microorganismos son capaces de destruir materiales valiosos, causando pérdidas que necesitan evitarse, existen medidas eficaces que los eliminan, inhiben o matan, ya sea por medio de procedimientos físicos o por agentes químicos. Se cuenta con una gran variedad de éstos y cada uno actúa de manera diferente con sus propias ventajas y desventajas.

2.3.1 Definiciones

Antes de tratar sobre las medidas de control de microorganismos se debe entender el significado de varios términos usados para describirlos. Los procedimientos físicos y agentes químicos empleados reciben los siguientes nombres:

- **ESTERILIZACIÓN.** Es el proceso de destruir todas las formas de vida microbiana. Un objeto esterilizado, en el sentido microbiológico, está libre de microorganismos vivos. Los términos estéril, esterilizar y esterilización se refieren a la ausencia o destrucción completa de los microorganismos y no se usan en sentido relativo. Un objeto está estéril o no está estéril, pero no semiestéril o casi estéril.
- **DESINFECTANTE.** Es un agente, por lo regular químico, capaz de matar las formas vegetativas, pero no necesariamente afectan las esporas de los microorganismos, las cuales son muy resistentes. El término se aplica comúnmente a sustancias que se usan en objetos inanimados.
- **ANTISÉPTICO.** Toda sustancia que se opone a la sepsis o impide el desarrollo o acción de los microorganismos, ya sea por destruirlos o inhibir su crecimiento y actividad. Generalmente se refiere a sustancias aplicadas al cuerpo.
- **SANEAMIENTO.** Consiste en reducir la población microbiana a niveles no peligrosos por medio de un agente, según los requerimientos de salud pública. Por lo regular, es un agente químico y se aplican casi siempre a objetos inanimados.
- **GERMICIDA (MICROBICIDA).** Agente que mata las formas en desarrollo pero no forzosamente las esporas; en la práctica un germicida es casi lo mismo que un desinfectante, aunque los germicidas se utilizan para todo tipo de gérmenes (microbios) y en cualquier tipo de aplicación.
- **BACTERICIDA.** Agente que mata bacterias. De manera similar, los términos fungicida y esporocida se refieren a agentes que matan hongos y esporas, respectivamente.
- **BACTERIOSTASIS.** Es la supresión del desarrollo de bacterias (agente bacteriostático). De la misma manera, los fungistáticos se refieren a los hongos. Los agentes que tienen en común la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos se designan colectivamente microbiostáticos.
- **AGENTES ANTIMICROBIANOS.** Son los que interfieren en el crecimiento y actividad de los microorganismos. En el lenguaje corriente, el término

antimicrobiano denota inhibición del desarrollo y si se refiere a grupos determinados de organismos se emplean los términos de antibacteriano o antifúngico.

2.3.2 Condiciones que influyen en la acción antimicrobiana

En la aplicación de un procedimiento físico o un agente químico usado para inhibir o destruir poblaciones microbianas hay que considerar muchos factores. Es necesario valorar cada situación para seleccionar el método que la investigación y la experiencia han demostrado que rinde el resultado deseado.

Las especies de microorganismos difieren en susceptibilidad a los agentes químicos y procedimientos físicos. Las células vegetativas en desarrollo, de las especies que forman esporas, son mucho más susceptibles que las esporas, en cambio, éstas son muy resistentes, son las formas orgánicas más resistentes pues son capaces de sobrevivir en condiciones físicas o químicas muy adversas.

El estado fisiológico de los organismos influye en la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Las células jóvenes, por tener intenso metabolismo, son más vulnerables que las viejas, de menor actividad metabólica en el caso de un agente que cause daño por interferir en esa función, este tipo de agente no afectará las células que no estén en desarrollo. Otras diferencias en cuanto a la resistencia se explican por cambios en la membrana celular porque el envejecimiento afecta la permeabilidad de ésta.

Las propiedades físicas y químicas del medio o las sustancias que contiene el medio en que viven los microorganismos también tienen gran influencia en la velocidad y eficacia de la destrucción microbiana. Por ejemplo, la presencia de materia orgánica extraña reduce notablemente la eficacia de un agente químico antimicrobiano, por inactivar a éste o proteger al microorganismo. La materia

orgánica añadida a una mezcla desinfectante-microorganismos conduce a los resultados siguientes:

1. Combinación del desinfectante con la materia orgánica para formar el producto que no es microbicida.
2. Combinación del desinfectante con la materia orgánica para formar un precipitado, apartando así al desinfectante de su posible combinación con el microorganismo.
3. Acumulación de la materia orgánica sobre la superficie celular formando una capa que impide el contacto entre el desinfectante y la célula.

Como se ha visto, muchas de las características biológicas de los microorganismos influyen en la proporción en que son muertos o inactivados por diversos agentes. Pero ¿cuándo está muerto un microorganismo?

El concepto convencional de la muerte está vinculado al fracaso del microorganismo a desarrollarse cuando se siembra en un medio adecuado, lo cual indica que el microorganismo ya no es capaz de reproducirse y éste es el criterio de muerte.

2.3.3 Modo de acción de los agentes antimicrobianos

Los procedimientos y sustancias usados como agentes antimicrobianos manifiestan su actividad de diferentes modos. Se han hecho muchas investigaciones para determinar el sitio específico de acción de varios agentes; estas investigaciones se complican porque cualquier célula expuesta a un agente dañino sufre diversas alteraciones. Cuando se da el proceso letal inicial, la célula se enmascara. El problema real es establecer el sitio primario del daño causante del deterioro de los procesos vitales.

Es posible predecir los sitios de acción de un agente antimicrobiano recordando algunos aspectos de la célula microbiana. Una célula viva normal contiene

múltiples enzimas indispensables para los procesos metabólicos. Una membrana semipermeable que mantiene la integridad del contenido celular; regula selectivamente el paso de sustancias entre la célula y el medio externo e incluso es el sitio donde reaccionan algunas enzimas. La pared celular proporciona a la célula una cubierta protectora, además de participar en determinados procesos fisiológicos. El daño a algunas de estas estructuras inicia las alteraciones que llevan a la célula a la muerte. Es necesario tener en cuenta que hay muchos sitios vulnerables de una célula y que el daño lo causa una, o más de una variedad de agente.¹

2.4 Control por agentes físicos

Los microorganismos pueden sobrevivir en medios con condiciones físicas muy diversas, sin embargo hay ciertas condiciones limitantes y específicas que estos pueden tolerar para sobrevivir. Las fluctuaciones de las condiciones ambientales tienen efectos inhibidores e incluso letales en cierta porción de la flora microbiana y la cantidad de ésta depende, en parte de la intensidad de las condiciones físicas.

Existen procedimientos físicos para destruir poblaciones microbianas y se debe elegir el mejor para reducir o eliminar cada grupo microbiano. Además es importante considerar el sitio o material de donde se quieran eliminar

Un procedimiento físico que destruye todas las formas de vida microbiana es la esterilización. "La esterilización, por definición, consiste en librar cualquier objeto, superficie o medio, por remoción o muerte de todos los microorganismos que los contaminen, ya sea en estado vegetativo o esporulado".⁸

Entre los métodos físicos que logran esta finalidad se encuentra la aplicación de radiaciones ionizantes, método que se denomina esterilización fría porque las radiaciones ionizantes producen relativamente poco calor en el material irradiado.

Las radiaciones son capaces de penetrar la materia y afectar los procesos biológicos que ocurren en los organismos vivos.

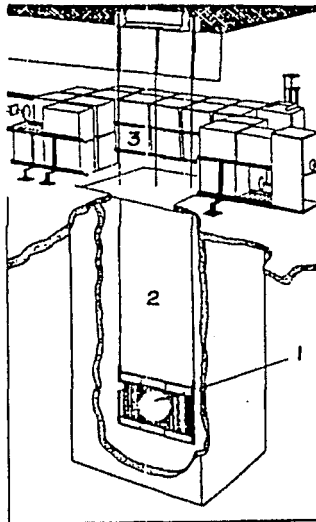
2.4.1 Esterilización por radiación

La esterilización por radiación se remota a más de tres décadas, y cada vez más países someten a irradiación distintos materiales para eliminar los microorganismos presentes. Además, el tratamiento con radiaciones representa una alternativa muy importante con respecto a los métodos convencionales, sobre todo para aquellos materiales que son sensibles al calor o que por su naturaleza no pueden ser tratados con éste.

El proceso de esterilización con radiación se lleva a cabo en plantas industriales denominadas Irradiadores Gamma. El Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares cuenta, desde 1980, con uno de estos; el cual está formado básicamente por los siguientes componentes:

- **FUENTE DE RADIACIÓN.** Es la parte principal de la instalación, se emplea el isótopo radiactivo Cobalto-60 (Co-60). Este se manufactura en forma de pequeños cilindros los cuales se encapsulan doblemente en tubos de acero inoxidable, con tapas soldadas, de tal manera que el Co-60 no tiene contacto con el medio ambiente y por lo tanto no contamina.
- **BLINDAJE.** La cámara de irradiación está techada y rodeada con muros de concreto de 1.5 metros de espesor, los cuales atenúan la radiación y permiten usarla en un área específica, reduciendo al mínimo la exposición fuera de ella. Las fuentes de Co-60 se almacenan en una piscina de 5.5 metros de profundidad localizada en el centro de la cámara de irradiación, el agua disminuye la intensidad de la radiación (figura 1 y 2).
- **MECANISMO DE TRANSPORTACIÓN DEL PRODUCTO.** Son dispositivos electromecánicos que se encargan de introducir el producto que va a ser esterilizado al interior de la cámara de irradiación, de darle vuelta alrededor de la fuente de Co-60 y de sacarlo de la cámara hacia la estación de descarga.

- SISTEMA DE SEGURIDAD. Mediante un sistema electrónico se controlan todos los aspectos de la instalación, esto incluye la fuente de radiación, los mecanismos de transportación del producto, interruptores de seguridad y monitores de radiación. Los controles quedan fuera del área de irradiación por lo que el personal opera la instalación sin ningún peligro.
- SISTEMAS AUXILIARES. Es el equipo que sirve de apoyo al proceso y consta de: intercambiador de iones, intercambiador de calor, bomba de recirculación de agua y sistema de ventilación.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. El bastidor con las fuentes radiactivas (1) se almacena en una piscina (2). Cuando se va a exponer un producto, el bastidor se eleva hasta la posición de irradiación (3) en el centro de la cámara de irradiación.

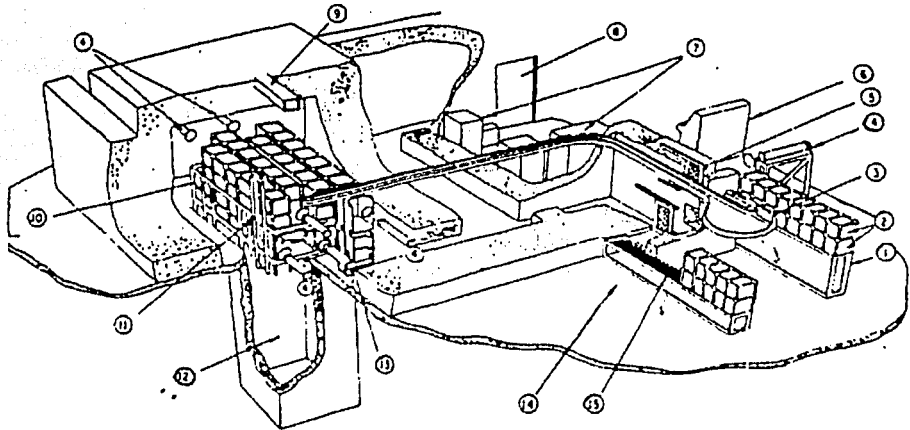


Figura 2. Esquema de los componentes de un irradiador.

El número 1 indica el transportador de carga; 2, los contenedores con los productos; 3, el monorriel; 4, los empujadores neumáticos; 5, la puerta de entrada de productos; 6, la consola de control; 7, equipos auxiliares; 8, puerta de acceso al laberinto; 9, el elevador del bastidor; 10, el mecanismo de movimiento de contenedores alrededor del bastidor; 11, el elevador de contenedores; 12, la piscina; 13, el transportador de contenedores; 14, el área de producto ya iniciado; y 15, el transportador de descarga.

El proceso de esterilización por irradiación consiste en exponer el material que va a ser esterilizado, a la radiación gamma que emite la fuente de Co-60.

El producto a irradiar es introducido en recipientes de aluminio, los cuales son llevados automáticamente hasta el centro de la cámara de irradiación. La fuente de Co-60 se eleva, se saca de la piscina y se coloca al nivel de los productos, éstos empiezan a hacer automáticamente un recorrido alrededor de la fuente de radiación, en intervalos de tiempo determinados para cada producto. Completando su ciclo el material sale de la cámara hacia la estación de descarga, se saca de los recipientes de aluminio y está listo para ser enviado a su destino.

El tiempo de exposición de un producto a la radiación que emite la fuente de Co-60 depende del tipo de material y del grado de contaminación microbiana que éste posea. El poder ionizante de este tipo de radiación reduce o inhibe totalmente la reproducción de los microorganismos.⁹

En general los microorganismos son más resistentes a las radiaciones ionizantes que los seres superiores. Por ejemplo, la dosis de reducción decimal (D10) para las endosporas de ciertas especies de *Clostridium* es de 2000-3000 Gy. En cambio, otras especies poseen una dosis de reducción decimal en el intervalo a 200-600 Gy

La dosis de esterilización por radiación se suele establecer en 12 veces la dosis de reducción decimal (12 D10) requerida para las endosporas de *Clostridium botulinum*. Debido al gran poder penetrante de las radiaciones hay que mantener normas y controles de seguridad muy estrictos en su manipulación.¹⁰

2.5 Radiaciones ionizantes

2.5.1 Aspectos básicos sobre las radiaciones ionizantes

El término "radiación" significa básicamente *transferencia de energía de una fuente a otra*. Existen radiaciones electromagnéticas de varios tipos, entre las que se encuentran la energía eléctrica, las ondas de radio y televisión, las ondas de radar, las microondas, la radiación infrarroja, la luz visible, la radiación ultravioleta, los rayos X, la radiación gamma y los rayos cósmicos, entre otros.

Las radiaciones pueden ser *radiación electromagnética* (fotones) o *radiación particulada*, entre estas últimas las más conocidas son las partículas como los electrones, positrones, neutrones, protones y partículas alfa. Existen *radiaciones ionizantes* y *radiaciones no ionizantes*.

Las radiaciones ionizantes (electromagnéticas o particuladas) son aquellas con energía, longitud de onda y frecuencia tales que al interactuar con un medio le transfieren energía suficiente para desligar un electrón del átomo. En ese instante en el que el electrón sale desprendido (es separado) del átomo al que pertenecía, se produce un proceso que se llama *ionización*. La ionización es por tanto, la formación de un par de partículas cargadas eléctricamente, el negativo (el electrón libre) y el positivo (el átomo sin uno de sus electrones).

La ionización producida por una radiación incidente que interactúa con la materia (que puede ser un medio biológico) puede ser directa o indirecta. La radiación electromagnética (rayos X y rayos gamma) es radiación indirectamente ionizante. La radiación directamente ionizante son las partículas cargadas (como los electrones y las partículas alfa), que interactúan con el medio con *moléculas blanco* (también conocidas como *moléculas diana*) como el oxígeno y el agua.¹¹

La radiactividad no se puede ver, ni tocar y es capaz de causar daño incluso a través de las paredes, esto hace que se produzca el temor de lo desconocido, pero la radiactividad se debe admitir que forma parte de la vida cotidiana por existir en la naturaleza y como producto de la actividad humana.

2.5.2 Radiaciones gamma (γ)

Las radiaciones gamma tienen energía en el intervalo de 1 240 000 – 9 000 eV y son emitidas por ciertos isótopos radiactivos como Co-60. Estos rayos gamma son similares a los rayos X pero tienen longitud de onda más corta (0.001 – 0.14 nm), gran capacidad de penetración en la materia y son letales para todas las formas de vida.

Debido a su gran poder de penetración y efecto microbicida, los rayos gamma resultan ideales para usarlos en la esterilización de materiales de considerable grosor y volumen.

Las radiaciones alfa y beta cuando interaccionan con la materia producen ciertas cantidades de radiación gamma, por lo que esta radiación se encontrará en cualquier tipo de fuente.^{1,8,12}

2.5.3 Fuentes de radiación

Hay elementos que son inestables y sus átomos tienden a buscar una mayor estabilidad emitiendo partículas de materia o energía que les sobra, transformándose en otros elementos más estables. A los materiales formados por o con estos elementos se les llaman fuentes radiactivas.

Los núcleos de los átomos pueden transformarse unos en otros, o pasar de un estado energético a otro, mediante la emisión de radiaciones. Se dice entonces que los núcleos son radiactivos; el proceso que sufren se denomina decaimiento radiactivo o desintegración radiactiva. Esta transformación o decaimiento sucede de manera espontánea en cada núcleo, sin que pueda impedirse mediante ningún factor externo. Además, cada decaimiento va acompañado por la emisión de al menos una radiación. La energía que se lleva cada cuanto de radiación es perdida por el núcleo, siendo la fuerza nuclear el origen de esta energía y lo que da a las radiaciones sus dos características más útiles: poder penetrar la materia y poder depositar su energía en ella.

Los decaimientos radiactivos de los diferentes núcleos se caracterizan por: el tipo de emisión, su energía y la rapidez de decaimiento.^{12,13}

2.5.4 Decaimiento γ

Los rayos gamma son fotones, o sea, paquetes de radiación electromagnética, como la luz visible, la ultravioleta, la infrarroja, los rayos X, las microondas y las ondas de radio. No tienen masa ni carga, y solamente constituyen energía emitida

en forma de onda. En consecuencia, cuando un núcleo emite un rayo gamma, se mantiene como el mismo núcleo, pero en un estado de menor energía. Se ha encontrado que el rayo gamma es emitido con energías discretas, lo que demuestra que el núcleo posee niveles de energía discretos.

El decaimiento γ no causa un cambio en el número atómico o en el número de masa del núcleo y la vida media resulta ser mucho más corta ($\approx 10^{-4}$ s); aunque algunos estados excitados de ciertos núcleos son muy largos y sus vidas medias son medibles.^{13,14}

2.5.5 Interacción de la radiación con la materia

Todos los empleos de la radiación están basados en cualquiera de las dos siguientes propiedades: penetración de la materia y depósito de energía.

Cuando una radiación penetra en un material lo que encuentra a su paso son electrones y núcleos atómicos, pero en general mucho más electrones que núcleos (por cada núcleo hay Z electrones, donde Z es el número atómico). Por lo tanto, en términos generales las interacciones con los electrones serán mucho más abundantes que con los núcleos. Los efectos más comunes son la ionización y la excitación atómica del material; menos numerosos son los cambios estructurales. A todos estos pueden seguir cambios químicos. Como resultado de estas interacciones, el depósito de energía en el material da lugar a una elevación de temperatura.

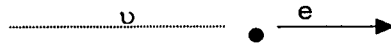
La energía promedio necesaria para producir ionización en un elemento depende de su número atómico (Z). La forma detallada en que se produce la ionización es distinta para cada tipo de radiación y su energía. Por ello conviene separar los tipos de radiación según su interacción con la materia.

2.5.6 Interacción de los rayos γ con la materia

Los rayos gamma, al no tener carga, no pueden ser frenados lentamente por ionización al atravesar un material. Sufren otros mecanismos que al final los hacen desaparecer, transfiriendo su energía a los electrones del material por tres diferentes métodos. Estos electrones energéticos secundarios son luego frenados ionizando el material a su paso.

En consecuencia, los fotones de rayos gamma, dependiendo de su energía, pueden atravesar varios centímetros de un sólido, o cientos de metros de aire, sin sufrir ningún proceso ni afectar la materia que cruzan. Luego sufren uno de los tres efectos y depositan allí gran parte de su energía. Los tres mecanismos de interacción con la materia son: el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton y la producción de pares.

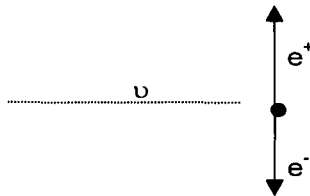
- **EFFECTO FOTOELÉCTRICO.** Consiste en que el fotón (ν) se encuentra con un electrón del material y le transfiere toda su energía, desapareciendo el fotón original. El electrón secundario adquiere toda la energía del fotón en forma de energía cinética, y es suficiente para desligarlo de su átomo y convertirlo en "proyectil".



- **EFFECTO COMPTON.** El fotón choca con un electrón como si fuera un choque entre dos esferas elásticas. El electrón secundario adquiere sólo parte de la energía del fotón, y el resto se la lleva otro fotón de menor energía y desviado de la trayectoria del primer fotón.



- **PRODUCCIÓN DE PARES.** Cuando un fotón se acerca al campo eléctrico de un núcleo puede suceder la producción de pares. En este caso el fotón se transforma en un par electrón-positrón. Como la suma de las masas del par es 1.02 MeV, no puede suceder si la energía del fotón es menor que esta cantidad. Si la energía del fotón original es mayor que 1.02 MeV, el excedente se lo reparten el electrón y el positrón como energía cinética, pudiendo ionizar el material. Estos efectos producirán en el material una modificación de sus propiedades físicas y químicas y donde la magnitud de estos cambios será característica del tipo de material frenador.



Cada uno de los efectos predomina a diferentes energías de los fotones. A bajas energías predomina el efecto fotoeléctrico; a energías medianas el efecto Compton; a energías mayores, la producción de pares.^{13,14}

2.5.7 Efectos biológicos de las radiaciones

Como muchos otros agentes físicos, químicos o biológicos, las radiaciones ionizantes son capaces de producir daños orgánicos. Esto es en virtud de que la radiación interacciona con los átomos de la materia viva, provocando en ellos principalmente el fenómeno de ionización. Luego esto da lugar a cambios importantes en las células. Estos cambios químicos o biológicos pueden producir varias alteraciones que en conjunto suelen llamarse *daño biológico*. El tipo y la magnitud del daño dependen del tipo de radiación, de su energía, de la dosis absorbida (energía depositada), de la zona afectada, y del tiempo de exposición.

Cuando la radiación ionizante incide sobre un organismo vivo, la interacción a nivel celular se puede llevar a cabo en las membranas, el citoplasma, y el núcleo.

Si la interacción sucede en alguna de las membranas se producen alteraciones de permeabilidad, lo que hace que puedan intercambiar fluidos en cantidades mayores que las normales. En ambos casos la célula no muere, pero sus funciones de multiplicación no se llevan a cabo. En el caso en que el daño sea generalizado la célula puede morir.

Cuando la interacción suceda en el citoplasma, cuya principal sustancia es el agua, al ser ésta ionizada se forman radicales químicamente inestables. Algunos de estos radicales tenderán a unirse para formar moléculas de agua y moléculas de hidrógeno, las cuales no son nocivas para el citoplasma. Otros se combinan para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual sí produce alteraciones en el funcionamiento de las células. La situación más crítica se presenta cuando se forma el hidronio (HO), el cual produce envenenamiento.

Cuando la radiación ionizante llega hasta el núcleo de la célula, puede producir alteraciones de los genes e inclusive rompimiento de los cromosomas, provocando que cuando la célula se divida lo haga con características diferentes a la célula original.

Los efectos de las radiaciones ionizantes son letales, tanto directos como indirectos, así como mutagénicos. Los efectos letales directos se logran a altas dosis de radiación, mientras que los letales indirectos y mutagénicos se consiguen a menores dosis.

1. Efecto letal directo. Los estudios demuestran que debe de existir una molécula vital única que, al ser alterada, provoca la muerte. Esta molécula debe ser el ADN (ya que es absolutamente esencial y suministra una sola copia de la mayoría de los genes bacterianos), y no las proteínas, de las que existen muchas copias en la célula, y que podrían regenerarse. Los daños al ADN son,

principalmente: roturas en ambas cadenas, y entrecruzamiento entre dichas cadenas, que no puedan repararse.

2. Efecto mutagénico. Deriva de la producción de daños menores al ADN que pueden repararse.

3. Efecto letal indirecto. Este tipo de efecto es el más importante, y deriva de la hidrólisis del agua cuyas consecuencias ya fueron descritas en párrafos anteriores. Si, además, la célula bacteriana está expuesta al oxígeno cuando se le está irradiando, éste reaccionará con los radicales libres, originando cadenas de reacciones de autooxidación, muy destructivas.^{10,12,13}

2.6 Estudio del material irradiado

Como se mencionó en la introducción, el uso de radiación puede ser una medida de control eficaz para eliminar la contaminación microbiológica que tienen documentos de valor histórico. Sin embargo, el procedimiento físico mediante radiaciones ionizantes no sólo va a eliminar a los microorganismos, también interaccionará con el material en el que están depositados. Es por esta razón que se deberá valorar el cambio estructural que ha sufrido este material al ser irradiado a una dosis letal para los microorganismos.

Para estudiar las propiedades del material, que en este caso es papel, es necesario conocer cuáles son y cuál serviría para determinar la magnitud de un cambio estructural importante.

2.6.1 Propiedades del papel

Las características del papel pueden clasificarse en físicas, ópticas, químicas, eléctricas y microscópicas. Las características físicas incluyen las pruebas comunes de resistencia a la tensión, a la explosión, al rasgado y al doblado, así

como pruebas tales como rigidez, dureza, lisura, densidad, peso y calibre. Entre las propiedades ópticas se incluyen: transmitancia a la luz, absorción de la luz y la reflexión de la luz, las que se miden bajo la forma de opacidad, blancura, brillo y color. Las propiedades químicas incluyen características de la fibra, tales como: contenido de celulosa alfa, contenido de pentosana y viscosidad, así como numerosas pruebas relacionadas con los integrantes no fibrosos del papel, tales como pH, acidez total, contenido de colofonia, contenido de cenizas, contenido de almidón y la humedad. Las propiedades de resistencia, así como las pruebas de encolado y la penetración del aceite, en ocasiones se consideran como pruebas químicas, aún cuando la penetración sea un fenómeno físico. Las propiedades eléctricas incluyen: resistencia dieléctrica, capacidad inductiva específica y la conductividad eléctrica. Las pruebas microscópicas incluyen: determinación del tipo de fibras utilizadas en el papel, análisis cuantitativos de los elementos inorgánicos presentes y la identificación de manchas y puntos.²

Todas estas pruebas que se pueden realizar a papeles nuevos se hacen con el fin de producir el mejor papel al cambiar propiedades para conseguirlo de acuerdo al uso al que va destinado. No obstante, algunas de estas pruebas puede servir para valorar el estado de un papel ya utilizado.

2.6.2 Propiedades de resistencia del papel

La resistencia es una propiedad muy importante, debido a que el papel se usa con frecuencia en casos en que debe soportar una tensión considerable.

Son muchas las pruebas de resistencia que se efectúan con el papel, las más comunes son la resistencia a la explosión, la resistencia al rasgado, la resistencia a la tensión, la resistencia al dobléz y la rigidez. Estas propiedades son una combinación de factores tales como flexibilidad, resistencia de unión y resistencia de las fibras. Estos factores dependen, a su vez, del tipo de fibras, el largo y el grueso de éstas, sus imperfecciones, la flexibilidad de las fibras individuales, el

diseño de la red que forman las fibras, el número de uniones, la resistencia de las uniones individuales, el peso del papel, su densidad aparente, el contenido de humedad entre otros factores.²

2.6.3 Pruebas de tensión

Las pruebas a alta velocidad, en las que se aplica la carga con una velocidad elevada, adquieren más importancia como método para simular los esfuerzos a los que se somete el papel en muchos de sus usos.

El esfuerzo (σ) es la fuerza interna por unidad de área (newtons por metro cuadrado, o libras por pulgada cuadrada) que resiste el material debido a la carga externa. Tensión es la razón del cambio en dimensiones en relación con las dimensiones originales. Los sólidos elásticos ideales se deforman instantáneamente bajo la carga aplicada, de tal manera que lo hacen linealmente proporcional a la carga, y cuando se elimina la carga vuelven a sus dimensiones originales. El límite elástico es el esfuerzo máximo que la prueba soportará para regresar de nuevo a su forma original.

La prueba de tensión es una “prueba de estiramiento” en donde se monitorea la carga necesaria para producir una elongación dada conforme el espécimen se somete a tensión a una razón constante. El resultado inmediato de esta prueba es una curva de carga contra elongación. Se obtiene un planteamiento más general acerca de las características del material al normalizar, por geometría, los datos obtenidos de la prueba. La curva resultante *esfuerzo (σ) contra deformación (ϵ)* se presenta en la figura 3.

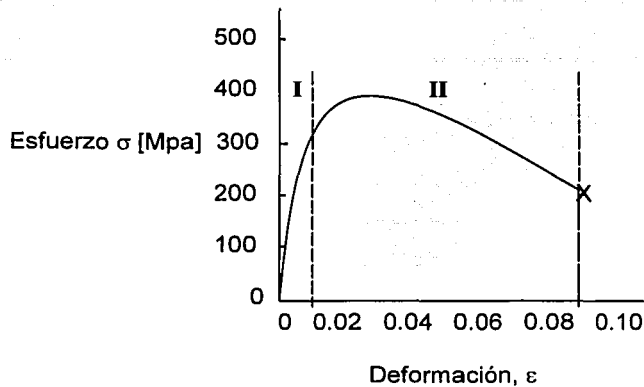


Figura 3. Gráfico esfuerzo (σ) contra deformación (ϵ) donde se observa que a $\sigma \approx 350$ Mpa, en la región I la deformación deja de ser elástica; en la región II, indica la deformación plástica.

Aquí el *esfuerzo* σ se define como

$$\sigma = P / A_0$$

donde P es la carga sobre la muestra con un área de sección transversal original A_0 (esfuerzo cero). La sección transversal de la muestra se refiere a la región cerca del centro de la longitud del espécimen. Los especímenes son maquinados de manera que el área de sección transversal en esta región sea uniforme y más pequeña que los extremos que están amordazados por la máquina de prueba (véase sección 6.2.6). Esta región de área más pequeña (se conoce como *longitud calibrada*) experimenta la concentración del esfuerzo más grande, de manera que cualquier deformación significativa a un esfuerzo mayor se localiza ahí. La *deformación*, ϵ se define como

$$\epsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0}$$

donde l es la longitud de la muestra calibrada a una determinada carga, y l_0 es la longitud original (esfuerzo cero). La figura 3 se divide en dos regiones: 1) la deformación elástica y 2) la deformación plástica. La *deformación elástica* es una

deformación temporal y se recupera totalmente cuando la carga es eliminada. La región elástica de la curva esfuerzo-deformación es la porción lineal inicial. La *deformación plástica* es una deformación permanente y no se recupera cuando se elimina la carga, aunque se recupera un pequeño componente elástico. La región plástica es la porción no lineal generada una vez que la deformación total excede su límite elástico. Con frecuencia es difícil especificar con precisión el punto en el cual la curva de esfuerzo-deformación se desvía de su linealidad y entra en la región plástica. La convención usual es definir como *resistencia a la cedencia*, la intersección de la curva de deformación con una línea recta, paralela a la porción elástica y desplazada del cero 0.2% sobre el eje de deformación (figura 4). La resistencia a la cedencia representa el esfuerzo necesario para generar esta pequeña cantidad de (0.2%) deformación permanente.

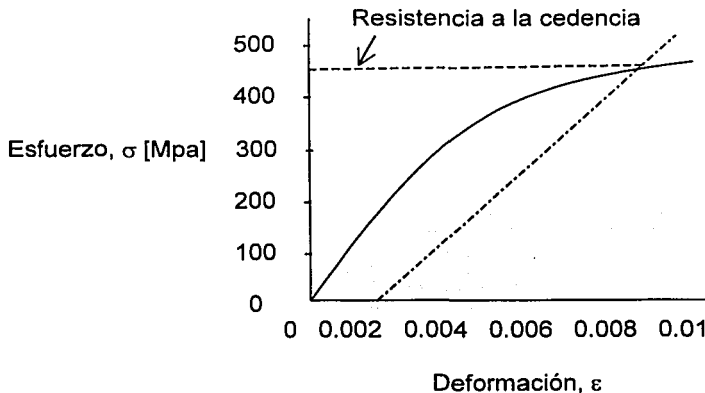


Figura 4. Gráfico Esfuerzo contra Deformación en el que se muestra la forma de calcular el valor de resistencia a la cedencia.

La figura 5 resume las propiedades que se obtienen a partir de pruebas de tensión

La pendiente de la curva esfuerzo-deformación en la región elástica es el *módulo de elasticidad*, E , que también se conoce como *módulo de Young*. La linealidad de la gráfica esfuerzo-deformación en la región elástica es un enunciado gráfico de la *Ley de Hooke*.

$$\sigma = E \epsilon$$

El módulo de Young (E) nos proporciona una información muy práctica, representa la "rigidez" del material, esto es, la resistencia a la deformación elástica. Esto se manifiesta por sí mismo como la cantidad de deformación en uso normal por debajo de la resistencia a la cedencia y la "capacidad de resorte" del material durante la deformación.^{2,15}

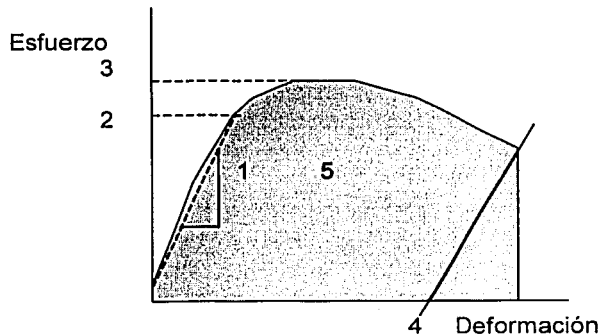


Figura 5. Las propiedades mecánicas obtenidas de una prueba de tensión:

1. módulo de elasticidad, E ; 2 resistencia a la cedencia;
3. resistencia a la tensión; 4. Ductilidad; y 5. Tenacidad.

2.7 El Microscopio Electrónico

Las pruebas microscópicas ayudan a determinar algunas características del papel, como lo son el tipo de fibras utilizadas, la identificación de manchas e impurezas, así como cualquier alteración estructural que esté presente.

Las técnicas de microscopía han revelado muchos hechos acerca de la estructura de la fibra y del papel. El valor del examen depende en gran medida de poder relacionar las observaciones que se obtienen con las aplicaciones prácticas.

Actualmente, la microscopía electrónica es una de las herramientas más utilizadas en la ciencia de los materiales, física y biología. En la ciencia de los materiales es utilizada principalmente en la caracterización de las propiedades microestructurales de diversos materiales. En la biología, proporciona información morfológica y química de material orgánico y de organismos vivos.

Un microscopio es un instrumento que nos permite observar en una muestra, detalles cuyas dimensiones son menores al límite de resolución del ojo humano (0.01 cm). Un microscopio, por lo tanto, es un sistema óptico el cual transforma un "objeto" en una "imagen". El interés primordial radica en hacer la imagen mucho más grande que el objeto, es decir, amplificarla.

El proceso físico de la formación de imágenes en el microscopio electrónico es exactamente el mismo que se tiene en un microscopio óptico. Sin embargo, existen diferencias fundamentales, las cuales son:

1. Las lentes del microscopio óptico son de vidrio mientras que en el microscopio electrónico son bobinas (lentes electromagnéticas).
2. La columna del microscopio electrónico tiene que estar a un vacío de al menos 10^{-6} Torr (1 Torr = 1 mm de Hg).
3. En el microscopio óptico las lentes tienen una distancia focal fija; el enfoque y la amplificación se realizan cambiando la posición del objetivo por medio del

revólver. En el microscopio electrónico el enfoque y la amplificación se realizan al variar la corriente de las bobinas, es decir, de las lentes electromagnéticas.

En la figura 6 se presenta esquemáticamente la comparación del proceso de formación de la imagen entre un microscopio óptico y un microscopio electrónico.

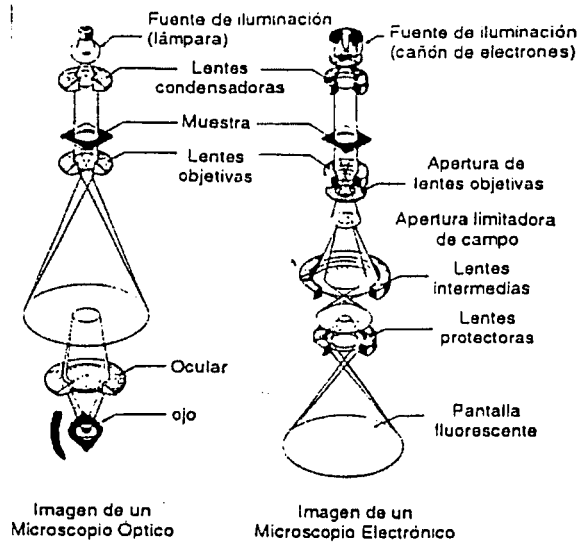


Figura 6. Mecanismos de formación de imagen en un microscopio óptico y uno electrónico

2.7.1 El concepto de resolución

El microscopio electrónico es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución, la superficie de los sólidos. La resolución se considera como la mínima distancia de separación entre 2 objetos en la cual aparecen todavía como dos entes diferentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En 1878, Ernest Abbe demostró que el poder de resolución de un microscopio está dado aproximadamente por la mitad (más preciso, por 0.6) de la longitud de onda, λ , empleada para formar la imagen. El poder de resolución aumenta si disminuye su valor de λ . Para el caso de los electrones, el valor de su longitud de onda depende del voltaje de aceleración, V , utilizado en el microscopio electrónico de la siguiente forma:

$$\lambda = 12.26 (V)^{-1/2}$$

con λ dada en angstroms (\AA) y V en volts.

La resolución está limitada por varios factores entre los que se encuentran el fenómeno de difracción, las aberraciones y el ruido. En un microscopio óptico se tiene una resolución hasta de décimas de micras, en un microscopio electrónico es hasta del orden de angstroms ($1 \text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$).

El fenómeno de difracción ocurre cuando un haz de luz que pasa a través de una apertura, se transforma en una serie de conos, los cuales se presentan como discos y son conocidos como discos de Airy.

El efecto de las aberraciones es el de distorsionar de manera particular la imagen del objeto, conduciendo a una pérdida de calidad y resolución global en la misma. Las aberraciones más relevantes que conciernen a la microscopía electrónica son: aberración esférica y astigmatismo.

El ruido se presenta en todos los tipos de microscopios debido principalmente a vibraciones alrededor del instrumento y a todos los procesos de generación de la iluminación utilizada.

2.7.2 Generación de un haz de electrones

La fuente de iluminación de un microscopio electrónico consiste de un filamento, generalmente de tungsteno (W) en forma de V. Este filamento o cátodo está colocado en un cilindro denominado Wehnelt el cual posee una perforación en su centro que es por donde pasan los electrones. A este conjunto de componentes se le denomina *cañón electrónico* (figura 7).

La generación del haz electrónico se da al aplicar un alto voltaje entre el filamento (negativo) y una de las placas, el ánodo (positivo). Fluye una corriente a través del filamento y lo calienta hasta la incandescencia, provocándole la emisión de electrones. Estos son atraídos rápidamente hacia el ánodo, que está cargado opuestamente a ellos y algunos pasan a través de la perforación central de la columna del microscopio. La presencia de una segunda placa de metal, el denominado cilindro de Wehnelt, el cual es mantenido a un voltaje ligeramente más negativo que el filamento, permite controlar el diámetro del área en la punta del filamento que emite los electrones.

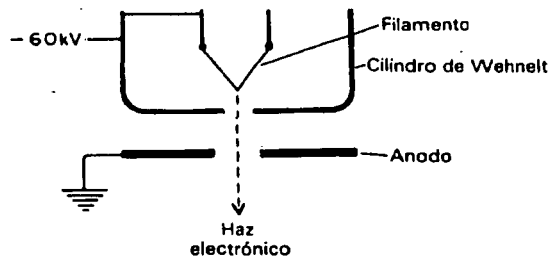


Figura 7. Esquema de la generación del haz de electrones en un microscopio electrónico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La propiedad de emitir electrones por calentamiento es común a todos los metales y es la llamada *emisión termiónica*. Cuanto mayor sea la temperatura del filamento, más electrones se emiten y, en la práctica, el filamento se construye con tungsteno que puede ser calentado por encima de los 3000°C sin que se funda.

La misión del cañón electrónico es producir un estrecho haz de electrones que circula a alta velocidad en una dirección dada. La diferencia de potencial aplicada entre el filamento y el ánodo que acelera a los electrones varía corrientemente entre 40 000 y 100 000 Volts (40-100 kV). A mayor diferencia de potencial mayor es la energía de los electrones, y como se mencionó antes, el voltaje de aceleración determina asimismo la longitud de onda de los electrones.

2.7.3 Interacción del haz electrónico con la muestra

Cuando el haz de electrones interactúa con la muestra se producen varios tipos de señales, las cuales permiten hacer la caracterización estructural y química de ésta. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X característicos (figura 8). Los electrones retrodispersados y secundarios dan información sobre la superficie de la muestra, permitiendo de este modo obtener una imagen topográfica de ella. Estos electrones son la fuente de información para el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), que se detalla más adelante en la sección 2.7.4. Los electrones absorbidos, con el detector adecuado, dan información sobre la resistividad de la muestra. Los electrones Auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra permitiendo hacer un análisis químico de ella.

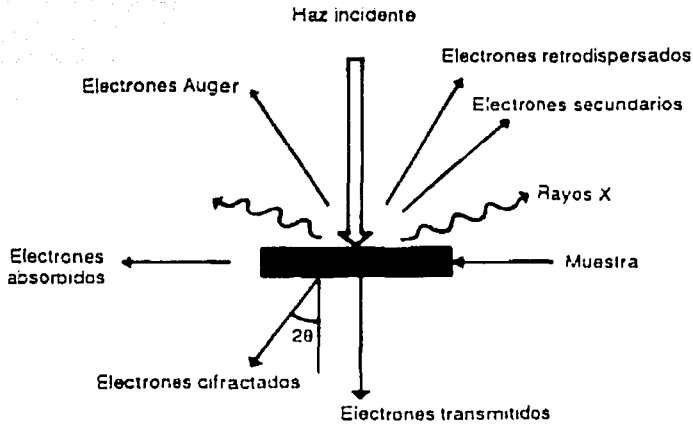


Figura 8. Tipos de señales que se producen durante la interacción haz electrónico-muestra

No suele ser habitual que un mismo microscopio esté equipado con los detectores necesarios para utilizar todas estas señales. En el caso del SEM, el equipo dispone de los tres detectores más comunes, que son el de electrones secundarios, el de retrodispersados y el de rayos X característicos.

El proceso físico mediante el cual se produce las tres señales anteriores, en un átomo de la muestra, es el siguiente:

- Un electrón 1 del haz primario choca con un electrón 2 de una capa interna del átomo y expulsa a éste de dicho átomo. El átomo queda entonces en un estado excitado ya que el electrón 2 deja una vacante en el nivel energético del que procede (figuras 9a y 9b).
- El átomo para volver a su estado fundamental, de mínima energía, desplaza un electrón 3 de un orbital más energético a la vacante dejada por el electrón 2. Para que tenga lugar este proceso, el electrón 3 se tiene que liberar de una cierta cantidad de energía, igual a la diferencia de los dos niveles energéticos involucrados en el proceso. Esta energía la libera en forma de rayos X (figura 9c).

- La vacante dejada por el electrón 3 será posteriormente ocupada por otro electrón de otro nivel más energético, produciéndose otro fotón de rayos X, y así sucesivamente.
- El electrón 2 arrancado del átomo es lo que se denomina un electrón secundario y el electrón 1 que procede del haz primario, un electrón retrodispersado.

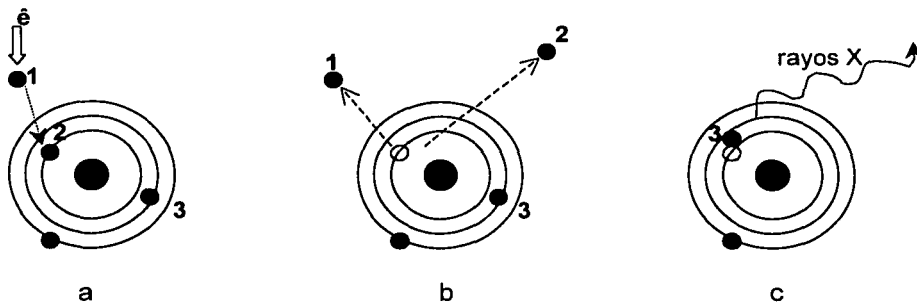


Figura 9. Proceso físico para producir un electrón secundario, retrodispersado y rayos X.

2.7.3.1 Electrones secundarios

Se les da el nombre de secundarios a los electrones que pertenecen a la propia muestra para distinguirlos de los primarios o procedentes del haz de electrones incidente. Se considera un electrón secundario aquel que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 eV. Podrían ser electrones primarios los cuales al final de su trayectoria en la muestra alcanzan la superficie con una energía remanente de algunos eV, o también electrones a los cuales se les ha transferido una pequeña cantidad de energía (a través de alguna interacción inelástica) en la vecindad de la superficie del material. El rendimiento de los electrones secundarios, es decir, el número emitido por electrón primario, puede ser muy elevado; por lo tanto, los electrones secundarios son muy abundantes y representan la señal más utilizada para formar la imagen en un SEM.

2.7.3.2 Electrones retrodispersados

Proviene de la desviación de los electrones incidentes por los campos electrostáticos de los núcleos atómicos de la muestra. Esta desviación puede ser fuerte o débil. Después de una desviación fuerte o de varias débiles, un electrón primario puede ser retrodispersado fuera de la muestra. La energía que transporta el electrón retrodispersado puede ser tan elevada como la energía del electrón primario. La razón entre el número de electrones retrodispersados y el número total de electrones incidentes es función del número atómico y crece con éste. La intensidad de la señal de retrodispersados es mayor cuanto mayor es el número atómico, este hecho permite distinguir fases de un material de diferente composición química. Las zonas con menor número atómico se verán más oscuras que las zonas que tienen mayor número atómico. Esta es la aplicación principal de la señal de retrodispersados.

2.7.4 Microscopio Electrónico de Barrido

El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, de sus iniciales en inglés Scanning Electron Microscope) es un instrumento relativamente nuevo ya que surge en la década de los setenta. El detalle esencial de este grupo de microscopios es que se emplea un haz de electrones extremadamente fino para barrer la muestra y que, además, este haz se mueve armónicamente de un lado a otro mientras la bombardea.

El SEM posee características extremadamente valiosas. La primera es que puede ser operado sobre un gran margen de aumentos de 10 a 500 000x, por lo que se alcance se extiende desde el aumento de una lupa, en un extremo de la escala, hasta el microscopio electrónico de transmisión (TEM) en el otro. La segunda característica es que posee una gran profundidad de foco (por ejemplo, a un aumento de 1000x la profundidad focal puede ser de hasta 10 μm ; en consecuencia, la superficie topográfica de los objetos puede ser examinada con

gran facilidad y las micrografías presentan una clara apariencia tridimensional). La tercera característica es que su manejo es relativamente sencillo, debido a que no hay lente alguna entre la muestra y la imagen final, y además, pueden adaptarse fácilmente otras técnicas analíticas (como un detector de rayos X característicos).

La resolución alcanzable con el SEM depende de un número de factores: el más importante es el tamaño del extremo del haz electrónico que se emplee para barrer la muestra, aunque también influye la naturaleza de esta última y la forma de interactuar con el haz, así como la velocidad de barrido y el número de líneas por imagen. En la práctica puede alcanzarse una resolución de unos 3.5 nm bajo condiciones favorables.

En la figura 10 se presentan de manera esquemática los componentes principales y el modo de operación de un SEM. En una columna a alto vacío (10^{-6} Torr) se encuentra el cañón de electrones que utiliza usualmente un filamento de tungsteno que produce un haz de electrones los cuales son acelerados con una energía entre 2 y 40 keV. El sistema de vacío es necesario dado que en su ausencia los electrones viajarían sólo algunos milímetros, ya que son fuertemente dispersados por el aire a presión atmosférica. Dos o tres lentes condensadoras disminuyen el tamaño del haz hasta lograr un haz electrónico de sección transversal pequeña y de alta energía. El fino haz de electrones es barrido de un lado a otro de la muestra utilizando bobinas de barrido mientras un detector cuenta el número de electrones secundarios o cualquier otra señal, que provenga de cada punto de la superficie.

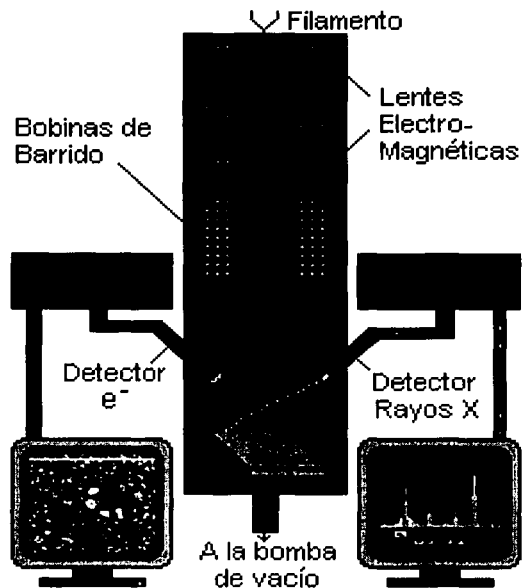


Figura 10. Esquema de los componentes principales de un SEM

2.7.4.1 Formación de la imagen

El SEM está basado en el hecho de barrer la muestra con un haz electrónico y generar una imagen punto a punto de ella. Este proceso puede ser ilustrado con la ayuda de la figura 11.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

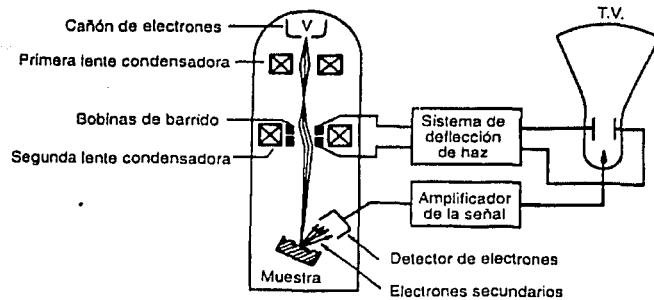


Figura 11. Modo de formación de imagen en un SEM.

Los electrones son colectados por medio de detectores apropiados y son utilizados para modular la polarización de la rejilla de un tubo de rayos catódicos (monitor de TV). De esta manera se establece una correspondencia uno a uno entre la cantidad de electrones detectada y la intensidad del punto correspondiente en la pantalla del tubo. Si la operación es repetida varias veces, barriendo la muestra, la imagen punto a punto representará las características topográficas de la superficie de la muestra. Por lo tanto, la imagen en la pantalla de televisión de un microscopio electrónico de barrido es un mapa de las intensidades de los electrones emitidos por la superficie de la muestra en observación. En otras palabras, la imagen dependerá de la capacidad de la muestra para emitir electrones secundarios. Si una región de la muestra emite más electrones que otra, la imagen correspondiente aparecerá con diferente contraste que el de una región con diferente emisión y consecuentemente se verá un contraste compuesto de zonas que van del claro al oscuro; es decir, lo que se ve es simplemente la diferencia del grado de emisión de electrones secundarios en diferentes partes de la muestra. Todos los SEM cuentan con facilidades para detectar electrones secundarios y retrodispersados y formar con ellos la imagen.

2.4.7.2 Preparación de muestras

La preparación de muestras es, en general, sencilla. Los requisitos indispensables que deben cumplir son ausencia de líquidos, es decir, la muestra tiene que estar seca y además debe ser conductora de la corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no así en otro tipo de materiales, por lo que para hacer a la muestra conductora se le recubre de una capa de algún material conductor tal como el carbón o el oro. Este recubrimiento ha de ser suficientemente grueso como para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y suficientemente delgado para que no enmascare o tape las características superficiales de interés. El recubrimiento se hace necesario para eliminar o reducir la carga eléctrica que se crea rápidamente en la superficie de la muestra cuando se barre con un haz de electrones de alta energía.^{16,17,18}

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un Archivo General tiene como objetivo conservar y preservar el patrimonio documental. Para cumplir con esta finalidad es necesario implementar programas de control que reduzcan los riesgos de pérdida de este material.

En los últimos años se ha admitido de manera generalizada que la conservación preventiva es la solución más sencilla al problema del deterioro del patrimonio documental. Mediante la mejora de las condiciones ambientales y el uso de programas preventivos se trata de alargar la vida de los documentos. Sin embargo, en la conservación documental los factores naturales de degradación de origen interno constituyen la principal amenaza.

Aunque el control ambiental reduce los riesgos de alteración, un aspecto de gran importancia es el de origen biológico. Ante la sospecha de contaminación microbiológica es necesario realizar análisis para detectar la presencia de hongos y bacterias que puedan ser nocivos para los documentos y/o potencialmente patógenos para el hombre.

La pérdida de información y el daño causado por un incontrolado crecimiento de microorganismos son evidentes en mayor o menor grado en los documentos que el archivo reserva. Por esta razón, en el presente trabajo se pretende contribuir para dar solución a los problemas de contaminación microbiológica, ya que al aislar e identificar a los principales microorganismos, estos podrán ser utilizados para determinar la dosis mínima letal de radiación gamma que los elimine. Con ello, garantizar una buena conservación de estos fondos documentales combatiendo con mayor eficacia contra los peligros que lo amenazan.

4. OBJETIVOS

4.1 Generales

1. Aislar e identificar microorganismos contaminantes que se desarrollan en los documentos resguardados en un Archivo General.
2. Establecer la dosis mínima de radiación gamma para eliminar y controlar el crecimiento de microorganismos que se encuentran en los documentos del Archivo.
3. Evaluar las propiedades mecánicas del papel antes y después de la irradiación mediante ensayos de tensión.

4.2 Particulares

- 1.1. Clasificar a los microorganismos que se encuentran en el papel mediante microscopía electrónica.
- 1.2. Aislar a los principales microorganismos que se encuentran en el papel.
- 1.3. Identificar a los principales microorganismos que se encuentran en el papel.
- 2.1. Determinar la dosis mínima letal de radiación gamma contra los microorganismos que se encuentran en el papel.
- 2.2. Corroborar la eficacia de la dosis de radiación gamma mediante técnicas microbiológicas.
- 2.3. Evaluar los cambios microestructurales del papel una vez irradiado mediante microscopía electrónica.

5. HIPÓTESIS

Al realizar el análisis microbiológico, los microorganismos que sean aislados de manera repetida y relativamente en grandes cantidades, deberán considerarse como uno de los factores que causan el deterioro del papel. Dichos microorganismos serán eliminados mediante dosis adecuadas de radiaciones gamma; produciendo cambios estructurales poco significativos en el material en que se encuentren.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material

6.1.1 Cristalería

Cajas de Petri (100 X 15)

Caja de portaobjetos

Caja de cubreobjetos

Matraz Erlenmeyer (250, 500 y 1000 ml)

Pipetas graduadas (10 ml)

Probetas graduadas (250 Y 500 ml)

Triángulos de varilla de vidrio

Tubos de ensayo (13 X 100, 18 X 150)

6.1.2 Material diverso

Algodón

Aplicadores de madera con algodón

Asas bacteriológicas

Asas micológicas

Bolsas de plástico (de 1 Kg)

Cerillos

Cinta adhesiva conductora

Cuter o navaja

Esmalte de uñas transparente

Espátula de acero inoxidable

Fanelas

Gasa

Gradilla metálica

Grafito líquido

Jeringas (10 ml)
Marcadores
Masking tape
Mechero Bunsen
Mechero Fisher
Papel aluminio
Papel couché
Papel estraza
Papel glassine
Papel seda
Pinzas de disección de punta roma
Porta muestras de aluminio para SEM
Tela de alambre con centro de asbesto
Tijeras
Tripie

6.1.3 Equipo

Balanza granataria (marca Ohaus)
Calibrador digital (marca Mitutoyo)
Cronómetro
Incubadora (marca Casa Rios)
Irradiador Gamacell (fuente de irradiación Co-60)
Olla express (marca Presto de 20 L)
Microscopio Electrónico de Barrido Phillips XL-30 y JEOL 5900-LV equipado con espectrómetro por dispersión de energía de rayos-X (EDS) para realizar análisis químico elemental
Microscopio óptico
Refrigerador (marca American)
Tensómetro Monsanto T-10

6.1.4 Reactivos

Aceite de inmersión

Agua destilada

Glicerol al 10%

Fenol al 10%

Formaldehído al 10%

Nitrógeno líquido (-170°C)

Solución salina isotónica estéril

Tetraóxido de osmio

Tinción de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina

Tinción de hongos: azul de algodón lactofenol

6.1.5 Medios de cultivo

Agar dextrosa y papa (PDA) BIOXON

Agar MacConkey MERCK

Agar nutritivo (AN) BIOXON

Agar Sabouraud dextrosa (ASD) DIFCO

Agar Soya Trypticaseína (AST) BIOXON

6.1.6 Material archivístico

Las "muestras" enviadas por el Archivo General de la Nación para su análisis fueron: 1) partes de hojas de documentos que datan de los años de 1583, 1690, 1702, 1765, 1801, 1879. 2) Polvos de diferentes áreas de las instalaciones, así como de diferentes zonas en los acervos. De la Galería 2 polvos de: acervo 3 (Dirección General de Investigaciones Políticas y Sociales caja 677 año 1972), acervo 31 (Dirección General de Servicios Coordinados Prevención y Readaptación Social año 1961), acervo 66 (Caja de Préstamo caja 71 año 1934). De la Galería 3 del: acervo 1 (Madero caja 4 año 1911-1913). De la Galería 4 de:

libros, acervo 4 (Civil Vol. 1886 años 1828-1854), acervo 8 (Hospital de Jesús Vol. 489 años 1569-1592), acervo 27 (Inquisición Vol. 100 año 1571), acervo 31 (Bienes Nacionales Ley 118 año 1879), acervo 38, ventana del acervo 37, tablero de luz, corrisa. De la Galería 5 de: archiveros, suelo, librero, corrisa, barandales (1,2,3), acervo 44 (Gobernación Indiferente Núm. 1168 año 1940-1945), acervo 46 (Movimiento Marítimo Vol. 101 1880), acervo 115, acervo 152 (Secretaría de Comunicaciones y Obras Públicas año 1872), acervo 165 (Relaciones Exteriores Vol. 1 año 1868). De la Galería 6 de: acervo 3 (Renta de Tabaco Vol. 499 año 1807), acervo 11 (Aduanas Vol. 1000 año 1879), acervo 51 (Hacienda Pública segunda serie año 1824), acervo 59 (Deuda Externa Vol. 12 año 1824). De la Galería 7 de: acervo 15 (Marquesado de Salvatierra caja 1 año 1652), acervo 20 (Carlos Lazo obra gráfica caja 113 año 1940), acervo 23 (Lienzos de Robledo caja única sin fecha), acervo 38 (Archivo –comprobantes- Vol. 1869). Así como polvos de restos de carpetas; del exterior de las galerías; de las puertas 3 y 4; de la barda del torreón 3 y 4.

6.2 Métodos

6.2.1 Examen preliminar en SEM

Preparación de la muestra. Se colocó un pequeño trozo del papel (documento) sobre un portamuestra, la cual contenía una capa de carbón líquido. Luego se recubrió con una capa muy fina de aproximadamente 100 Å de un elemento subs conductor como el oro. La superficie de recubrimiento se depositó mediante evaporación en vacío (técnica conocida como "pulverización"): se calienta un trozo de hilo de metal hasta la incandescencia en una cámara de vacío con el material a corta distancia. De esta manera, el espécimen estaba listo para ser examinado en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). En el caso de los polvos, éstos fueron depositados en el portamuestras con ayuda de una cinta de carbón adherible.

6.2.2 Aislamiento

El trabajo se realizó en condiciones de esterilidad.

Se sembró el material en placas de agar nutritivo, agar soya tripticaseína, agar Sabouraud y agar dextrosa y papa. Tomando pequeños trozos del papel dañado con pinzas de disección, y colocando un fragmento por cada caja de agar. En cuanto al material en polvo, este se sembró humectando un hisopo con solución salina isotónica estéril.

Las placas de agar nutritivo y agar soya tripticaseína se incubaron durante 24-48 horas a 30-37°C. Se examinaron extensiones teñidas por Gram de cada colonia desarrollada. Se resembró la colonia aislada en tubos de agar inclinado de soya tripticaseína, incubándose a las condiciones anteriores y después se conservaron en refrigeración a 8-10°C.

Las placas de agar Sabouraud y agar dextrosa y papa se incubaron a 25-28°C durante 6 u 8 días examinándose los cultivos diariamente. Se resembró cada colonia aislada en tubos de agar inclinado de Sabouraud, se incubaron a las mismas condiciones y después se conservaron en refrigeración.

6.2.3 Identificación

El trabajo se realizó en condiciones de esterilidad.

Bacteriológica. Resiembra de cada colonia aislada en placas de agar soya tripticaseína, agar sangre y agar MacConkey por técnica de estría cruzada para observar características morfológicas de la colonia. Se hicieron tinciones de cada colonia diferente y se observó su morfología microscópica.

En cuanto a los hongos, estos constituyen un grupo de microorganismos de los más variables y polimorfos, por lo que los detalles de su morfología sólo pudieron ser observados por técnicas microscópicas obteniéndose así, las principales

estructuras de cada grupo. Para ello fue necesario realizar la técnica de microcultivos.

Microcultivo. Se tomó un pequeño trozo en forma circular de agar dextrosa y papa de 1 cm de diámetro con un grosor de aproximadamente 0.3 cm. Esto se realizó usando un tubo estéril de 13X100 sin reborde.

- En la caja de Petri equipada para microcultivo: sobre la varilla de vidrio se colocó el portaobjetos y a su vez sobre éste se depositó el trozo de agar. Para realizar esta operación se utilizó una espátula o las pinzas de disección esterilizadas.
- Se inoculó los cuatro costados en forma simétrica el trozo de agar con el hongo obtenido en el cultivo en tubo.
- Sobre el trozo de agar inoculado se depositó el cubreobjetos con ayuda de las pinzas de disección.
- Al término de estas operaciones, se depositaron 5 ml de glicerol al 10% en la base de la caja, cuidando no rebasar el nivel del triángulo de vidrio. Se tapó la caja.
- Se incubaron a 28°C durante 2 a 5 días. Diariamente se revisó el crecimiento del hongo.
- Cuando ya estaba completada la maduración del cultivo, se le adicionó de 1 a 3 ml de formaldehído al 10% en la caja y se dejó durante media hora.
- Una vez inactivadas las esporas, se retiró con sumo cuidado el cubreobjetos y se colocó en un portaobjetos que contenía una gota de azul de lactofenol. Por otra parte, se retiró el trozo de agar y se desechó en un frasco con fenol al 10%. Al portaobjetos restante se le aplicó una gota de azul de lactofenol y se le puso un cubreobjetos.
- Para obtener un montaje semipermanente, ambas preparaciones se sellaron con esmalte transparente.
- Se observaron al microscopio y se compararon las estructuras observadas con las ya reportadas en la literatura.^{5,6,7}

Los microcultivos se hicieron por duplicado, uno de ellos se preparó para su estudio en el SEM, los portaobjetos obtenidos se introdujeron en nitrógeno líquido e inmediatamente después se recubrieron por "pulverización" con una capa de oro de 100 Å de espesor, posteriormente la parte inferior del portaobjetos se cubrió con un material conductor, ya sea cinta de carbón o grafito en forma líquida.

El estudio mediante microscopía, se basó fundamentalmente en buscar las estructuras de reproducción, que suelen ser características de cada género.

Las características macroscópicas, se estudiaron en placas de agar Sabouraud dextrosa y agar Papa-Dextrosa; observándose el tipo de desarrollo y características propias de la colonia, como son: tiempo de crecimiento, aspecto y color de la colonia, coloración al reverso y difusión de pigmento en el medio de cultivo.

6.2.4 Procedimiento pre-irradiación

Un pliego de papel couché se dividió en dos zonas, una se marcó como ZNI (zona no irradiada), y la otra como ZI (zona irradiada). Sobre ambas zonas se cortaron unas tiras (denominadas probetas) con dimensiones específicas de acuerdo a la norma ASTM-D 828-93.¹⁹

Se desarrollaron cultivos puros en tubos de 13 X 100 con agar inclinado, sólo de especies distintas. Para bacterias se utilizó agar nutritivo y para hongos agar Papa-Dextrosa.

6.2.5 Irradiación

La irradiación se llevó a cabo con gammas del Cobalto 60 en el irradiador Gamacell. Se irradiaron cinco probetas de papel couché de la ZI por cada tubo de cultivo a diferentes dosis hasta determinar la mínima letal para los

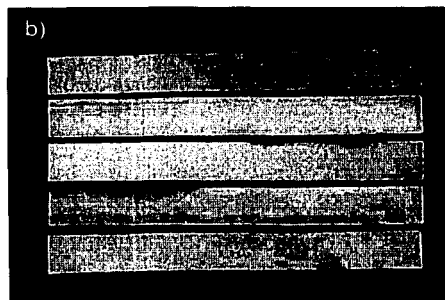
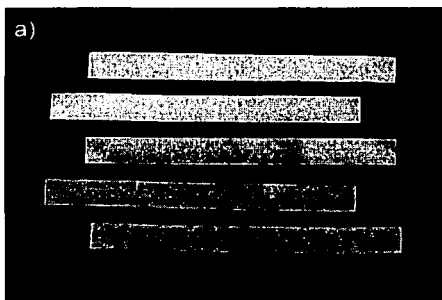
microorganismos. Por medio de técnicas de cultivo se comprobó la eliminación total de estos.

En cada corrida se verificó la razón de dosis a la cual se encontraba el irradiador en ese momento.

6.2.6 Ensayos de Tensión

La tenacidad del papel couché, normales e irradiadas, fue determinada por el método convencional con un Tensómetro Monsanto T-10, bajo las siguientes condiciones de prueba:

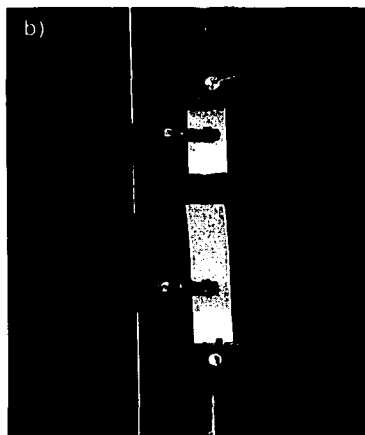
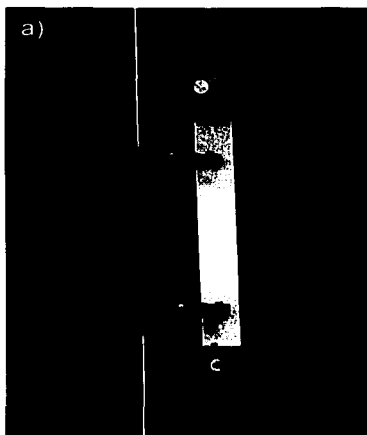
- Probetas dimensionadas de acuerdo a la norma ASTM-D 828-93 (figura 12).
- Intervalo de carga: 10 kN
- Velocidad de deformación: 10 mm/min
- Longitud calibrada: 110 mm
- Temperatura ambiente (18-20°C)



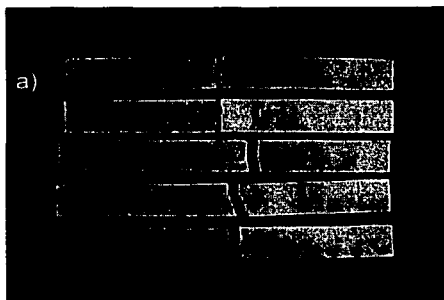
Figuras 12. Probetas para ensayos de tensión con dimensiones de 1' X 10'.
(a) papel couché; (b) papel antiguo, año 1911.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las figuras 13 y 14 se muestran las condiciones experimentales bajo las que se realizaron los ensayos de tensión.



Figuras 13. Vista de probetas de papel couché en área de trabajo del Tensómetro Monsanto T-10. a) probeta a ensayar y b) probeta ensayada.



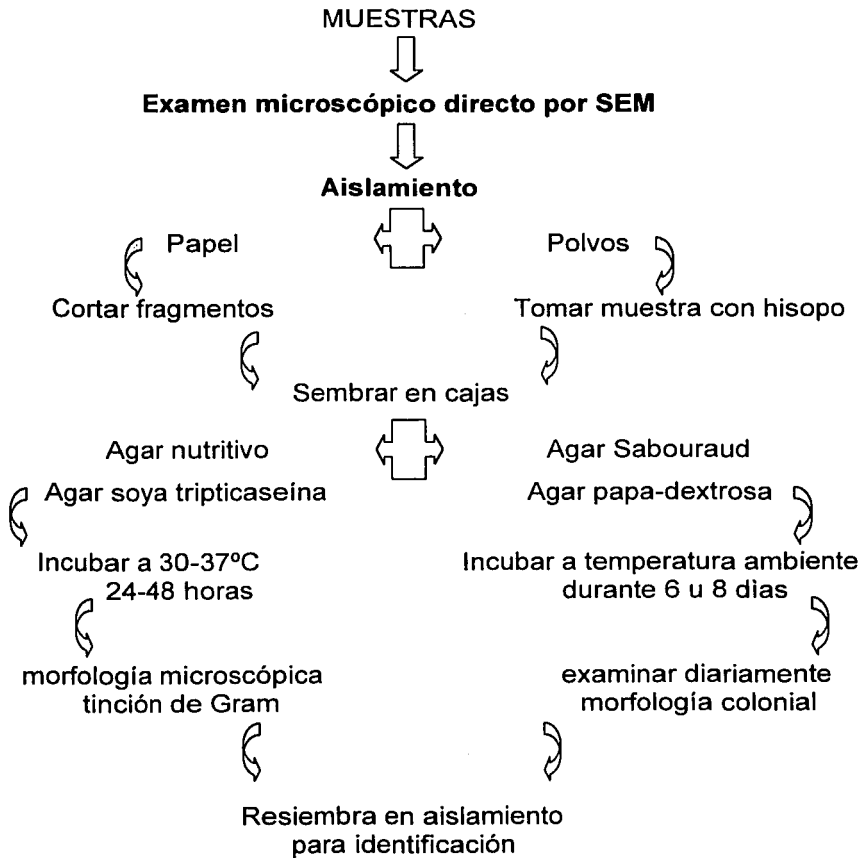
Figuras 14. Probetas después del ensayo de tensión. a) papel couché, b) papel antiguo, 1911.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

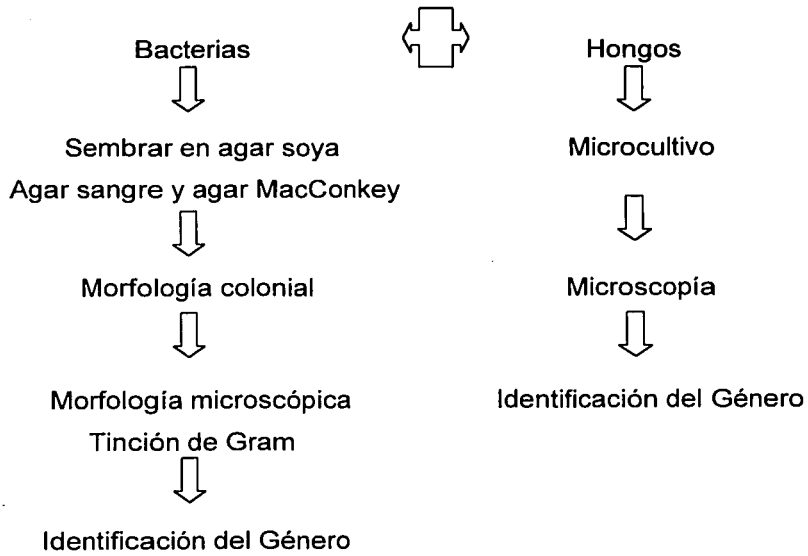
6.2.7 Análisis microscópico

Algunas de las muestras de papel utilizadas en los ensayos de tensión fueron examinadas con un SEM, obteniéndose imágenes que fueron comparadas de acuerdo a la dosis de radiación recibida con respecto al papel no irradiado.

6.3 Diagrama de flujo



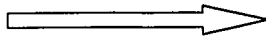
Identificación



Pre-irradiación

hacer probetas
de papel couché

preparar cultivos puros
en tubo de cada especie



Irradiación con Gamma de Co-60

Técnicas de cultivo
microbiológico

Análisis del papel

Examen
Microscópico

Ensayos
de Tensión

7. RESULTADOS

7.1 Deterioro de documentos

En las figuras 15-17 se muestran documentos del Archivo General que presentan deterioro.



Figura 15. Libro editado en 1911, mostrando deterioro por microorganismos.



Figura 16. Documento del año 1801, muestra daños con pérdida parcial de información.

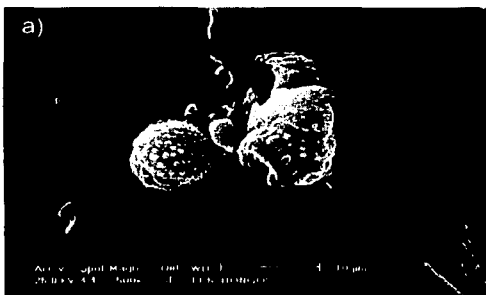


Figura 17. Documentos del año 1879, donde se observan las condiciones en que se encuentra este material, por causa de microorganismos.

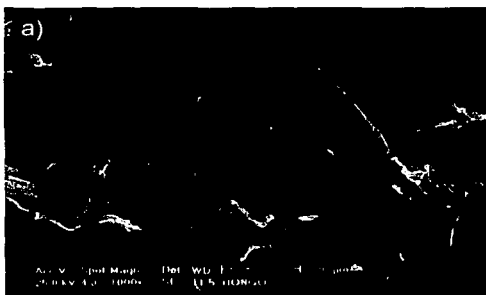
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.2 Examen microscópico directo de las muestras.

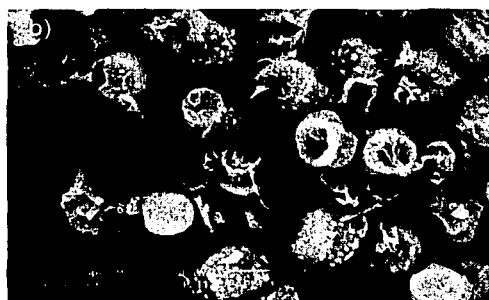
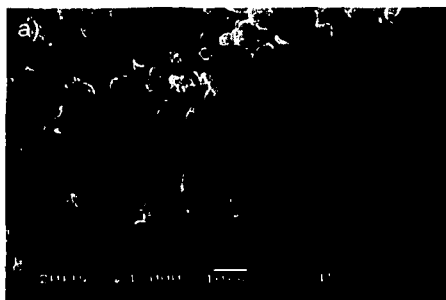
En las figuras 19-22 se muestran imágenes obtenidas por SEM de documentos del Archivo.



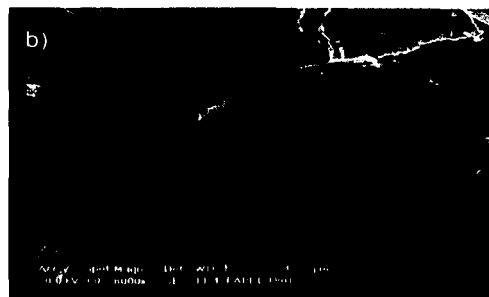
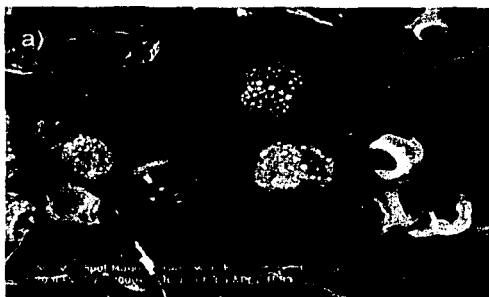
Figuras 18. a) Micrografía obtenida por SEM a una magnificación de 2000x donde se observan esporas de aproximadamente 8 μm de diámetro. b) Micrografía a 8000x de una espора de diámetro 4 μm , con superficie lisa.



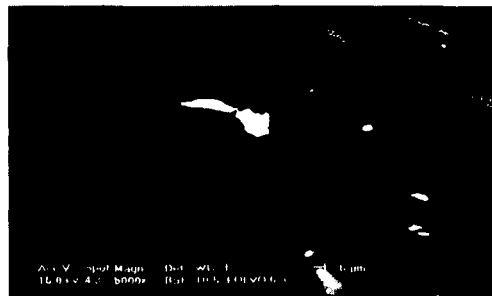
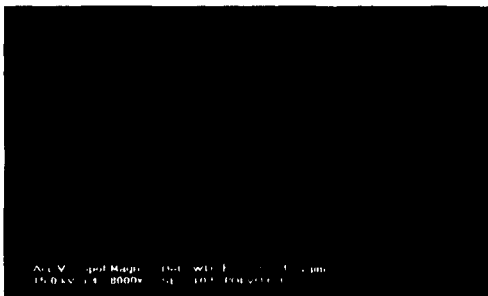
Figuras 19. Micrografías mostrando estructuras microbianas en documento del año 1801. a) Imagen a 1000x, b) Imagen a 5000x



Figuras 20. Micrografías de papel del año 1583. Obsérvese gran cantidad de esporas; a) 1000x, b) 2000x.



Figuras 21. Micrografías que muestra el efecto destructivo en las fibras del papel, y la presencia de microorganismos.



Figuras 22. Micrografías en donde se observan bacterias en forma bacilar, encontradas en polvo recolectado en el sitio de almacenamiento de los documentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

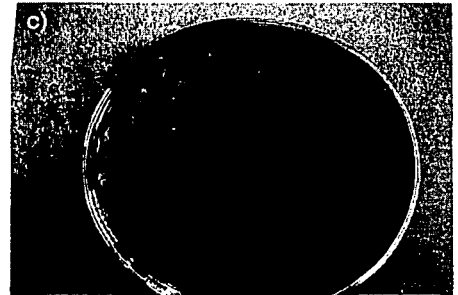
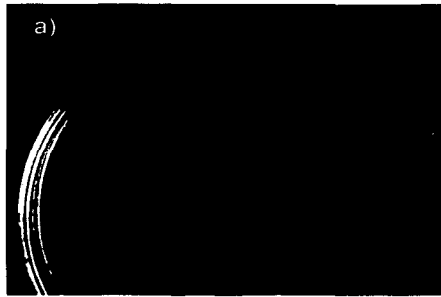
7.3 Identificación de microorganismos

Se identificaron el género *Bacillus*, en cuanto a bacterias y *Rhizopus*, *Penicillium*, *Hormodendrum*, *Fusarium* y *Alternaria*, del reino fungi; todos ellos aislados a partir de muestras de papel antiguo.

En la tabla I se describen las características de cultivos de bacterias obtenidos en placas de Agar Soya Trypticaseína e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

TABLA I

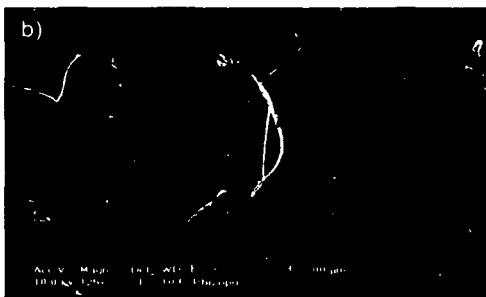
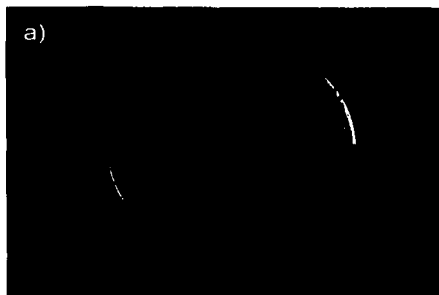
GÉNERO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
<i>Bacillus</i> (figura. 23a)	Tamaño: 2 a 4 mm	Bacilos pequeños grampositivos, en agrupaciones individuales; abundantes bacilos esporulados con endosporas centrales y ovaladas (figura 23d).
	Forma: circular	
	Borde: ligeramente filamentoso	
	Color: crema	
	Superficie: lisa	
	Elevación: plana	
	Luz reflejada: brillante	
	Luz transmitida: translúcida	
	Consistencia: suave, cremosa	
Otras: beta hemolítica		
<i>Bacillus</i> (figura. 23b)	Tamaño: irregular	Se observan sólo bacilos esporulados con endosporas centrales ovaladas y subterminales casi redondas.
	Forma: crateriforme	
	Borde: filamentoso y blanco	
	Color: crema con orilla blanca	
	Superficie: rugosa	
	Elevación: elevada	
	Luz reflejada: opaca	
	Luz transmitida: opaca	
	Consistencia: seca	
Otras: beta hemolítica (figura 23c)		



Figuras 23. Género *Bacillus*, a) cultivo en agar soya tripticaseína, presentando la variante lisa; b) mismo medio, variante rugosa; c) cultivo en agar sangre mostrando beta hemolisis; d) Tinción de Gram que muestra bacilos positivos de color morado y esdosporas claras, sin teñir (tomado de josecortez.com).

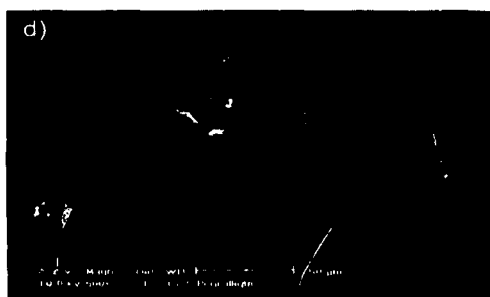
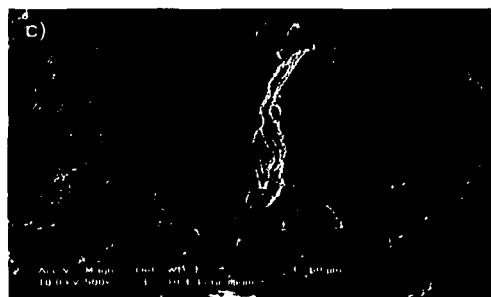
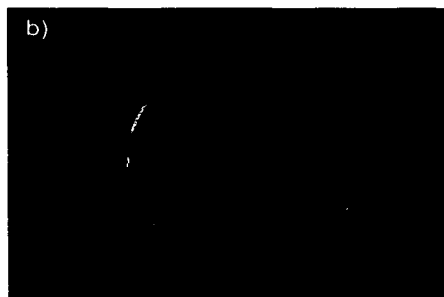
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las figuras 24-28 se muestran imágenes típicas con las características de cultivos de hongos de diferentes géneros, obtenidos en placas de agar papa-dextrosa y agar Sabouraud-dextrosa a temperatura ambiente.



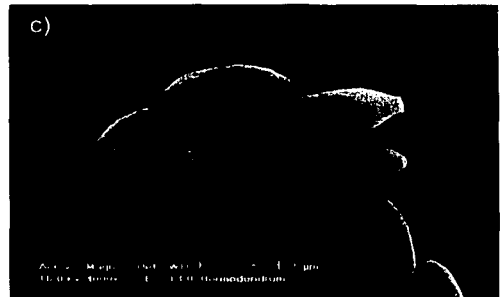
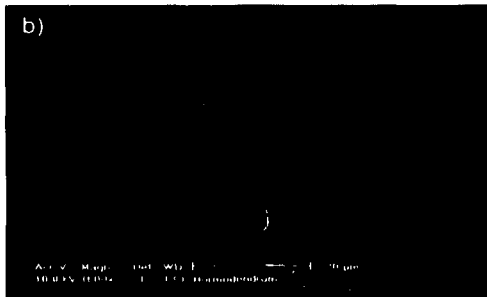
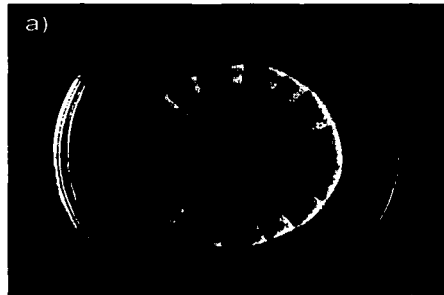
Figuras 24. Género *Rhizopus*. a) Hongo que crece rápidamente y llena la caja de Petri en cuatro días, la colonia con aspecto algodonoso y abundante es al principio blanca, después toma un color gris oscuro. b) Género que produce rizoides que se encuentran inmediatamente adyacentes a los esporangióforos, estos últimos terminan en esporangios llenos de esporas globulosas (c).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



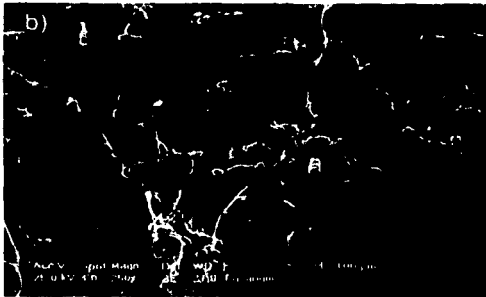
Figuras 25. Género *Penicillium*. La colonia crece rápidamente al principio es blanca, pero después toma un color azul-verde y aspecto aterciopelado, a) cultivo en agar Sabouraud; o verde olivo con superficie polvosa, b) cultivo en PDA. c) y d) Las hifas portadoras de esporas forman el "pincel" o cepillo característico; e) y f) los conidios aparecen en cadenas no ramificadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



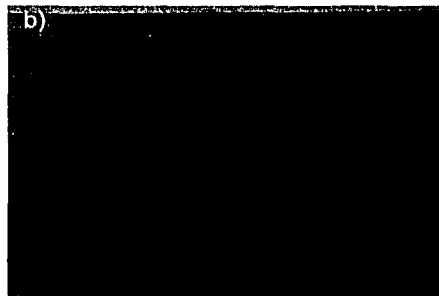
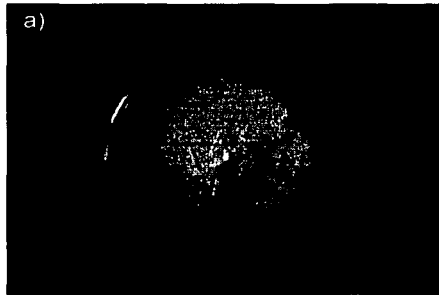
Figuras 26. Género *Hormodendrum*. Colonias que crecen en ocho días, aparece como un crecimiento grisáceo a verde claro, polvoriento; el reverso de la colonia es negro, a) cultivo en agar Sabouraud. b) Las estructuras conidiales forman los racimos "arboriformes" característicos; c) los conidios son alargados u ovals.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figuras 27. Género *Alternaria*. a) Hongo de crecimiento rápido (4 cm de diámetro, cinco días), colonia densa, grisácea, después negro con bordes grises; superficie lisa algodónosa de gris a blanco; el reverso de la colonia es negro. b) Los conidióforos son simples pero, en ocasiones, ramificados; c) los conidios son grandes ($\approx 50\mu\text{m}$) y se producen en cadenas y tienen la forma característica de "palillo de tambor".

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figuras 28. Género *Fusarium*. a) Hongo con crecimiento de 5 cm en cinco días, es al principio blanco y algodonoso, pero rápidamente desarrolla un color rojo-anaranjado; el pigmento tiende a colorear el medio, cultivo en agar papa-dextrosa. b) conidios multitabacados, largos, en forma de media luna, son estructuras típicas del género, 500x (tomado de Finegold S M, Diagnóstico microbiológico⁷).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.4 Dosis mínima letal de radiación gamma contra los microorganismos

En la tabla II se observa la relación entre la dosis a la que fueron sometidos los microorganismos y el efecto en el desarrollo de los mismos en condiciones óptimas de laboratorio.

TABLA II

DOSIS DE RADIACIÓN [Gy]	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO [Resiembra de cultivos]
2000	Positivo*
2100	Positivo
2200	Positivo
2300	Positivo
2400	Positivo
2500	Positivo
2700	Positivo
3000	Positivo
4000	Positivo
6000	Positivo
10 000	Negativo**
8000	Negativo
7000	Negativo

*Positivo: Crecimiento del microorganismo.

**Negativo: No presentó crecimiento alguno el microorganismo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.5 Ensayos de Tensión

La pruebas de tensión sobre papel irradiado y no irradiado permitió evaluar el efecto de las dosis de irradiación utilizadas en las propiedades mecánicas del papel.

En la tabla III se presenta la comparación de los resultados de los ensayos de tensión a las diferentes dosis de irradiación utilizadas en papel couché, el cual es frecuentemente utilizado en la elaboración de libros.

TABLA III.- Valores promedio de ensayos de tensión en papel couché.

	Esfuerzo máximo [Mpa]	Elongación [%]	Módulo de Young [Mpa]
No irradiado	29.14	2.08	45.40
2100 Gy	27.99	3.13	40.72
3000 Gy	27.22	1.75	38.62
4000 Gy	26.77	4.18	21.50
7000 Gy	26.77	2.82	36.42
8000 Gy	23.95	3.78	20.10
10 000 Gy	25.60	3.56	21.78

Como puede apreciarse en la tabla III, el esfuerzo máximo de rompimiento del papel en la dosis letal, 7000 Gy, tiene una variación del 8.13% respecto al papel no irradiado. Esta diferencia indica que se requiere de un esfuerzo similar para alcanzar su máximo de elongación y llegar a la ruptura.

En cuanto la elasticidad asociada a la variable elongación, esta sufre un aumento después de la irradiación del 35.6%, respecto al valor del papel no irradiado, es decir, el papel se estira un 35.6% más cuando se irradia a la dosis letal. Esto podría describirse como un aumento en sus propiedades elásticas.

Por lo que respecta al módulo de Young, que representa el comportamiento elástico lineal del papel, es decir, nos proporciona información de la capacidad que tiene el material (en este caso el papel) de elongarse al aplicar una fuerza y de recuperar su estado inicial, presentó una variación del 19.8%, tomando como referencia los valores del papel no irradiado y la dosis letal de irradiación para los microorganismos (7000 Gy). Este valor indica una mejoría en las propiedades elásticas del papel después de ser irradiado.

En la tabla IV se presentan los resultados de los ensayos de tensión a diferentes dosis de irradiación utilizadas en papel de un documento que data de 1911.

TABLA IV.- Valores promedio de ensayos de tensión en papel de un documento del año 1911.

	Esfuerzo [Mpa]	Elongación [%]
No irradiado	28.03	0.58
4000 Gy	21.37	0.43
7000 Gy	27.01	0.45
10 000 Gy	11.17	0.40

Analizando los resultados presentados en la tabla IV, se aprecia que para el papel antiguo sometido a pruebas mecánicas, existe apenas un 3.8% de diferencia en el esfuerzo máximo de rompimiento entre el papel sin irradiar y el irradiado a la dosis letal (7000 Gy). Por lo que respecta a la elongación, el papel antiguo pierde 28.9 % su capacidad de elongación. Cabe aclarar que en este caso, el porcentaje es poco representativo considerando los valores reportados en la tabla para ambos casos (0.58% y 0.45% respectivamente).

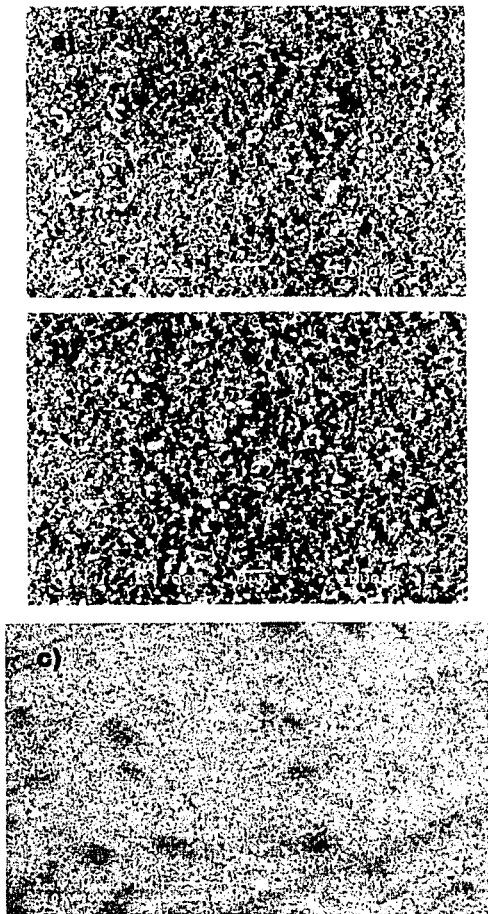
Respecto al módulo de Young, en este caso no se presentan valores de él debido a que no presentó un comportamiento elástico lineal, tal como se muestra en los gráficos de Esfuerzo Vs Deformación presentados en el anexo I.

Cabe destacar la diferencia en la variable elongación entre el papel couché y el papel antiguo. Mientras que el primero tiene la capacidad de elongarse arriba del 2% respecto a su tamaño original, el papel antiguo lo hace en valores cercanos al 0.5%, lo cual representa una variación muy significativa del 75% mayor en capacidad de elongarse del papel couché. Esta diferencia en capacidad de elongación esta asociado a tres factores, materiales utilizados en la fabricación del papel, su manufactura y daños por microorganismos.

Respecto al esfuerzo máximo de rompimientos en los casos presentados en las tablas III y IV puede apreciarse que en ambos casos son del orden de 25 Mpa.

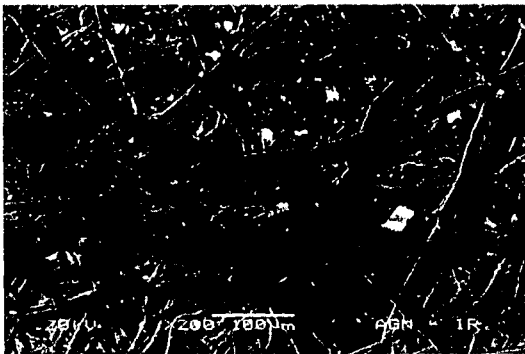
7.6 Análisis microscópico del papel

En las figuras 29 y 30 se muestran imágenes obtenidas por SEM, donde se aprecia su microestructura antes y después de ser irradiado. en general su microestructura no presentó cambios significativos.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figuras 29. Micrográficas de papel couché, a) no irradiado, b) irradiado a 4000 Gy, y c) irradiado a 7000 Gy.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figuras 30. Micrografías de papel antiguo del año de 1911. a) no irradiado
b) irradiado a 4000 Gy, y c) irradiado a 7000 Gy.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las bacterias y los hongos son cosmopolitas por dos principales razones: 1) en muchos sitios existen las condiciones favorables para la vida de estos y, 2) la más importante que se refiere a la fácil distribución de los mismos por sus esporas, que por lo general son capaces de tener vida latente durante años y soportar condiciones muy adversas. Como son microscópicas, son transportadas fácilmente por las corrientes de aire a diferentes lugares. Así, en los libros, revistas, periódicos y artículos manufacturados con piel, pueden aparecer manchas de coloraciones diversas y perforaciones, hasta la degradación total del material por la acción destructiva de estos microorganismos. En las figuras 15-17 se muestran algunos ejemplos de dichos daños, observados en las muestras analizadas.

Por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), se observó una gran cantidad de estructuras que a simple vista parecen ser esporas microbianas (figuras 18-21), y también células bacterianas de forma bacilar (figuras 22). Asimismo se observó el deterioro de las fibras de celulosa que constituyen estos documentos (figura 21). Sin embargo, fue necesario el análisis microbiológico el cual reveló la identidad de los microorganismos, lo que constituyó la primera etapa experimental.

La identificación de bacterias y hongos aislados se basó en sus propiedades morfológicas, las cuales comprendieron datos generales sobre aspectos macroscópicos y microscópicos de los cultivos.

Se obtuvo un tipo de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, el cual incluye muchas especies de bacilos grampositivos, aerobios o facultativos y esporulados. Con excepción de una especie, *B. anthracis*, son saprófitos comunes en el aire, el suelo, el agua, el polvo. El género comprende microorganismos de forma bacilar y está puede variar desde cocobacilar hasta filamentosa. La formación de esporas redondas u ovals, que pueden ser centrales, subterminales o terminales,

dependiendo de la especie, es característica del género. Crece en medios ordinarios incubados en aerobiosis. Manifiestan diversas morfologías coloniales, que van desde finamente granuladas a húmedas, de membranosas con rugosidades y de difusión uniforme. Las colonias varían entre 1 y 5 mm de diámetro, aunque pueden ser más grandes, opacas, mates, aplanadas y pueden ser mucoides o secas; algunas especies son β - hemolíticas.^{20,21}

En la tabla I se reportan las principales características que se obtuvieron al examinar cultivos de estas bacterias, se compararon con los descritos en la literatura, y se determinó el género al que pertenecían. Las figuras 23 muestran estas características en placas de agar soya tripticaseína.

En cuanto a los hongos, estos constituyen un grupo de microorganismos de los más variables y polimorfos. Los detalles de su morfología sólo pudieron ser observados por técnicas microscópicas, obteniendo así, las principales estructuras de cada grupo. De esta forma se identificaron los siguientes:

Rhizopus. Produce colonias de muy rápido crecimiento, vellosas o algodonosas, inicialmente son blancas pero cambian a gris o negro con la madurez a medida que se forman esporas (figura 24a) Microscópicamente, las hifas son anchas, como cintas, de diámetro irregular y no son tabicadas; las estructuras de reproducción son sacos denominados esporangios dentro de los cuales se producen esporas esféricas denominadas esporangiosporas (figura 24c) Cada esporangio está sostenido por una extensión hifal especial denominada esporangióforo. Cada esporangióforo termina en una tumefacción globosa llamada columena que está encerrada dentro del esporangio. A medida que la colonia madura, la pared del esporangio se debilita hasta que finalmente se rompe liberando las esporangiosporas. El género *Rhizopus* puede diferenciarse de otros porque produce estructuras como raíces denominadas rizoides, que se encuentran inmediatamente adyacentes a los esporangióforos, y se conocen como derivación nodal (figura 24b).

Penicillium. La morfología de las colonias puede tener un valor limitado para la identificación debido a las variaciones causadas por diferencias en los tipos de medios de cultivo usados, como en este caso. La colonia de la figura 25b muestra una tonalidad verde olivo con una superficie de polvosa a granular; en cambio la de la figura 25a es verde-azulada y la superficie es aterciopelada, con formación de pliegues radiales y presenta gotas de exudado. Pero ambas colonias, microscópicamente, tienen el aspecto característico que es la ramificación en forma de cepillo de los conidióforos que semejan a los dedos de una mano (figuras 25c y 25d). Los conidios están en cadenas bastante largas no ramificadas, y pueden desprenderse con suma facilidad (figura 25f).

Hormodendrum. Las colonias son gruesas, aterciopeladas o pueden verse polvorientas, de grisáceas a verdes; el reverso de la colonia es gris a negro (figura 26a) Por examen macroscópico puede parecerse a *Penicillium* pero este no tiene pigmentación oscura en el reverso. Las conidias se disponen en grupos sobre las estructuras conidiales ramificadas que tienen un aspecto "arboriforme" (figura 26b). Los conidióforos son de longitudes diversas y sostienen las cadenas de conidios, estos últimos pueden ser alargados u ovals (figura 26c), separados por pequeños cuerpos oscuros de celulosa y formados por gemación continua, son unicelulares en cultivos jóvenes, pero más tarde se dividen por tabicación para formar conidios de dos o más celdas.

Alternaria. La colonia desarrolla su micelio cerca de la superficie del agar, gris al principio, después negra con periferia grisácea (figura 27a), el reverso de la colonia es negro. Al principio el micelio aéreo no es abundante, pero después desarrolla áreas de micelio aéreo algodonoso, liso, blanco, que pronto se torna blanco mate a gris y que finalmente puede cubrir el micelio negro en esporulación. Microscópicamente las hifas son tabicadas, y los conidióforos son simples pero, en ocasiones, ramificados. A partir de los extremos de los conidióforos se producen los conidios muriformes típicos en cadena, de color pardo oscuro y con

tabicaciones longitudinales y transversales. Cada conidio producido por gemación del inmediatamente inferior, es oval con "pico" largo (generalmente) y posee una mancha oscura pronunciada en el punto de fijación.

Fusarium. Este hongo puede sospecharse en medios de cultivo debido a la propensión a producir pigmentos color lavanda, púrpura o rojo-rosado que colorean el micelio y el reverso del agar. La consistencia de la colonia habitualmente es algodonosa o lanosa con menos tendencia a hacerse granulosa (figura 28a). Microscópicamente, tiene micelio septado, fiálides individuales o en grupos condensados, y conidióforos con ramas irregulares; además este hongo es uno de los pocos hongos saprófitos que producen macroconidias y microconidias. Microconidias unicelulares que se originan en pequeñas cabezuelas en las puntas de las fiálides cortas. La identificación de *Fusarium* puede confirmarse observando las características macroconidias multicelulares grandes, con forma de bote u hoz.

Los microorganismos descritos en los párrafos anteriores, fueron los que predominaron en las muestras de papel antiguo; pero el análisis microbiológico realizado a los "polvos" reveló que estos contenían gran variedad de microorganismos de distintos géneros; sin embargo, se descartaron todos aquellos que no coincidieron con las características morfológicas de los encontrados en los documentos, aún así se encontraron tres de estos géneros: *Bacillus*, *Rhizopus* y *Penicillium*. También, cabe mencionar que muy pocos "polvos" presentaron cultivos cuyas morfologías no correspondían a ningún género encontrado en el papel. En consecuencia, esto nos hace pensar que el lugar donde son resguardados los documentos, no necesariamente es la fuente de contaminación y por el contrario, los mismos documentos podrían estar contaminando estos sitios. Por esta razón, al obtener el control microbiológico sobre este material, también deberán emplearse procedimientos que nos den una buena sanitización de los sitios, acervos, anaqueles, etc.

Para controlar y eliminar a los microorganismos, en este trabajo se propuso la aplicación de radiaciones gamma (γ). Este tipo de radiación es mucho más penetrante en comparación con las radiaciones ultravioletas que también se utilizan en el control microbiológico por lo tanto deben considerarse algunos aspectos importantes relativos a la dosis, pues de ella depende el daño causado a cualquier material que sea expuesto. Estos aspectos fueron enfocados primordialmente al posible daño que altere las propiedades estructurales del papel a la dosis letal para los microorganismos. Esta es la razón por la cual se determinó la dosis mínima letal, considerando el posible efecto destructivo que ocasionaría en los documentos.

En la tabla II se muestra las dosis a las que fueron sometidas cada una de las series de cultivos y el resultado del análisis microbiológico correspondiente. Al no obtener información respecto a una dosis ya establecida a partir de la cual se irradiaría, se consideró la dosis que ocasiona daño en células humanas, sin embargo esta es sumamente baja (10 Gy), con la cual no se obtuvo el resultado esperado. Posteriormente se aumentó la dosis conforme lo indica la tabla hasta llegar a 6000 Gy, a partir de aquí se irradió a 10 000 Gy en la cual el análisis microbiológico fue negativo, es decir, no hubo crecimiento alguno de microorganismos. Hasta este momento se contaba con un intervalo de dosis entre 6000 y 10 000 Gy, del cual se determinó la dosis mínima letal; esta fue considerada como la dosis en la cual el análisis microbiológico fue negativo y que en una dosis inferior el resultado haya sido positivo. Por lo tanto la dosis mínima letal obtenida fue de 7000 Gy. Cabe aclarar que el irradiador Gamacell tiene una incertidumbre tal, que sería muy difícil determinar una dosis exacta, por tal motivo en los cálculos que sean pertinentes realizar para saber el tiempo de exposición, se tomará el tiempo más aproximado.

En cuanto al estudio realizado al papel no irradiado e irradiado a diferentes dosis, en las micrografías obtenidas en SEM (figuras 29 y 30) se observó que no existen cambios apreciables en las superficies de las muestras irradiadas en comparación con las no irradiadas. Sin embargo, en los ensayos de tensión se destacan algunos cambios en sus propiedades mecánicas que fueron analizados en la sección de resultados, pero que no están afectando significativamente las propiedades del papel.

9. CONCLUSIONES

- ☒ La contaminación microbiológica que presentaron los documento antiguos consta principalmente de dos grupos de microorganismos: bacterias y hongos. De los cuales se identificaron seis géneros. *Bacillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Hormodendrum*, *Alternaria* y *Fusarium*.
- ☒ Los microorganismos aislados fueron eliminados mediante radiaciones ionizantes gamma a una dosis de 7000 Gy. Por lo tanto se consideró este valor como la dosis mínima letal.
- ☒ Los resultados del estudio realizado al papel de prueba (papel couché) para evaluar los cambios microestructurales después de la irradiación, revelan que estos cambios no afectan de manera significativa las propiedades del papel.
- ☒ Con vistas a la conservación futura de los acervos culturales, el control microbiológico mediante radiaciones ionizantes gamma junto con una buena vigilancia en las condiciones ambientales de las instalaciones, representan una alternativa eficaz y útil para evitar el deterioro en un breve espacio de tiempo.
- ☒ Considerando que documentos con siglos de antigüedad han perdurado hasta nuestros días gracias a la calidad de los materiales empleados en su elaboración, cabe aclarar que el deterioro de los mismos es consecuencia de una serie de factores que van desde la materia prima y el proceso de fabricación, hasta las condiciones adversas de almacenaje así como de uso. Los microorganismos contaminantes son sólo uno de estos factores que tiene gran relevancia.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

9.1 Sugerencias

- ▣ Evitar aquellas campañas de desinfección que se realizan sin comprobar previamente la efectividad e inocuidad de los productos empleados, por ejemplo, el uso inadecuado de agentes químicos.
- ▣ Resulta de gran utilidad, especialmente en los documentos deteriorados o consultados con frecuencia, la aplicación de sistemas reprográficos e informáticos que permiten preservar los contenidos informativos y además contrarrestar los efectos de una utilización excesiva o inapropiada de originales.
- ▣ Realizar estudios posteriores a mediano y largo plazo, después de que un acervo haya sido sometido a esta alternativa de irradiación gamma.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pelczar MJ, Reid RD, Chan ECS. Microbiología. 4ª ed. México: MacGraw-Hill, 1982: 117 – 129, 256, 363 – 371, 748 – 750.
2. Casey JP. Pulpa y papel. Química y tecnología química. México: Limusa, 1990: Vol. I: 29 – 64, Vol. III: 321 – 324, 396 – 412.
3. Jawetz E. Microbiología médica. México: El manual moderno, 1987: 76 – 83.
4. Bauer JD. Análisis clínicos. Métodos e interpretación. Barcelona: Reverté, 1986: 1016, 1017.
5. Koneman R. Micología práctica de laboratorio. 3ª ed. Argentina: Panamericana, 1993: 73-77.
6. Rippon JW. Micología médica. 3ª ed. México: Interamericana, 1990: 9,10.
7. Finegold SM, Baron EJ. Bailey-Scott Diagnóstico microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1996: 402-405.
8. Breach MR. Esterilización. Métodos y control. México: El manual moderno, 1976: 9, 43-49.
9. Reyes LF. Esterilización de productos farmacéuticos con radiación gamma. Phar New 1992; 3: 43-45.
10. www.ugr.es/~eianez/microbiologia/18_micro.htm/
11. www.icnmp.edu.mx/textos/boleradia.htm/

12. www.emersis.org/apuntes/radiacti.htm/
13. Campbell JR, Rickards CJ, Ross CR. Las radiaciones. México: Fondo de cultura económica, 1990: 9-103
14. Mendoza AD. Curso introductorio sobre la radiación y su interacción con la materia. México: ININ, 1999.
15. Shackelford JF. Ciencia de materiales para ingenieros. 3ª ed. México: Prentice Hall hispanoamerica, 1995: 329-346.
16. Yacamán MJ, Reyes J. Microscopía electrónica. México: Fondo de cultura económica, 1995: 13-39.
17. Grimstone AV. El microscopio electrónico en biología. Barcelona: Omega, 1981: 1-14, 55-61.
18. www.geocities.com/capecanaveral/lab/1987/fundan.htm/
19. ASTM-D 828-93. Standard test method for tensile properties of paper and paperboard using constant-rate-of-elongation apparatus.
20. Collins CH. Métodos microbiológicos. España: Acribia, 1989: 428, 443, 483-490.
21. Delaat ANC. Microbiología. México: Interamericana, 1976: 86-88.
22. Hayden W, Moffatt WG, Wulff J. Propiedades Mecánicas. México: Limusa, 1982: 13-31.

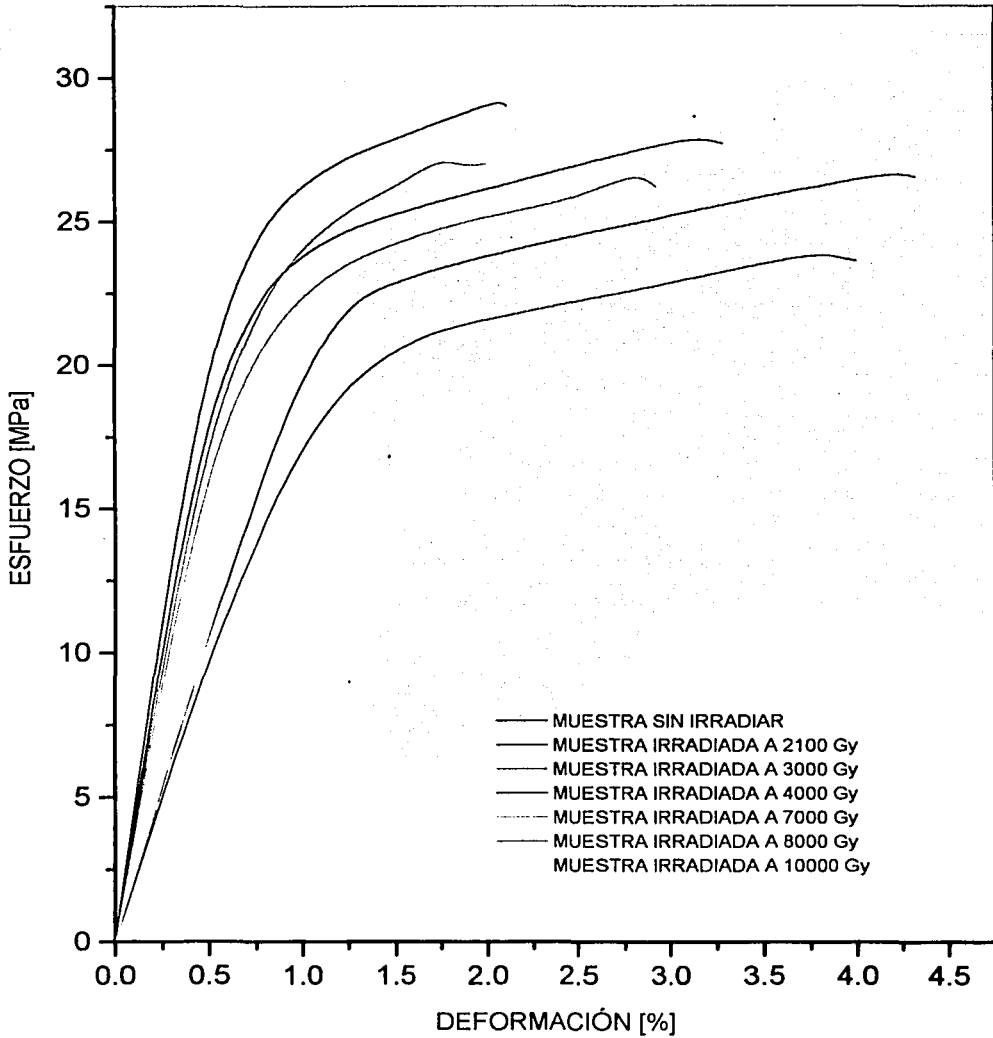
23. Ramírez IM, Guerrero DN, Altamirano LM, De Martínez CS. El protocolo de investigación. 2ª. ed. México: Trillas, 2000: 25, 62-70.
24. Centeno AJ. Metodología y técnicas en el proceso de la investigación. 2ª ed. México: Cambio, 1981: 45 – 48.
25. Manual de Microbiología general II. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
26. Koneman. Diagnóstico microbiológico. 3ª. ed. Argentina: Médica panamericana, 1990.
27. Libby CE. Ciencia y tecnología sobre pulpa y papel. México: Continental, 1968. Tomo II
28. Sánchez AR, Pardo MEM, Luján JR. Propiedades físicas de fibras de henequén irradiadas en presencia de metilmetacrilato. Rev Soc Quím Mex 1977; 21: 60-62.
29. Turss MM. Aislamiento de contaminantes microbiológicos en la fábrica de papel San Rafael. Tesis profesional. México: I.P.N., 1980.
30. www.csn.es/csn/informacion/diccionario/diccR.htm/

ANEXOS

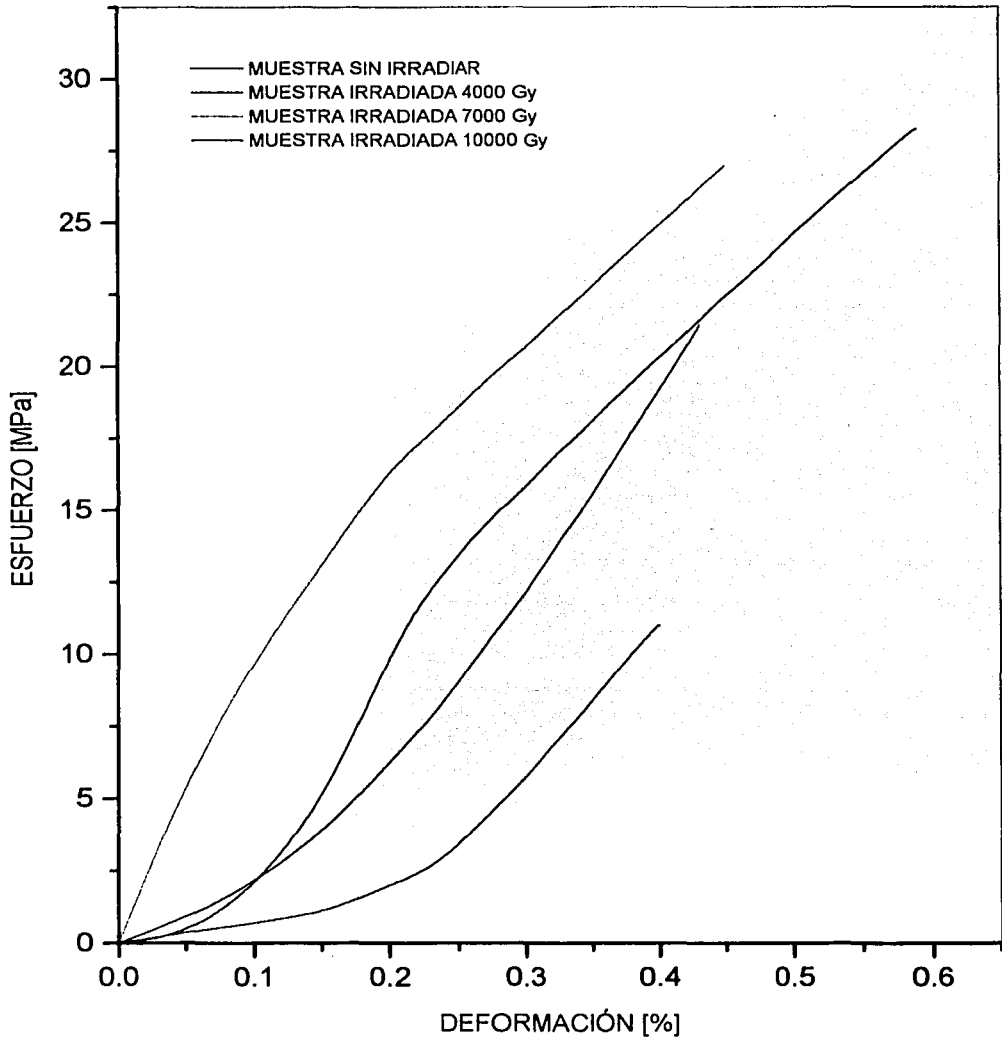
ANEXO I

GRÁFICAS

GRÁFICA ESFUERZO-DEFORMACIÓN
ENSAYO TENSIÓN
TEMPERATURA AMBIENTE
MATERIAL PAPEL COUCHÉ



GRÁFICA ESFUERZO-DEFORMACIÓN
ENSAYO TENSIÓN
TEMPERATURA AMBIENTE
MATERIAL PAPEL ANTIGUO (AÑO 1911)



ANEXO II

GLOSARIO

GLOSARIO

Aerobio. Organismo que requiere oxígeno.

Agar. Extracto polisacárido desecado del alga roja *Rhodophyceae*, usado en microbiología como solidificante de los medios.

Angstrom. (Å) Unidad de longitud igual a 10^{-8} cm (1/100 000 000 cm). Utilizado para expresar distancias entre átomos, dimensiones moleculares, longitudes de onda de la radiación de onda corta, etc.

Área transversal. Es el ancho por el espesor de la sección reducida de un material.

Bacilo. Bacteria en forma de bastón.

Carga. Fuerza aplicada al material en un ensayo de tensión.

Cobalto 60. Cobalto radiactivo de número de masa 60. Es uno de los radioisótopos más comunes. Tiene un período de semidesintegración de 5,3 años, radiaciones: beta y gamma.

Colonia. Desarrollo visible macroscópicamente de microorganismos en un medio de cultivo sólido.

Contaminación. Entrada de microorganismos indeseables en algún objeto o material.

Cultivo. Población de microorganismos desarrollados en un medio.

Cultivo puro. Cultivo en el cual se desarrolla sólo una especie de microorganismos.

Dispersión elástica. Se define como un proceso que aún cuando puede involucrar un cambio en la dirección de los electrones primarios, no incluye modificaciones detectables en su energía.

Dispersión inelástica. Se refiere a cualquier proceso que causa que el electrón primario pierda una cantidad detectable de energía ΔE (>0.1 eV).

Dosis absorbida. Es la energía depositada por unidad de masa, independientemente de qué material se trate. En el Sistema Internacional la unidad de dosis absorbida es el Gray (Gy). La unidad antigua es el rad.

Electrones primarios. Son los que entran a la muestra por emisión del cañón electrónico.

Elongación. Es la cantidad de deformación que experimenta el papel sometido a un esfuerzo de tensión.

Endosporas. Espora de pared gruesa formada en una célula bacteriana.

Esfuerzo. Es la fuerza interna por unidad de área que resiste la carga externa.

Especie. Grupo de organismos que poseen determinadas características individuales definidas que los distinguen de otros grupos de organismos.

Esporangio. Estructura cerrada dentro de la cual se producen esporas asexuales por segmentación.

Esporangióforo. Rama micelial especializada que sostiene un esporangio.

Esporas. Células diferenciadas para la reproducción de bacterias, hongos o protozoarios; en las bacterias pueden ser formas inactivas, de resistencia, intracelulares.

Estado vegetativo. Etapa de desarrollo activo en contraposición a la etapa de reposo o esporular (quistes y esporas).

Fotón. Unidad (cuanto) de radiación electromagnética. Las ondas de luz, rayos gamma, rayos X, etc., constan de fotones. Los fotones son concentraciones discretas de energía que parecen no tener masa en reposo y que se mueven a la velocidad de la luz. Los fotones son emitidos cuando los electrones cambian de nivel energético, como en un átomo excitado.

Género. Un grupo de especies relacionadas.

Gram, coloración de. Tinción diferencial por la cual las bacterias se clasifican en grampositivas y gramnegativas, según retengan o no el colorante primario (cristal violeta) cuando se someten a un agente decolorante.

Gray. (Gy) unidad usada actualmente en el Sistema Internacional de Unidades. 1 Gray = 100 rad.

Hemólisis. El proceso de destrucción de los glóbulos rojos.

Heterótrofo. Microorganismo incapaz de usar dióxido de carbono como única fuente de carbono y que por lo tanto requiere, uno o más compuestos orgánicos.

Hidrólisis. Degradación de un sustrato por una enzima que incorpora los componentes del agua a ciertas uniones de la molécula del sustrato.

Hifa. Filamento o hebra de un micelio.

Incubación. Mantenimiento de cultivos de microorganismos en condiciones favorables de temperatura para su desarrollo.

Inhibición. Prevención del desarrollo o multiplicación de microorganismos.

Inoculación. Introducción artificial de microorganismos en un medio de cultivo.

Inóculo. El material que se inoculara.

Isótopo. Una de las varias formas posibles de un elemento químico, diferente de las otras por su peso atómico, pero no en las propiedades químicas.

Micelio. Masa de filamentos a manera de hebras, ramificados o formando una red que constituye la estructura vegetativa de un hongo.

Medio de cultivo. Sustancia utilizada para proporcionar alimento para el desarrollo y multiplicación de los microorganismos.

Patógeno. Capaz de producir enfermedad.

Rad. Unidad antigua de dosis absorbida.

Radiación. Es la propagación de energía radiante en forma de ondas o de partículas.

Radical libre. Un fragmento molecular que tiene uno o más electrones desapareados, generalmente de vida media corta y muy reactivo. A pesar de su existencia transitoria, son capaces de iniciar muchas clases de reacciones químicas por medio de un mecanismo de cadena.

Saprófito. Organismo que vive en la materia orgánica muerta.

Tensión. Es la razón del cambio en dimensiones en relación con las dimensiones originales.