

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE FOTOCATÁLISIS DE NANO-TiO₂/ENERGÍA
VISIBLE PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS DE PISCINA.

DEBORA ELIZABETH HERNÁNDEZ PÉREZ
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
COLOMBIA
2015

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE FOTOCATÁLISIS DE NANO-TiO₂/ENERGÍA
VISIBLE PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS DE PISCINA.

DEBORA ELIZABETH HERNÁNDEZ PÉREZ
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIOLOGA

Asesor
Francisco Rodríguez Rincón, Ph D

Asesor externo
Refugio Rodríguez Vázquez, Ph D

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
COLOMBIA
2015

Nota de aceptación

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Pamplona, Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que es mi pilar, y a mis padres que son mi más grande tesoro e inspiración; por su ejemplo, apoyo incondicional, y concederme la fortuna de realizar mi carrera profesional.

A los docentes del Programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona, mi gratitud y admiración, por su colaboración e invaluable labor en el transcurso de estos años.

Nuestra mayor recompensa se halla en el esfuerzo y no en los resultados. Un esfuerzo total es una victoria absoluta.

Mahatma Gandhi

| | |
|---|----|
| 4.5. Cultivo y determinación del inóculo de la cepa modelo (<i>Escherichia coli</i>). | |
| 39 | |
| 4.6. Selección de las condiciones de tratamiento en el sistema fotocatalítico nano- TiO ₂ / energía visible..... | 40 |
| 4.6.1. Reactor fotoquímico Q-200 | 40 |
| 4.6.2. Ozonizador | 42 |
| 4.6.2.1.1. Preparación de los soportes de nano- TiO ₂ | 42 |
| 4.6.3.1. Solución nano estructurada TiO ₂ | 43 |
| 4.6.3.1.1. Recubrimiento de las placas con películas de TiO ₂ | 43 |
| 4.6.3. Diseño experimental..... | 44 |
| 4.6.3.1. Diseño factorial fraccionado 2 ⁷⁻⁴ | 44 |
| 4.6.4. Puesta en marcha del tratamiento fotocatalítico nano-TiO ₂ /energía visible..... | 47 |
| 4.7. Análisis estadístico | 48 |
| 5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES | 49 |
| 6. RESULTADOS | 50 |
| 6.1. Muestreo..... | 50 |
| 6.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las muestras de agua de piscina. | 50 |
| 6.3. Selección de las condiciones de tratamiento en el sistema fotocatalítico nano- TiO ₂ / energía visible..... | 51 |
| 6.4.1. Análisis del Tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ / energía visible. | 54 |
| 6.4.1.1. Análisis de varianza y efectos principales..... | 54 |
| 6.4.1.2. Análisis de regresión..... | 58 |
| 6.4.1.3. Diagnóstico y validación del modelo matemático..... | 61 |
| 6.4.2. Análisis de comparación de medias entre el tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ /energía visible y el grupo de tratamientos control..... | 62 |
| 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 63 |
| 7.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las muestras de agua de piscina. | 63 |
| 7.2. Tratamiento fotocatalítico..... | 66 |

| | |
|--------------------------|----|
| 8. CONCLUSIONES..... | 71 |
| 9. RECOMENDACIONES | 73 |
| 10. GLOSARIO..... | 74 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 76 |
| ANEXOS..... | 88 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Microorganismos asociados a las piscinas y ambientes similares (WHO, 2006)..... | 20 |
| Figura 2. Representación gráfica del mecanismo de acción por fotocatalisis heterogénea empleando TiO ₂ como foto-catalizador..... | 30 |
| Figura 3. Reacciones elementales sucesivas en una reacción total de degradación oxidativa..... | 30 |
| Figura 4. Esquema del proceso microbicida de la fotocatalisis (Hashimoto et al., 2005)..... | 32 |
| Figura 5. Kit de pruebas rápidas para la detección de cloro en agua de piscina. | 38 |
| Figura 6. Reactor de fotoquímica Q-200..... | 41 |
| Figura 7. Adaptación del Reactor de fotoquímica Q-200, con luz visible. | 41 |
| Figura 8. Ozonizador adaptado al sistema fotocatalítico..... | 42 |
| Figura 9. Diagrama general de la metodología empleada para la preparación de los soportes recubiertos con películas de nano TiO ₂ | 42 |
| Figura 10. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Inóculo)..... | 55 |
| Figura 11. Gráfico de efectos principales para el factor significativo (pH)..... | 56 |
| Figura 12. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Aireación) . | 56 |
| Figura 13. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Ozono)..... | 57 |
| Figura 14. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Oxálico) | 57 |
| Figura 15. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Fe) | 58 |
| Figura 16. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Tiempo). | 58 |
| Figura 17. Gráfico de Pareto para el tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ / energía visible frente a la disminución de <i>Escherichia coli</i> CDBB-B-1011..... | 60 |
| Figura 18. Gráfico de probabilidad normal para el tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ / energía visible frente a la disminución de <i>Escherichia coli</i> CDBB-B-1011. | 61 |
| Figura 19. Análisis de valores residuales vs. Valores predichos. Tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ / energía visible en la disminución de <i>Escherichia coli</i> CDBB-B-1011. | 61 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Posibles aplicaciones de los POAs en agua..... | 23 |
| Tabla 2. Potenciales redox de algunos agentes oxidantes..... | 23 |
| Tabla 3. Clasificación de Tecnologías Avanzadas de Oxidación..... | 24 |
| Tabla 4. Factores fisicoquímicos evaluados..... | 38 |
| Tabla 5. Variables del diseño factorial fraccionado 2^{7-4} | 45 |
| Tabla 6. Diseño factorial fraccionado 2^{7-4} | 46 |
| Tabla 7. Condiciones de los controles incorporados al diseño factorial fraccionado 2^{7-4} | 46 |
| Tabla 8. Concentración de los inóculos evaluados..... | 47 |
| Tabla 9. Cronograma de actividades..... | 49 |
| Tabla 10. Características de la piscina muestreada. | 50 |
| Tabla 11. Resultados tratamientos fotocatalíticos. | 52 |
| Tabla 12. Resultados tratamientos de control. | 54 |
| Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) en la reducción de <i>Escherichia coli</i> en agua de piscina tratada por fotocátalisis nano TiO_2 / energía visible..... | 55 |
| Tabla 14. Análisis de regresión para la reducción de <i>Escherichia coli</i> por fotocátalisis nano TiO_2 /energía visible..... | 59 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Resultado determinación de cloro en muestra de agua de piscina. | 88 |
| Anexo 2. Resultado análisis microbiológico de agua de piscina. | 89 |
| Anexo 3. Resultados reducción de microorganismos patógenos (<i>Escherichia coli</i> CDBB-B- 1010) por fotocátalisis nano TiO ₂ /Energía visible. | 90 |
| Anexo 4. Resultados tratamientos control. (<i>Escherichia coli</i> CDBB-B- 1010). | 92 |
| Anexo 5. Valores normalizados mediante la determinación del logaritmo natural (Ln) de los resultados de la cuenta microbiana referentes a <i>Escherichia coli</i> . Resultados tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ / energía visible. | 93 |
| Anexo 6. Valores normalizados mediante la determinación del logaritmo natural (Ln) de los resultados de la cuenta microbiana referentes a <i>Escherichia coli</i> . Resultados tratamientos control. | 94 |
| Anexo 7. Análisis de varianza (ANOVA) en la reducción de <i>Escherichia coli</i> en agua de piscina tratada por fotocátalisis nano TiO ₂ / energía visible. | 95 |
| Anexo 8. Análisis de comparación de medias entre el tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ /energía visible y el grupo de control. | 98 |

INTRODUCCIÓN

La necesidad de conservar el medio ambiente ha llevado al hombre a la búsqueda de nuevas tecnologías para la eliminación eficiente y segura, de los diferentes contaminantes que afectan la estabilidad de los recursos. Entre estas tecnologías se encuentran aquellas que involucran procesos de oxidación avanzada (POA's), con la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS).

La fotocatalisis heterogénea como una de las tecnologías de oxidación avanzada, es una de las aplicaciones fotoquímicas que hoy por hoy ha despertado mayor interés en la comunidad científica al ser un método no selectivo, y que puede ser empleado para el tratamiento de mezclas complejas de contaminantes como, materia orgánica, colorantes, metales pesados, y microorganismos patógenos (Jaramillo y Taborda, 2006; Palomares, 2013; Mokhbi *et al.*, 2014). Este proceso se caracteriza por la presencia de un material semiconductor que actúa como catalizador, y una fuente de luz con un contenido energético determinado para inducir las reacciones foto electroquímicas, con las cuales son generadas especies reactivas de oxígeno (ROS), que reaccionan con diferentes contaminantes orgánicos e inorgánicos en el medio generando como productos principalmente CO₂ y H₂O (Gogniat y Duncan, 2007). Pese a que en los últimos años han sido estudiados diferentes óxidos metálicos y sulfuros como agentes catalizadores en reacciones asistidas por la luz; desde que en 1972 Fujishima y Honda descubrieron que, el dióxido de titanio (TiO₂) al ser expuesto al sol, podía producir la disociación fotocatalítica del agua, numerosas investigaciones resaltan su utilidad entre otras razones, por su bajo costo, resistencia a la corrosión, ser inerte biológica y químicamente, y por la factibilidad de acoplamiento con otros tratamientos (Garcés *et al.*, 2012).

La fotocatalisis empleando TiO₂ ha sido estudiada desde 1970 como estrategia para la degradación de sustancias toxicas, y desde 1980 se plantea la posibilidad de aplicar este proceso al tratamiento de contaminantes en agua; donde se resalta su utilidad para inactivar un amplio rango de microorganismos (Sinha *et al.*, 2009). Reportándose a la fecha, más de 11.000 publicaciones en torno a esta temática (Chong *et al.*, 2010).

El agua, como recurso invaluable y trascendental para el sustento de la vida; adquiere día a día mayor importancia dentro del panorama mundial, repercutiendo en diversos ámbitos como el económico, social, ambiental, y relevante en torno a la salubridad; al ser esta una vía de contacto y transmisión directa de enfermedades en humanos. Un claro ejemplo de ello involucra al agua de las piscinas,

específicamente aquellas de tipo artificial construidas con fines recreativos y/o deportivos, en las que frecuentemente han sido reportados por organismos como el Centro para el Control y la Prevención de las Enfermedades (CDC), diferentes casos de infecciones adquiridas por los bañistas que a nivel global hacen uso de este tipo aguas de recreo (Soller *et al.*, 2010). En la actualidad, agentes microbianos e infecciosos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium spp*, algunos protozoos (*Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Acanthamoeba spp.*) y virus (Adenovirus, Norovirus, virus de la hepatitis A); son considerados responsables de muchas de las infecciones relacionadas con el uso de las piscinas. Citándose entre estas, la gastroenteritis, infecciones genitourinarias, otitis, conjuntivitis, meningoencefalitis, y la amibiasis, entre otras (Martínez y Alvarado, 2013).

El agua de las piscinas generalmente es potable y sometida a tratamientos complementarios de desinfección empleando compuestos químicos, al igual que mediante sistemas de recirculación para el filtrado y desinfección eficaz (Lumb *et al.*, 2004). Sin embargo, los tratamientos aplicados para la desinfección del agua de las piscinas son evaluados actualmente. Se ha dado a conocer que compuestos como el cloro utilizado convencionalmente para la desinfección del agua por la vía química, estaría implicado en la generación de subproductos organoclorados al reaccionar con la materia orgánica presente en el agua, como los trihalometanos (THMs); catalogados como cancerígenos y mutagénicos, por lo que figuran como un peligro potencial. Así mismo, otros efectos como las alteraciones en la reactividad bronquial e irritación dérmica en humanos ocasionadas por el cloro, y la aparición de microorganismos como *Bacillus subtilis* y *Cryptosporidium parvum* capaces de desarrollar tolerancia a este compuesto, desmeritan en gran medida su uso (Cote, 2006; Bandala *et al.*, 2007; Dronic, 2009; Ramírez *et al.*, 2004). Si bien es cierto, aunque las dificultades expuestas repercuten de manera directa en la salud, es también relevante la relación costo beneficio de otros métodos propuestos para el tratamiento del agua de las piscinas, como la radiación empleando lámparas UV, en los cuales una de las principales limitaciones radica en su elevado costo (Pigeot *et al.*, 2011). Por tales motivos, hoy día son evaluados métodos alternativos como la fotocatalisis, para la desinfección y mantenimiento de estas aguas.

En cuanto a la desinfección del agua, la fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio (TiO₂) es considerada como una tecnología “limpia” y de bajo costo, que ofrece adicionalmente la posibilidad de inactivar agentes patógenos bacterianos, parásitos y virus, a partir de la generación de daños oxidativos a nivel de los constituyentes celulares como, la pared celular, la membrana citoplasmática, y los ácidos nucleicos. Diferentes trabajos aplicando esta tecnología, han reportado una disminución de hasta el 91-99% de bacterias coliformes, en tiempos de exposición de 60 minutos (Alrousan *et al.*, 2009; Caballero *et al.*, 2009; Rizzo, 2009). Los estudios realizados a nivel mundial permiten reconocer la utilidad de las tecnologías

de oxidación, para la descontaminación del agua. Lo que demarca la importancia de estudiar su aplicación como alternativa para la descontaminación de aguas como la de piscinas; partiendo de estudios previos como el realizado por De Castro en 2015, en el que fue evaluado un fotorreactor con nano TiO_2 , ozono y aire para la reducción de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* soportado en el uso de luz ultravioleta, en aguas de piscina; con resultados satisfactorios. Teniendo en cuenta que aunque son muchos los tratamientos que han sido aplicados para la desinfección de estas aguas de recreo como parte esencial en la prevención de brotes por enfermedades infecciosas, en la actualidad no se cuenta con un método que cumpla con los criterios de eficiencia, seguridad y viabilidad económica, para mantener una condición salubre en estas instalaciones.

Pese a todas las características expuestas, una amplia investigación continúa para mejorar esta tecnología y agrandar el espectro de aplicaciones potenciales. Entre ellas se encuentra la posibilidad de extender el intervalo de respuesta a la luz en la actividad fotocatalítica del TiO_2 , y reemplazar el uso habitual de lámparas de luz ultravioleta, a partir de lo cual se deriva el principal costo de operación de este proceso. En algunos trabajos aunque con una eficiencia alcanzada relativamente baja, se ha logrado efectuar este proceso con luz visible; lo que motiva la exploración de diferentes mecanismos que posibiliten la aplicación del proceso fotocatalítico bajo estas condiciones. En este sentido, en el presente trabajo fue evaluado un sistema fotocatalítico de nano- TiO_2 / energía visible, para la reducción de microorganismos de origen fecal en aguas de piscina. Contemplando el uso de compuestos aditivos que permitan mejorar la actividad del catalizador, y/o contribuyan en el proceso de inactivación de los microorganismos.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Evaluar el sistema de fotocatalisis de nano-TiO₂/energía visible, para la reducción de microorganismos de origen fecal presentes en aguas de piscina.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones microbiológicas y fisicoquímicas de muestras procedentes de agua de piscina.
- Identificar los factores del proceso fotocatalítico nano-TiO₂/energía visible, que contribuyen en la reducción de *Escherichia coli* tomado como microorganismo patógeno modelo.
- Analizar el efecto del sulfato ferroso y el ácido oxálico como aditivos en el proceso de fotocatalisis de nano-TiO₂/energía visible, para la reducción poblacional de contaminantes microbianos en aguas de piscina.

2. JUSTIFICACIÓN

Las piscinas como instalaciones que ofrecen la posibilidad de disfrutar y mejorar la salud de las personas en muchos casos; también pueden representar una fuente potencial de infecciones para sus usuarios, debido a una amplia variedad de agentes microbianos e infecciosos que pueden encontrarse en las piscinas al introducirse al agua por diferentes vías. De acuerdo a los informes aportados por la Organización Mundial de la Salud, se considera que tan solo en el Reino Unido de Gran Bretaña los bañistas sufren más de 13.000 lesiones al año considerando entre los principales agentes causales, a los contaminantes de naturaleza biológica y química (WHO, 2014).

Actualmente existen métodos diversos para el tratamiento del agua de las piscinas que si bien pueden resultar eficaces como la ionización y el uso de lámparas UV, son poco viables al tener un costo elevado de operación (Pham y Byeong, 2014). Otros métodos por su parte de uso convencional aunque económicos, como la desinfección química por cloración; además de generar sustancias tóxicas como subproductos de la desinfección (SPD) con efectos nocivos demostrados sobre la salud, también presentan constantemente una pérdida en la eficiencia del proceso con la aparición de microorganismos resistentes (Ramírez *et al.*, 2004). Al respecto, la fotocatalisis heterogénea como proceso de oxidación avanzada constituye una alternativa llamativa al presentar claramente diferentes ventajas para la descontaminación del agua. Su capacidad para mineralizar contaminantes orgánicos y su efecto microbicida, sin la generación de productos contaminantes tóxicos, posibilita el mantenimiento de aguas de recreación como las piscinas, bajo las condiciones higiénico-sanitarias adecuadas; preservando la salud y el bienestar de las personas. A su vez, la opción de emplear sustancias aditivas con capacidad de inducir cambios en el catalizador mejorando su actividad, podría incrementar la eficiencia de los tratamientos reduciendo el costo de operación, con la posibilidad de emplear radiación solar como fuente primaria de energía, otorgándole al proceso un significativo valor medioambiental y económico (Garcés *et al.*, 2012; Appunni y Meenakshi, 2014; Tapia, 2014).

En este sentido la evaluación de un sistema fotocatalítico nano- TiO_2 / energía visible, resulta una alternativa novedosa a ser evaluada, para la reducción de microorganismos de origen fecal en aguas de piscina. Partiendo de la eficacia y eficiencia comprobada de los procesos de oxidación avanzada, de manera segura y con un costo moderado.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Bases legales

Las piscinas son establecimientos que deben ser supervisados de forma permanente por entes gubernamentales, a fin de preservar la calidad del agua y la salud pública. Esta gestión involucra conceptos de mantenimiento de la calidad y aprovechamiento del agua, cuyo control se encuentra relacionado con la normatividad de cada país. En temas de control y manejo de aguas de piscina, México en la actualidad cuenta con una norma oficial que establece las especificaciones sanitarias y de calidad del agua que deben cumplir las piscinas de centros vacacionales, clubes deportivos, balnearios, centros de enseñanza, hoteles, desarrollos turísticos, parques acuáticos o cualquiera que preste un servicio público; con el propósito de minimizar o controlar riesgos a la salud de los usuarios (Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las piscinas).

Otras normas relacionadas que regulan el manejo del agua para uso y consumo en el país, en sistemas de abastecimiento públicos y privados en todo el territorio nacional son:

- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997, Aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

- Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998, Vigilancia y Evaluación del Control de Calidad del Agua para Uso y Consumo Humano, distribuida por sistemas de abastecimiento público.

3.2. Antecedentes

La primera publicación sobre el proceso de degradación de contaminantes en fases tanto acuosa como gaseosa por fotocátalisis heterogénea, se debe a Carey y data en 1976. Desde entonces, diferentes investigaciones han sido realizadas en torno al desarrollo de este proceso fotocatalítico, para la purificación del agua. Desde un punto de vista más específico, el comienzo de los estudios que abarcan la aplicación de los procesos de oxidación avanzada por fotocátalisis heterogénea con TiO_2 , y su efecto microbicida para la descontaminación del recurso hídrico, tienen origen en un primer informe realizado por Matsunaga y colaboradores en el año 1985. En él se demuestra la destrucción de células bacterianas utilizando dióxido de titanio cargado con platino (TiO_2 / Pt) como catalizador, soportado en el uso de irradiación UV con lámparas de haluro metálico. En este trabajo los investigadores describen el deterioro fotocatalítico de *Escherichia coli*, donde se atribuye a un proceso de oxidación directa a nivel intracelular de la Coenzima A (CoA), la muerte celular; como consecuencia de la inhibición de la actividad respiratoria. Por lo que se considera al proceso de fotocátalisis con TiO_2 , como responsable de la inducción directa de procesos oxidativos a nivel de los componentes celulares (Matsunaga *et al.*, 1985). Este trabajo sienta un precedente para estudios posteriores como el realizado por Saito *et al.*, en 1992, quienes aplicando microscopia de transmisión electrónica (TEM), informaron efectos adicionales de la fotocátalisis, con alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular a causa de la peroxidación de fosfolípidos; como producto del ataque de los radicales foto-generados durante el proceso. Todo esto en función de las observaciones efectuadas donde se identificó una pérdida de iones intracelulares (K^+), la liberación de proteínas y ARN, seguido de la lisis, y con ello la muerte celular; confirmando el efecto bactericida del proceso fotocatalítico (Pigeot, 2011). A partir de estos trabajos surge gran interés por dilucidar cada vez de manera más completa el mecanismo de acción microbicida mediante foto-oxidación, así como por aplicar esta tecnología para la descontaminación del aire, entornos industriales, y de manera especial para la desinfección de diferentes tipos de agua. Esto en función de la eficiencia demostrada del proceso para inactivar una amplia variedad de microorganismos como bacterias, parásitos, hongos, y virus; siendo *Escherichia coli* el agente bacteriano más estudiado por su importancia como indicador de contaminación de origen fecal en el agua (Bui *et al.*, 2008).

Si bien es cierto, y son numerosos los estudios enfocados en los efectos microbicidas del proceso de oxidación mediante fotocátalisis heterogénea; en años recientes muchas investigaciones han sido realizadas, motivadas en la mejora de las condiciones de operación en términos de eficiencia y eficacia del proceso de oxidación por fotocátalisis heterogénea con TiO_2 . Al respecto, una cantidad considerable de trabajos se han interesado en evaluar la influencia de diferentes

parámetros que afectan el proceso de oxidación como, el pH, la temperatura, naturaleza y concentración de los contaminantes a tratar, la presencia de sustancias aditivas y/o foto-sensibilizadores (colorantes, compuestos orgánicos, sales inorgánicas), y su relación con la inactivación de microorganismos presentes en el agua (Pham y Byeong en 2014). Ya que se ha puesto en manifiesto que la actividad fotocatalítica del TiO_2 en torno a la luz visible, puede mejorar mediante el uso de compuestos orgánicos e inorgánicos como foto-sensibilizadores, por acoplamiento de semiconductores con diferentes niveles de energía, o por medio del dopaje del TiO_2 con metales (Ola y Valer, 2015). Otros trabajos utilizando foto-sensibilizadores como compuestos orgánicos heterocíclicos en el caso de algunos colorantes (rodamina, porfirinas, tionina), ácidos di carboxílicos (ácido oxálico), y la modificación en la estructura cristalina del catalizador; han demostrado su utilidad al aumentar la absorción de la luz en la región visible, y el nivel de selectividad para la degradación de contaminantes durante los procesos fotocatalíticos. Tales mecanismos estarían basados en la producción de especies oxidantes intermedias, en la transferencia de electrones desde los agentes foto-sensibilizadores en estado excitado hacia el semiconductor, o mediante interacciones entre el foto-sensibilizador y la superficie del semiconductor (Jeong y Yoon, 2004; Macyka *et al.*, 2010; Sownya y Meenakshi, 2014; Ola y Valer, 2015); lo que constituye uno de los mayores intereses en el desarrollo de esta tecnología, aumentando el espectro de aplicación de la misma bajo condiciones más prácticas y factibles, como lo es el uso de la luz visible para la fotocatalisis.

3.3. Marco teórico

3.3.1. Aguas de recreo: Piscinas

Una piscina es definida por la Real Academia Española como un estanque destinado al baño, la práctica de la natación, u otros ejercicios y deportes acuáticos. El número de personas que practican alguna actividad deportiva relacionada con el agua, ha aumentado de forma gradual y considerable, particularmente en torno a las piscinas; convirtiéndose en lugares que además de propiciar las prácticas deportivas, constituyen adicionalmente una alternativa para la recreación, la relajación y socialización de las personas en todos los rangos de edades. Se estima que tan solo en los Estados Unidos de América existe alrededor de 9 millones de piscinas, seguido de la Unión Europea quien ocupa el segundo lugar con 4.5 millones; de ello es posible precisar que este tipo de instalaciones conforman un sector importante de la industria (Florentin *et al.*, 2011).

Aunque las actividades relacionadas al agua en estructuras como las piscinas figuran como una buena opción para el desarrollo de la actividad física, y con ello la

obtención de beneficios para la salud, también puede ser esta una vía de exposición a una serie de riesgos físicos, químicos y microbiológicos (Pasquarella *et al.*, 2014). El agua constituye uno de los recursos naturales más importantes, llegando a ser sin duda indispensable para el sustento de la vida. Pese a que la atención prestada a este recurso inicialmente fue escasa; desde hace muchos años el agua ha pasado a ocupar un tema prioritario a nivel mundial. Entre los factores que favorecen esta situación, se ubica un mayor conocimiento respecto a los riesgos que entraña este líquido al ser una vía de contacto y transmisión directa de enfermedades en humanos, al contar con la presencia de contaminantes tales como, desechos orgánicos, elementos químicos, sustancias radioactivas, y microorganismos patógenos. Epidemias como la del cólera en el siglo XIX en la que murieron miles de ciudadanos en Estados Unidos, brotes de fiebre tifoidea, e innumerables casos de enfermedad diarreica en infantes, contribuyeron a generar un estado de alarma en cuanto al abastecimiento de agua de calidad aceptable. Sin embargo, pese a la suma de esfuerzos realizados en los últimos años para garantizar la calidad del recurso hídrico, el agua aun representa una fuente de riesgo potencial para la transmisión de enfermedades al contener microorganismos como bacterias, parásitos y hongos, así como agentes infecciosos en el caso de los virus (Powell *et al.*, 2006).

3.3.1.1. Microbiología de aguas de piscina

Indudablemente el aspecto más importante en cuanto al control y vigilancia epidemiológica de las piscinas, atiende a la calidad microbiológica y fisicoquímica de sus aguas. Las piscinas como establecimientos públicos y privados, deben ser monitoreados y evaluados por entes gubernamentales para preservar la salud pública, ya que existe todo un conjunto de variables dentro del ambiente acuático, que suponen un riesgo potencial (Martínez y Alvarado, 2013).

Una amplia variedad de microorganismos como bacterias, parásitos, hongos, y virus, pueden encontrarse en las piscinas al introducirse al agua por diferentes vías (Figura 1) (WHO, 2006). La contaminación con microorganismos patógenos en aguas de piscina, se ha visto relacionada entre otros factores, con microorganismos de origen fecal producto de la liberación accidental de heces fecales por parte de los bañistas, microorganismos de origen no fecal presentes en la piel o en los fluidos corporales de los usuarios (saliva, orina, vómito, entre otros), la presencia de nadadores con infecciones activas, la contaminación directa en piscinas expuestas al aire libre por animales como aves y/o roedores; al igual que por el uso de fuentes de agua contaminadas (WHO, 2006). Adicionalmente se ha reportado que algunas bacterias y parásitos presentan riesgo de infección, al colonizar las superficies y componentes de las instalaciones (sistemas de calefacción y ventilación), a partir de la formación de biofilms (Nichols, 2006).

Una de las fuentes de contagio en las piscinas se da producto de la ingestión accidental de agua, siendo esta la principal vía de transmisión de microorganismos patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales, sin desestimar otras formas de contagio como la absorción dérmica o la inhalación (Díaz *et al.*, 2011). Desencadenando en un sinnúmero de infecciones a nivel dérmico, respiratorio, urogenital, gástrico, e inclusive afectando al sistema nervioso central de las personas que acuden al uso de este tipo de aguas de recreación.

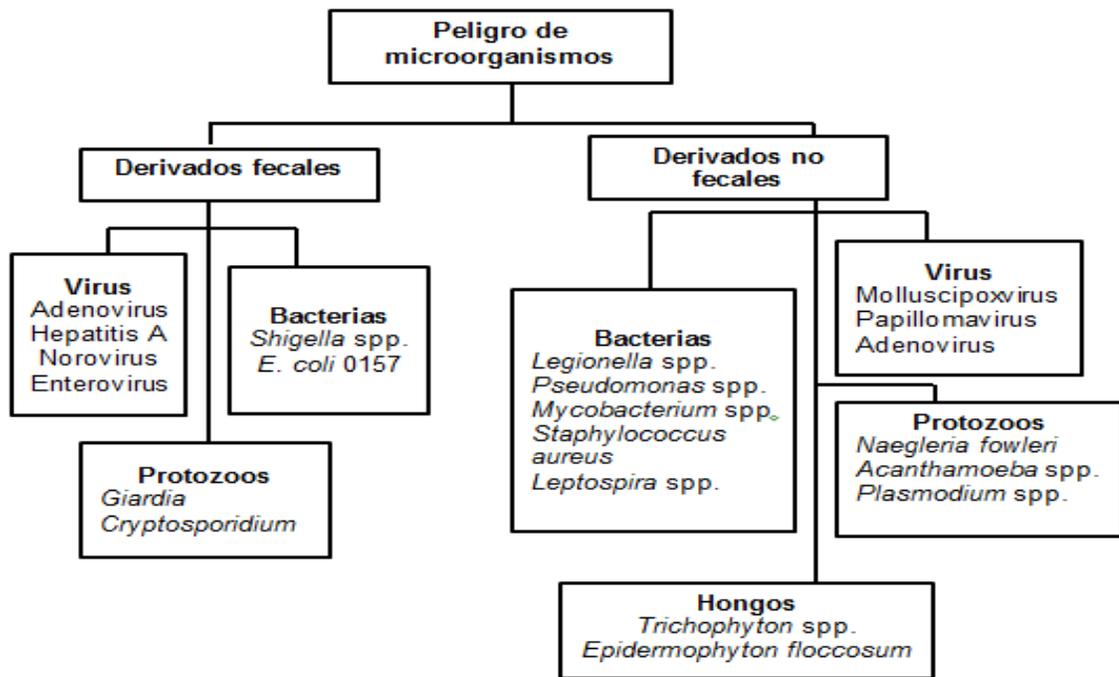


Figura 1. Microorganismos asociados a las piscinas y ambientes similares (WHO, 2006).

Históricamente se tiene información de diferentes casos de infecciones adquiridas en aguas de recreación, como los ocurridos en 1997 y 1998, donde 2000 personas enfermaron a causa del agua contaminada en piscinas públicas en Atlanta, Estados Unidos; así como el reportado en 1998, en el que siete niños sufrieron complicaciones a nivel del hígado, como producto de un proceso infeccioso producido por *Escherichia coli* (Castro y Chaidez, 2003). Miembros bacterianos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, y *Shigella spp*, han sido frecuentemente encontrados en piscinas y reportados como responsables de brotes de foliculitis, dermatitis, conjuntivitis, e infecciones diarreicas. De igual forma entre otros agentes, en los últimos años existe especial preocupación por la presencia microorganismos

protozoos como *Giardia spp* y *Cryptosporidium spp* en aguas de piscina, ya que estos además de ser muy infectivos, presentan un elevado nivel de resistencia a los agentes empleados para la desinfección del agua, como el cloro. Finalmente, un amplio grupo de agentes infecciosos como los virus, han sido implicados en brotes en piscinas públicas incluyendo, *Adenovirus*, *Polivirus*, *Enterovirus* y el *virus de la Hepatitis A* (Castro y Chaidez, 2003; Izquierdo, 2009; Martínez y Alvarado, 2013). De acuerdo a los datos aportados por la CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades) cerca de 142 brotes por el uso recreativo del agua, ocurrieron en el transcurso de los años 2007 y 2008, ocasionando 13.966 casos de enfermedad en países como Puerto Rico (CDC, 2011).

Los microorganismos comúnmente empleados como indicadores de la calidad microbiológica de las piscinas y aguas de recreación semejantes incluyen, recuento en placa de heterótrofos (HPC), indicadores de origen fecal (*Escherichia coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella spp*, protozoos (*Giardia spp*, *Cryptosporidium spp*) y algunas amebas de vida libre (*Naegleria spp*, *Acanthamoeba spp*). Siendo el recuento en placa de heterótrofos (HPC), coliformes totales y fecales, los indicadores más utilizados. Sin embargo, es bien sabido que la ausencia de estos microorganismos no garantiza actualmente la seguridad en el agua de las piscinas, puesto que son cada día mayores los reportes referentes a microorganismos que desarrollan una resistencia superior a la de los indicadores evaluados regularmente, por lo que no hay ningún organismo indicador perfecto (WHO, 2006; NOM-245-SSA1-2010).

3.3.1.1.1. Tratamiento de aguas de piscina

Dentro de las posibilidades existentes para el tratamiento del agua de las piscinas, se encuentran los tratamientos primarios basados en el uso de barreras físicas, como la filtración. Los métodos de filtración constituyen un papel importante dentro del proceso de desinfección en aguas de piscina, propiciando la eliminación de contaminantes biológicos con resultados que dependen de la eficiencia de los filtros empleados. Sin embargo, este tipo de métodos no destruyen los microorganismos presentes en el agua, por lo que no resultan suficientes. Como consecuencia, cuando los filtros se encuentran obstruidos por la formación de biopelículas, estos pueden convertirse en una fuente de contaminación biológica con la generación de olores desagradables debido a los metabolitos bacterianos generados (Schwartz *et al.*, 2009).

Una de las alternativas comerciales más extendidas para la desinfección del agua, es el uso de sustancias oxidantes como el cloro. La cloración, fue introducida en Bélgica en 1902 (MWH, 2005), y desde entonces ha sido el proceso químico más utilizado; nueve de cada diez piscinas son desinfectadas con cloro, principalmente

porque es efectivo, económico, y provee una protección residual. Otros desinfectantes como el dióxido de cloro, bromo, yodo, y ozono también son empleados en aguas de piscina (Chowdhury *et al.*, 2014). Todos estos métodos tienen como fin último, la degradación de las sustancias contaminantes presentes en el agua, especialmente microorganismos patógenos. No obstante, el uso de compuestos químicos para la desinfección del agua es objeto de estudio. Cada día es mayor el número de microorganismos que presentan resistencia a estos compuestos, como es el caso de *Mycobacterium avium* bacteria ubicua, formadora de biofilms y resistente al cloro libre; y del parásito *Cryptosporidium parvum* (Shannon *et al.*, 2008). También son bien conocidos los efectos adversos sobre la salud, producto de reacciones no deseadas entre estos desinfectantes y la materia orgánica presente en el agua de las piscinas (cabello, orina, cosméticos, sudor, y restos de la piel de los bañistas); con lo que finalmente son obtenidos subproductos de la desinfección (DBPs) como, trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos (HAA), yodo- THM, y las nitrosaminas; considerados en su mayoría como mutagénicos y/o cancerígenos (Richardson, 2011). Otros efectos en la salud de los asistentes a las piscinas han sido asociados a los DBPs, como irritación ocular, asma y disnea (Fantuzzi *et al.*, 2010).

Métodos adicionales para el tratamiento de agua de piscina, como la irradiación UV, el uso de carbón activado y la ionización, han sido evaluados aunque en menor proporción; no obstante el requerimiento de equipos sofisticados y costos operacionales, limitan en gran medida su uso (Richardson, 2011).

3.3.2. Procesos de oxidación avanzada (POAs)

La contaminación ambiental es un problema reconocido que genera gran preocupación, especialmente en torno a la amplia gama de contaminantes tóxicos y microorganismos patógenos peligrosos presentes en el medio acuático. El uso de lodos activos, carbón activado, separaciones sólido-líquido, filtración, floculación y la desinfección química, son algunos de los principales métodos de tratamiento abordados para la descontaminación del agua. Sin embargo, llevar a cabo la descomposición completa de los contaminantes persistentes en el recurso hídrico por estos métodos resulta difícil, puesto que muchas veces estos procedimientos no logran alcanzar los requerimientos para su utilización después del tratamiento (Suzuki *et al.*, 2015). En respuesta a la creciente demanda ambiental para la descontaminación de este recurso, en los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías, teniendo en cuenta aspectos fundamentales como la factibilidad de reúso, la economía y eficiencia de los procesos, y sus rangos de aplicación. Los procesos de oxidación avanzada (POAs) constituyen una de las alternativas más prometedoras, conduciendo a la mineralización total de los contaminantes

orgánicos presentes en el agua. En la tabla 1, pueden observarse algunas de las áreas de aplicación de los POAs en agua.

Tabla 1. Posibles aplicaciones de los POAs en agua.

| | |
|---------------------|-------------------------------|
| Reciclado de aguas | Aguas residuales municipales |
| Aguas subterráneas | Desinfección |
| Aguas superficiales | Agua de Piscinas |
| Agua ultrapura | Aguas residuales industriales |

Domínguez, 2012.

El tratamiento del agua utilizando las tecnologías de oxidación avanzada, se basa en procesos fisicoquímicos con capacidad de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes, ya que involucran la generación mediante el uso de diferentes formas de energía, de especies con un elevado poder oxidante como el radical hidroxilo (HO•); cuyo potencial de óxido-reducción es mucho más elevado que el de otras especies oxidantes conocidas (Tabla 2). Este radical es altamente efectivo para la oxidación de materia orgánica, moléculas aromáticas, metales pesados, microorganismos patógenos, entre otros; mediante diferentes rutas como la abstracción de hidrógeno, o por la adición electrofílica a enlaces dobles, lo que da lugar a las reacciones de degradación oxidativa (Gogate y Pandit, 2004). Algunos de estos procesos se complementan con el uso de agentes reductores químicos que permiten transformar algunos contaminantes tóxicos que resultan poco susceptibles a la oxidación, como iones metálicos y ciertos compuestos halogenados (Suzuki *et al.*, 2015).

Tabla 2. Potencial de óxido-reducción de algunos agentes oxidantes.

| Especie | Eo (V, 25°C) | Especie | Eo (V, 25°C) |
|-----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| Flúor | 3.03 | Radical perhidroxilo | 1.70 |
| Radical hidroxilo | 2.80 | Permanganato | 1.68 |
| Oxígeno atómico | 2.42 | Dióxido de cloro | 1.57 |
| Ozono | 2.07 | Ácido hipocloroso | 1.49 |
| Peróxido de hidrogeno | 1.78 | Cloro | 1.36 |

Forero *et al.*, 2005

Principales ventajas de los procesos de oxidación avanzada:

- No solo cambian de fase al contaminante, transformándolo a su vez químicamente en compuestos inocuos.
- Generalmente es posible llevar a cabo la mineralización completa de los contaminantes.
- Son pocos selectivos dando opción de tratar mezclas de contaminantes.
- No forman subproductos de reacción que representen riesgos a la salud.
- Suelen mejorar las características organolépticas del agua tratada.
- Consumen menos energía que otros tratamientos convencionales.
- Operan en rangos donde los sistemas convencionales no son factibles (Forero *et al*, 2005; Martínez, 2011).

Estos procesos presentan adicionalmente una gran versatilidad, lo que da lugar al ajuste de tratamientos bajo condiciones específicas para la descontaminación de diferentes tipos de agua y a su uso en la remoción de agentes contaminantes, sobre todo a pequeña y mediana escala. Existe gran variedad de estos procesos, pero todos pueden clasificarse en dos grupos principales: procesos no fotoquímicos y procesos fotoquímicos; estos últimos corresponden a aquellos que utilizan de una manera u otra, la luz (Palomares, 2013). En la tabla 3, se presenta la clasificación de los principales procesos de oxidación avanzada. Los POAs generalmente pueden ser utilizados solos o combinados, con la posibilidad de ser aplicados también a contaminantes del aire y suelos.

Tabla 3. Clasificación de Tecnologías Avanzadas de Oxidación.

| PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA | |
|--|--|
| PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS | PROCESOS FOTOQUÍMICOS |
| Ozonización en medio alcalino (O ₃ /OH ⁻) | Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (UVV) |
| Ozonización con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂) | UV/peróxido de hidrógeno |
| Procesos Fenton (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂) | UV/O ₃ |
| Oxidación electroquímica | Fotocatálisis heterogénea |
| Radiólisis y y tratamiento con haces de electrones | Foto-Fenton |

Palomares, 2013.

3.3.2.1. Principios de Fotocatálisis y reacciones fotoquímicas

La fotocatalisis puede ser definida como la aceleración de una foto-reacción mediante un catalizador. Estas reacciones emplean fuentes de emisión de fotones que van desde lámparas de luz ultravioleta hasta la radiación solar, cuyo espectro e intensidad están directamente relacionados con la eficiencia del proceso (Garcés *et al.*, 2012). Ambos, luz y catalizador, son necesarios para llevar a cabo la aceleración de la reacción química.

A nivel de las reacciones de fotocatalisis existen dos tipos de procesos principales:

1. **Fotocatálisis homogénea:** procesos mediados por compuestos férricos, en los que reactivos y foto catalizadores se encuentran en la misma fase (una sola fase).
2. **Fotocatálisis heterogénea:** procesos mediados por un material semiconductor como catalizador, en los que el reactivo y el catalizador se encuentran en fases distintas (dos fases de interacción) (Braslavsky, 2011).

3.3.2.2. Materiales fotocatalíticos: Dióxido de titanio

Existe gran variedad de materiales a ser empleados como mediadores del proceso de fotocatalisis heterogénea, principalmente óxidos y halogenuros de metales de transición como: ZnO, CdS, ZnS, RuO₂, WO₃, MgO, SnO₂, GaP, GaAs, y Fe₂O₃. Todos estos en función de sus propiedades han sido aplicados en diferentes áreas como la electrónica, en el campo de la catálisis para la producción de químicos como el cloro, la degradación de contaminantes, la disociación fotocatalítica del agua, y en el caso particular del SnO₂, para la producción de biocombustibles (Peral, 2011). No obstante hoy por hoy el fotocatalizador más utilizado y abordado por un amplio número de investigaciones especialmente de tipo ambiental, es el TiO₂. Este óxido metálico, existe en tres formas cristalinas (anatasa, rutilo, brokita), siendo la anatasa y el rutilo las más usadas por características como su estabilidad y foto-actividad (Gupta y Triphati, 2011).

El TiO₂ como material semiconductor presenta características útiles para el desarrollo de procesos fotocatalíticos, su foto-actividad, el ser inerte biológica y químicamente, estable a la corrosión, de bajo costo y toxicidad, y sensible a la luz hacen de este un material idóneo (Yang *et al.*, 2012). Los foto-catalizadores de

película delgada a base de TiO_2 se han investigado ampliamente para aplicaciones ambientales en torno al tratamiento del aire y de aguas, debido a su fuerte poder oxidante, alta actividad catalítica, efecto de auto-limpieza, acción bactericida y actividad de desintoxicación. Este material basado en sus propiedades ópticas, al ser irradiado por una fuente lumínica (particularmente luz UV) en relación con su energía de banda prohibida (3.2 eV), genera cargas que conducen a la producción de radicales oxidantes que pueden mineralizar contaminantes (Deuk *et al.*, 2014). Este último aspecto mencionado constituye posiblemente la única debilidad sustancial de TiO_2 como foto-catalizador, ya que este material presenta dificultad en la eficiencia de su actividad, al ser irradiado a longitudes de onda en el rango visible. Desde el inicio de las investigaciones basadas en la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 se ha recurrido al uso de lámparas UV entre otras razones, porque de esta manera es más factible controlar las condiciones experimentales, así como por la posibilidad de obtener radiación continua en las longitudes de onda deseadas (espectro de luz UV); conforme a las propiedades que presenta el TiO_2 como catalizador. Sin embargo, ha sido constante el interés y la necesidad en función de que estos procesos resulten más viables económicamente, el poder disponer de una fuente energética de bajo costo como la irradiación solar, para mediar las reacciones fotocatalíticas con éxito a partir de TiO_2 (Garcés, 2012).

En función de esta particularidad, actualmente son evaluados diferentes mecanismos para mejorar las propiedades de este material, entre ellos el dopaje del TiO_2 con materiales metálicos y no metálicos. Uno de los materiales no metálicos más empleados para dicho fin, ha sido el nitrógeno (N), a partir de este se ha reportado una mejora en la actividad fotocatalítica del TiO_2 en la región visible, al verse favorecida la promoción de electrones desde la banda de valencia hacia la banda de conducción en el proceso de fotocatalisis; como producto de la inserción de los átomos de N en el TiO_2 (Téllez y Díaz, 2010). Otros elementos de transición como el cromo (Cr), han sido utilizados con éxito en conjunto con el TiO_2 mejorando la actividad del semiconductor, a partir de la conformación de compuestos coloreados que absorben de manera más eficiente la radiación del espectro visible; lo cual ha sido empleado entre otras cosas, para degradar colorantes como el azul de metileno (Giraldo y Marroquín, 2014). Otros mecanismos por su parte como la fotosensibilización del TiO_2 con colorantes comerciales para la degradación de contaminantes orgánicos en el agua, han sido explorados de igual modo para aumentar las propiedades catalíticas de este material en torno a la absorción de la radiación en el espectro visible (Leguizamón *et al.*, 2010). Estos como otros mecanismos propuestos mediante el uso de diferentes compuestos que buscan mejorar generalmente las propiedades de conducción del TiO_2 , son motivo de numerosos trabajos en la actualidad, siendo la fotocatalisis con TiO_2 una de las más prometedoras tecnologías de oxidación avanzada para la eliminación de contaminantes en baja y mediana concentración con el uso de luz artificial o natural (Yang *et al.*, 2012).

3.3.2.2.1. Foto-catalizadores nanoparticulados

En la última década, la importancia tanto tecnológica como económica de la fotocatalisis ha crecido considerablemente. Los incrementos en los rendimientos han sido fuertemente relacionados a los avances en la nanotecnología; un ejemplo de ello atiende al uso de foto- catalizadores nanoparticulados, lo que ha mejorado considerablemente la eficiencia catalítica de estos materiales. En la era de la nano ciencia en la que los dispositivos y tecnologías se direccionan hacia tamaños cada vez más pequeños con propiedades mejoradas; la catálisis es un importante campo de aplicación (Lee *et al.*, 2009). Este proceso se puede utilizar en diversas áreas tales como la eliminación del olor del agua potable, la degradación de los derrames de petróleo en sistemas de agua superficial, la eliminación de agentes microbianos y la degradación de contaminantes orgánicos nocivos, tales como herbicidas, pesticidas y colorantes (Tapia, 2014).

Los nanomateriales son aquellos que cuentan con al menos una de sus dimensiones por debajo de los 100 nm. Entre estos se encuentran las partículas nanocristalinas, como materiales que poseen hasta tres de sus dimensiones en la escala nanométrica. El uso de nanocristales de TiO_2 como catalizadores, es quizás uno de los nanomateriales que genera hoy día mayor interés. Las partículas nanocristalinas de dióxido de titanio (TiO_2) presentan gran potencial en aplicación para efectos de fotocatalisis, recubrimientos en superficies de auto limpieza, aplicaciones fotovoltaicas, la eliminación de metales pesados, membranas cerámicas, sensores de gas, soluciones para la desintoxicación y la oxidación de los contaminantes orgánicos tóxicos en el agua (Fujishima y Zhang, 2006). La amplia gama de aplicaciones del TiO_2 se debe principalmente a sus propiedades como inercia química, baja toxicidad, a su estabilidad en un intervalo de pH bajos, y condiciones de irradiación (Yang *et al.*, 2012).

El principio para la comprensión del concepto de catálisis basado en el uso de nanocristales, implica la relación del área superficie-volumen, en la que en los objetos pequeños se ve favorecido a un conjunto de propiedades del material y con ello a la reacción química. Entre los factores que hacen que los nanomateriales difieran significativamente de otros materiales, se encuentra su aumentada relación superficie volumen, y su efecto cuántico; lo que mejora las propiedades ópticas, catalíticas (reactividad), magnéticas, fuerza, y características eléctricas del material (Lubick y Betts, 2008). Entre los lineamientos bajo los cuales debe orientarse la generación de nanocatalizadores de avanzada se encuentran, la obtención de productos a partir de materias primas de bajo costo y el desarrollo de procesos energéticamente eficientes, y ambientalmente amigables. La introducción de un nanocatalizador puede aumentar la velocidad de una reacción de diferentes maneras entre ellas al reducir la energía activación, al actuar como un facilitador y

conducir las especies reactivas de forma más eficaz, o al crear una mayor rendimiento de una especie cuando dos o más productos se forman (Chaturvedi *et al.*, 2012).

3.3.2.3. Fotocatálisis Heterogénea

La fotocatalisis heterogénea como una de las tecnologías de oxidación avanzada, atiende a un proceso de absorción de energía radiante dentro del rango visible o ultravioleta por parte de un foto-catalizador (material semiconductor) sólido, que posee una banda de valencia o band gap determinada; entendiendo la energía de band gap como la energía que debe recibir un electrón de la banda de valencia, para pasar a la banda de conducción. La anchura de la banda prohibida en los semiconductores es pequeña, por lo que resulta fácil excitar los electrones de la banda de valencia hacia la banda de conducción ((Javaid *et al.*, 2015). Estos dos componentes en conjunto (catalizador- energía radiante), promueven una serie de reacciones foto- electroquímicas por transferencia de electrones desde la banda de valencia hacia la banda de conducción en el catalizador, formando pares electrón-hueco que dan lugar a la generación de especies reactivas del oxígeno como, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} , y H_2O_2 con capacidad de degradar la materia orgánica y/o contaminantes indeseables presentes (Hermann, 2010).

Entre las posibilidades que aporta la fotocatalisis heterogénea para el tratamiento de líquidos contaminados como el agua se encuentran: la aplicación del proceso bajo condiciones ambientales, el uso de catalizadores de bajo costo, la oxidación completa de los contaminantes, y la opción de emplear como fuente de foto- excitación la energía solar (Malato *et al.*, 2009; Bonetta *et al.*, 2013).

3.3.2.3.1. Mecanismo de acción de la fotocatalisis heterogénea

El mecanismo de acción de la fotocatalisis heterogénea parte de la foto- excitación del material semiconductor, lo que provoca que un electrón (e^-) en la banda de valencia pase a la banda de conducción dejando una deficiencia de un electrón o hueco (h^+) en la banda de valencia, lo que se traduce en la generación de un par e^-/h^+ . El foto-catalizador puede estar en suspensión para aumentar el área de acción o inmovilizado sobre algún soporte para evitar una posterior etapa de separación, y adicionalmente para permitir su reutilización (Malato *et al.*, 2009).

La secuencia de reacciones que comprende la fotocatalisis heterogénea en la degradación de contaminantes en el agua, se describe en cinco etapas fundamentales:

- (i) Transferencia de los reactantes (contaminantes) a través de la fase líquida hacia la superficie del catalizador.
- (ii) Adsorción de los contaminantes.
- (iii) Reacción en la fase adsorbida (adsorción de fotones por el sólido, creación de pares electrón/hueco, reacciones de transferencia de electrones).
- (iv) Desorción de los productos finales.
- (v) Remoción de los productos de la región de interface (Herrmann, 2010).

Una vez la luz incide sobre el catalizador y se adsorbe, se forman especies excitadas primarias las cuales migran a la superficie del semiconductor, donde se efectúan un conjunto de reacciones de óxido-reducción. En medios acuosos y en presencia de aire, el oxígeno captura los electrones en la banda de conducción formando radicales superóxido (O_2^-), y su forma protonada, el radical hidroperóxido (HO_2^-). Este radical posteriormente producirá peróxido de hidrógeno H_2O_2 . En aplicaciones ambientales, los procesos fotocatalíticos se llevan a cabo normalmente en ambientes aeróbicos, con lo cual el oxígeno adsorbido es la principal especie aceptora de electrones. Por su parte los huecos (h^+) generados tienen la posibilidad de reaccionar con moléculas de agua o con aniones hidróxido, generando radicales hidroxilo (HO). En términos generales, las moléculas de agua como donador, serán adsorbidas reaccionando con el hueco en la banda de valencia, y el radical superóxido lo hará con el electrón en la banda de conducción (Tapia, 2014). Los h^+ también pueden llenarse al reaccionar con un compuesto orgánico adsorbido en el semiconductor. En estas reacciones el flujo neto de los electrones es nulo, por lo que el catalizador permanece inalterado. Durante el proceso los h^+ , y los radicales HO, O_2 que se generaran, pueden actuar como oxidantes provocando la degradación y la mineralización de la sustancia tratada.

En la figura 2 puede observarse gráficamente el mecanismo de acción por fotocatalisis heterogénea con TiO_2 . En él se indica que en presencia de especies reductoras y oxidantes adsorbidas en la partícula del semiconductor y bajo iluminación, se producen simultáneamente reacciones de oxidación y de reducción en la superficie del semiconductor; donde los huecos foto- generados dan lugar a las reacciones de foto-oxidación, mientras que los electrones de la banda de conducción dan lugar a las reacciones de foto-reducción. La figura 3 representa las reacciones elementales sucesivas que ocurren en la reacción total de degradación oxidativa.

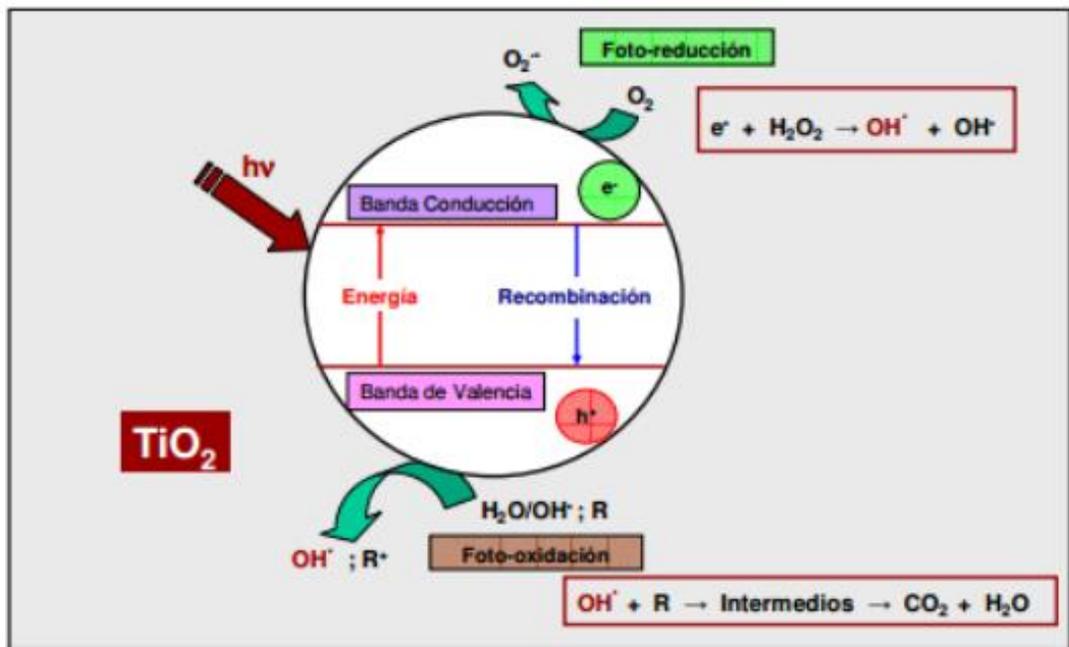


Figura 2. Representación gráfica del mecanismo de acción por fotocatalisis heterogénea empleando TiO_2 como foto-catalizador.

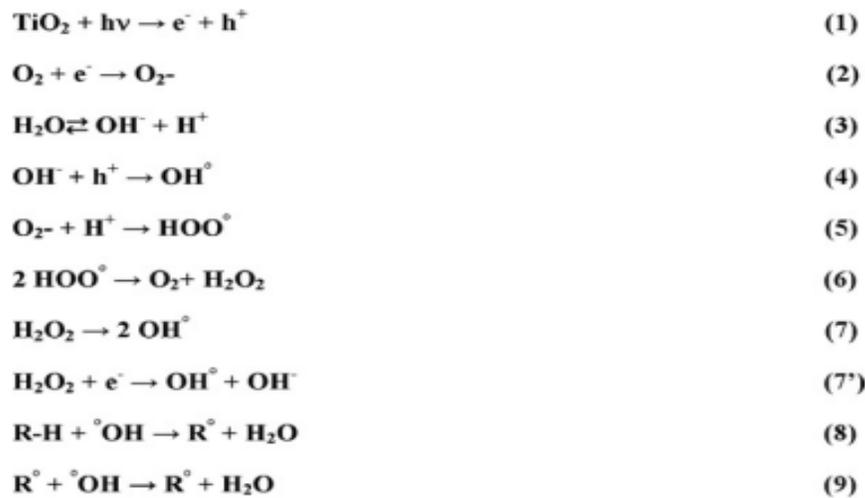


Figura 3. Reacciones elementales sucesivas en una reacción total de degradación oxidativa.

En la fotocatalisis heterogénea los compuestos orgánicos en fase líquida, son degradados hasta sus correspondientes intermediarios e inclusive mineralizados obteniéndose como productos, dióxido de carbono y agua (Chong *et al.*, 2010).

3.3.2.3.2. Mecanismo de acción microbicida de la fotocatalisis heterogénea

El conocimiento que se tiene en la actualidad acerca de la actividad microbicida de la fotocatalisis, indica que las especies oxidantes producidas de manera directa o indirecta durante este proceso, pueden ocasionar la inactivación de microorganismos al generar diferentes tipos de daños en los constituyentes celulares. Se cree que los daños a nivel general sufridos por las células ante el ataque fotocatalítico con TiO_2 , inician en la pared celular, seguido por la membrana citoplasmática, y finalizan en un ataque directo a nivel intracelular (Figura 4). Entre las especies con efecto biocida generadas se encuentran, el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Algunos estudios enfatizan en el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) como la especie más importante responsable del ataque a la pared celular, la modificación de la permeabilidad de la membrana, y la muerte celular en diferentes microorganismos (Robertson *et al.*, 2012).

Como una vía directa de oxidación, en un microorganismo o virus que se encuentre en contacto con la superficie del TiO_2 puede darse la transferencia directa de un electrón o un hueco al microorganismo o a alguno de sus componentes provocando así, la oxidación desde el exterior. Por otra parte, si las partículas de dióxido de titanio son lo suficientemente pequeñas (nanopartículas), éstas pueden ingresar a la célula y las reacciones de oxidación pueden efectuarse en su interior. Los radicales hidroxilo $\cdot\text{OH}$ a diferencia de los radicales superóxido $\text{O}_2^{\cdot -}$ son altamente reactivos por lo que tienen una vida corta. Una vez generadas ambas especies en la superficie de las partículas de TiO_2 , estas interaccionan inmediatamente con la pared externa de los microorganismos, a menos de que las partículas de dióxido de titanio hayan penetrado la célula. Existe también la posibilidad de una vía secundaria o indirecta en la que moléculas oxidantes como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) producidas durante la reacción fotocatalítica, puedan alimentarse de una reacción Fenton in vivo, resultando en la formación de radicales OH^{\cdot} intracelulares que ataquen el organismo simultáneamente. Esto teniendo en cuenta que el hierro disponible dentro de la célula actúa como catalizador en este tipo de reacciones de oxidación; partiendo de que la intervención de compuestos férricos, es una de las características particulares que facilitan los procesos de oxidación a partir de reacciones Fenton. En el caso de *Escherichia coli* su capacidad para captar hierro es conocida. Los niveles de hierro en la superficie de la célula son considerables, encontrándose éste en el espacio periplasmático o en su interior, formando

complejos de hierro o como parte de proteínas que almacenan este elemento, como lo es la ferritina (Fernández, 2005).

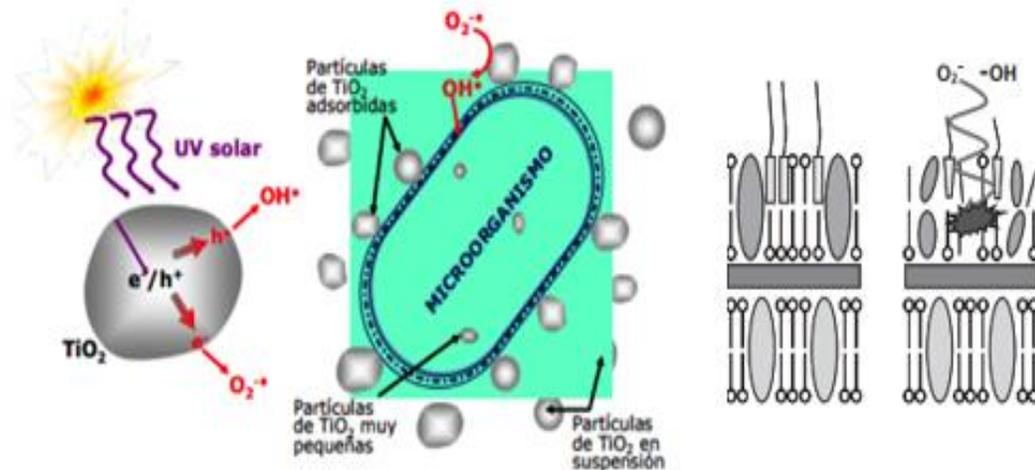


Figura 4. Esquema del proceso microbicida de la fotocatalisis (Hashimoto *et al.*, 2005).

Por otra parte dentro de los efectos microbicidas de la fotocatalisis, se describe el deterioro de las funciones celulares producto de los daños oxidativos inducidos en los ácidos nucleicos (ARN y ADN) durante el proceso; siendo el ARN más propenso a los daños oxidativos. Se cree que las especies reactivas del oxígeno, incluyendo los radicales hidroxilo en conjunto con la fuente de irradiación empleada, pueden causar daños en el ADN, resultando en efectos múltiples que incluyen la ruptura de la doble cadena de ADN, la reticulación a otras moléculas (formación de cadenas tridimensionales), y lesiones que bloquean la replicación (formación de dímeros de pirimidina) (Malato *et al.*, 2009). Es evidente que el ADN es uno de los objetivos clave en la inducción lesiones a partir de las reacciones de foto-oxidación, donde la fuente de irradiación influye particularmente. Dependiendo del tipo de luz la eficiencia del proceso fotocatalítico con fines biocidas puede disminuir, ya que a ciertas intensidades esta no es absorbida directamente por los ácidos nucleicos. En el caso de la luz ultravioleta su efectividad atiende a daños en ciertas coenzimas o citocromos en los microorganismos lo que repercute en operaciones fisiológicas esenciales para el mantenimiento de la viabilidad de las células. Sin embargo, las células a su vez presentan mecanismos moleculares de reparación que le confieren resistencia a los tratamientos fotocatalíticos con luz UV en algunas ocasiones (Pigeot *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que la membrana y pared celular son los sitios primarios de ataque de las especies reactivas de oxígeno foto generadas, con lo que se producen una serie de alteraciones especialmente a nivel de la membrana por pérdida de la permeabilidad celular, a causa de la peroxidación lipídica. Sin embargo, se considera que los daños posteriores producto del ataque oxidativo en los componentes celulares internos, son en última instancia un factor determinante en la muerte celular. Entre las bases que soportan lo anterior se encuentran los trabajos realizado por Matsunaga y colaboradores quienes reportan daños en la célula referentes a la inhibición de enzimas de importancia vital, como la Coenzima A (CoA) implicada en la respiración celular. Así como, los resultados reportados por Saito y colaboradores, en los que se informa como efectos de la fotocatalisis en *Streptococcus sobrinus* alteraciones en la membrana celular, la pérdida de ciertos iones intracelulares (K⁺), la liberación de proteínas y ARN, seguido de la lisis celular, tras ser aplicado el proceso fotocatalítico (Robertson *et al.*, 2012).

3.3.2.4. Parámetros que influyen en la fotocatalisis heterogénea

Un gran número de parámetros influyen cualitativa y cuantitativamente en el proceso de óxido-reducción mediante fotocatalisis, por lo que resultan determinantes en la eficiencia global del proceso. Entre las principales variables a considerar en la práctica de procesos de fotocatalisis, se encuentran: el pH, características y tipo de catalizador, intensidad de la radiación, la naturaleza y concentración de contaminante, presencia de aditivos, agentes oxidantes, diseño del reactor, y en un menor grado la temperatura; ya que la velocidad de las reacciones fotocatalíticas no se modifica apreciablemente con la variación de la temperatura del sistema (Garcés *et al.*, 2012).

Partiendo de características como el pH, se tiene conocimiento de que el proceso de fotocatalisis es más eficiente en ambientes ácidos con valores de pH entre 3 y 5. Esta condición afecta tanto las propiedades superficiales del catalizador como la forma química del compuesto contaminante que se desea degradar; manifestándose en variaciones en la velocidad de degradación obtenida. Las características del fotocatalizador por su parte, presentan gran influencia en el desarrollo de las reacciones de óxido-reducción, favoreciendo este proceso cuando cualidades como una alta área superficial y tamaño uniforme de las partículas, se relacionan con el fotocatalizador empleado. Otro factor importante en cuanto al agente catalizador, es que este no se presente en exceso, de manera que no haya un efecto pantalla que enmascare parte de la superficie de las partículas. La intensidad de la radiación es sin duda otro componente importante en la ejecución de reacciones fotocatalíticas, influenciando directamente la cinética, respecto a la formación de pares e⁻/h⁺ (Narváez y Cohen, 2012).

Entre los factores tenidos en cuenta para evaluar la eficiencia de los procesos de foto oxidación, es importante la naturaleza y el tipo de contaminante a tratar. En la aplicación de fotocatalisis para la destrucción de microorganismos, se sugiere que la tendencia en función del grado de sensibilidad que presenta cada microorganismo a ser destruido por foto-oxidación, representa una de las variables más interesantes en función de la respuesta esperada. En este sentido el comportamiento observado por los diferentes trabajos en esta área, referentes a la susceptibilidad de cada tipo de organismo al ser tratados por fotocatalisis, presenta el siguiente orden: virus, bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, parásitos, levaduras, y esporas bacterianas; siendo estas últimas las más resistentes a la destrucción mediante procesos de oxidación (Pigeot *et al.*, 2011). Varias bacterias Gram-negativas y Gram- positivas implicadas como patógenos en los seres humanos y animales, se ha demostrado son inactivados mediante fotocatalisis. En el caso de bacterias Gram positivas, se ha observado que estas presentan un mayor grado de resistencia respecto a las de tipo Gram negativo. La diferencia sustancial en la sensibilidad entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se atribuye a las diferencias en la constitución morfológica entre estos microorganismos; donde las bacterias Gram- positivas presentan un mayor grado de resistencia, dado a la estructura de su pared celular que consta de varias capas de peptidoglicano resultando en un mayor grosor, en comparación con la pared celular de las bacterias Gram negativas, la que resulta mucho más delgada (Ungureanu, *et al.*, 2015). Otros estudios, han reportado la inactivación mediante fotocatalisis con TiO_2 nanoestructurado de parásitos, y de organismos eucariotas más complejos como levaduras y hongos filamentosos, donde se demuestra que la presencia de una estructura más sofisticada en el caso de estos organismos aumenta el grado de resistencia a la destrucción mediante foto-oxidación; por lo que es considerable el efecto obtenido en función de las células que se desee destruir con la aplicación de estos procesos (Robertson *et al.*, 2012; Thabet *et al.*, 2013).

Determinadas sustancias o aditivos, también pueden influir en la eficacia del proceso de fotocatalisis, por inhibición del proceso o acelerando la velocidad de degradación del contaminante. Algunos aniones inorgánicos en el caso de los cloruros, sulfatos y fosfatos son ejemplo de ello. La inhibición puede presentarse por la adsorción de los iones en el catalizador, que compiten con la adsorción del contaminante; o por el contrario la efectividad puede incrementarse cuando iones como el $\bullet\text{SO}_4$ se forman resultando favorables, al ser fuertemente oxidantes. Otros iones producidos a partir de sales de hierro, aumentan la velocidad de las foto-reacciones, a partir de eventos adicionales que involucran reacciones tipo Fenton reforzando el proceso, cuando el H_2O_2 hace parte de las especies oxidantes producidas durante la fotocatalisis. Otros compuestos aditivos orgánicos como el ácido oxálico, ácido acético, y el formaldehído, pueden mejorar la actividad del fotocatalizador al capturar agujeros durante el proceso, aumentando la selectividad de este para la degradación de los compuestos diana (Sownya y Meenakshi, 2015).

Por otra parte en cuanto a la presencia de oxidantes, se sabe que estos resultan necesarios para la degradación del contaminante, al ser responsables de la captura de huecos. Cuanto más eficaz sea el oxidante en la captura de huecos, mayor será la velocidad del proceso (Narváez y Cohen, 2012). El oxígeno es el oxidante más empleado, entre otras cosas al ser económico y no competir con el sustrato en el proceso de adsorción. En el caso del ozono este gas incoloro y con alto poder oxidante, es la forma triatómica del oxígeno (O_3) y en fase acuosa se descompone rápidamente a oxígeno y especies radicales. Es ampliamente utilizado para la desinfección de agua potable y aguas residuales, por sus fuertes propiedades oxidantes biocidas. Los mecanismos que influyen durante la oxidación con ozono dependen en la mayoría de los casos del pH de la solución. En condiciones ácidas la oxidación directa se presenta con ozono molecular, mientras que, en condiciones básicas o combinación con luz UV y/o peróxido de hidrógeno predomina la oxidación debida al $\cdot OH$. Para obtener resultados satisfactorios en el tratamiento con ozono, es necesario que este se produzca continuamente en el lugar de la aplicación; lo que constituye la mayor desventaja del proceso debido a los altos costos que esto genera (Palomares, 2013). Finalmente factores como la geometría, la óptica, distribución de luz, tipo de flujo, entre otros relacionados con el tipo de reactor empleado, van a influir sobre el rendimiento final del proceso fotocatalítico.

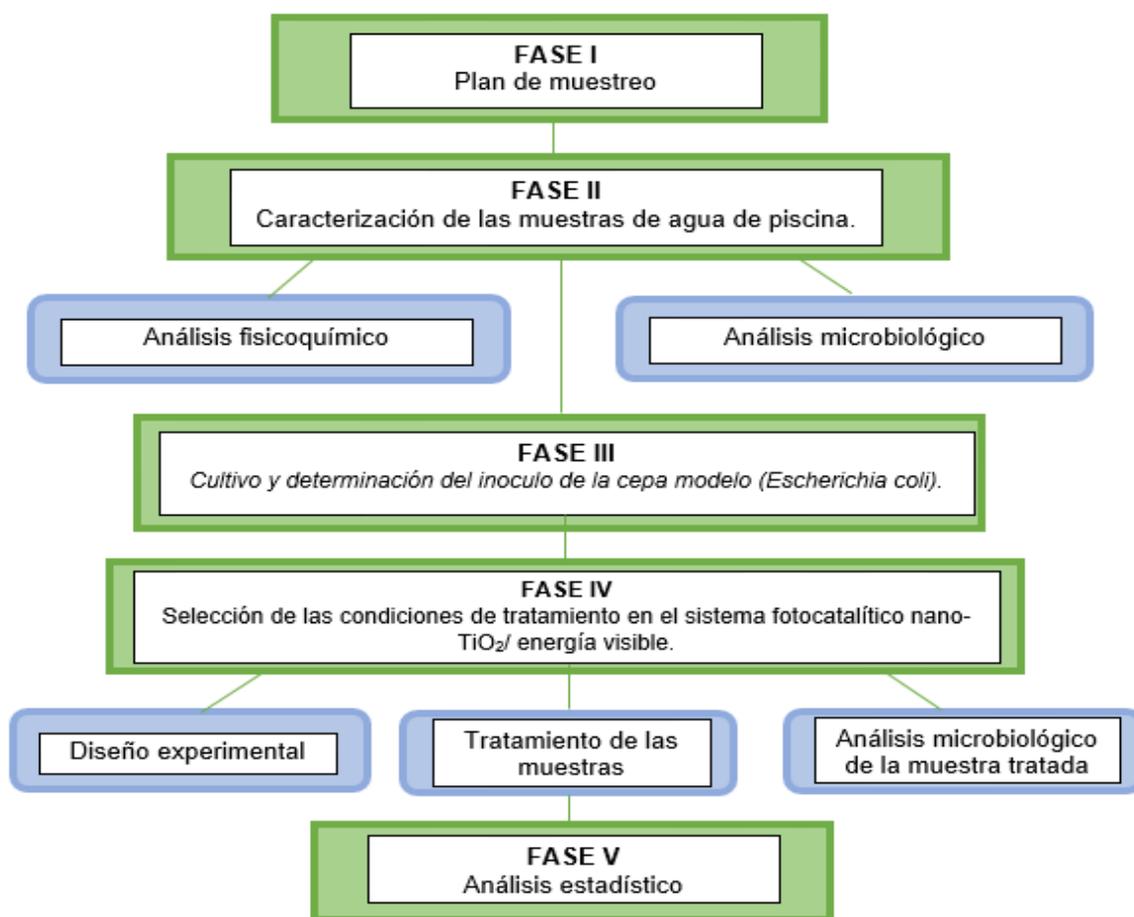
4. METODOLOGÍA

4.1. Área de Estudio

Los trabajos referentes al desarrollo de este estudio, se llevaron a cabo en el laboratorio 44 de Xenobióticos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, de la Ciudad de México.

A continuación se describe la metodología empleada para el tratamiento de aguas de piscina con un sistema de fotocatalisis heterogénea nano-TiO₂/energía visible.

4.2. Estrategias de trabajo



❖ FASE I

4.3. Plan de muestreo.

Las muestras fueron tomadas en una piscina de uso privado, ubicada en el municipio Atlatlahucan, Estado de Morelos.

Se efectuó un método de muestreo aleatorio simple (M.A.S), por técnica manual, practicando las medidas de asepsia necesarias, para mantener la integridad de las muestras recolectadas; destinando en el momento del muestreo un recipiente exclusivo para la recolección de las muestras de agua con fines de análisis microbiológicos, y otro para los de tipo fisicoquímico (APHA, 2005). Para la toma de las muestras se dispuso de recipientes de vidrio con capacidad de 500 mL esterilizados previamente en autoclave (121°C, 1.5 atm, por 15 minutos), adicionando en cada uno de los recipientes recolectores antes de ser esterilizados, 0.1 mL de una solución de tiosulfato de sodio por cada 100mL de agua de piscina, a una concentración del 1.8%, para neutralizar los posibles desinfectantes presentes en las muestras, como cloro u ozono (Papadopoulou *et al.*, 2008). Finalmente la captación del agua se realizó a una distancia de 40 cm del margen de la piscina, y una profundidad aproximada de 30 cm para evitar así, los desechos flotantes (NOM-000-SSA1-2010).

Inmediatamente después de recolectadas las muestras, estas se transportaron al laboratorio en neveras portátiles a temperatura de refrigeración (4°C), y se conservaron a esta temperatura hasta su uso. Su análisis se realizó en un lapso de tiempo inferior a las 24 horas para conservar la confiabilidad de los resultados (Loreto *et al.*, 2009).

❖ FASE II

4.4. Caracterización de las muestras de agua de piscina

4.4.1. Análisis fisicoquímico

La determinación de los diferentes factores (Tabla 4), se efectuó por medio de un analizador multiparamétrico portátil de campo (HANNA instruments. HI 9828).

Tabla 4. Factores fisicoquímicos evaluados.

| FACTOR | EXPRESADO COMO |
|-------------|-------------------------|
| pH | Unidades de pH |
| Temperatura | Grados centígrados (°C) |
| ORP-redox | mV (milivoltios) |

4.4.1.1. Determinación del nivel de cloro

El nivel de cloro se determinó empleando el kit de pruebas rápidas (Chlorine Bromine, pH pool and spa kit). Método cualitativo que se fundamenta en la oxidación del reactivo N,N-dietil-para-fenilendiamina (DPD) al reaccionar con el cloro presente en el agua, generando una respuesta colorimétrica (Figura 5) (NOM-000-SSA1-2010).

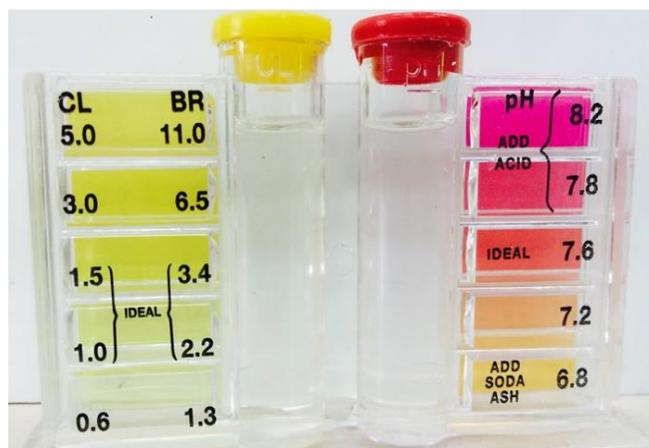


Figura 5. Kit de pruebas rápidas para la detección de cloro en agua de piscina.

4.4.1.2. Análisis microbiológico

Determinación de microorganismos heterótrofos, coliformes totales y fecales (*Escherichia coli*).

Fue aplicada la técnica de filtración por membrana empleando un equipo de vidrio porta membranas Millipore, para la caracterización microbiológica del agua de piscina. Para ello 100 mL de agua referentes a cada muestra se hicieron pasar por filtros de membrana estériles con un tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro, aplicando vacío parcial (Colmenares *et al.*, 2008).

Los análisis realizados corresponden a la cuantificación de microorganismos heterótrofos, coliformes totales y fecales. Para ello después de realizado el filtrado de las muestras, se retiraron los filtros y se depositaron en los medios de cultivo correspondientes. El agar Standard Plate Count (SIGMA) se utilizó para el conteo de microorganismos heterótrofos, y el Agar ENDO (SIGMA) para la verificación de coliformes totales y fecales; las colonias con coloración rosa y colonias con brillo metálico fueron contadas como coliformes totales y fecales, respectivamente. Las placas se incubaron 18-20 horas a 37°C (APHA, 2005).

❖ FASE III

4.5. Cultivo y determinación del inóculo de la cepa modelo (*Escherichia coli*).

La cepa a evaluar en este trabajo como microorganismo modelo, correspondió a *Escherichia coli* CDBB-B-1010, proporcionada por la colección de cultivos microbianos, del Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), de la Ciudad de México.

Se hizo uso de esta bacteria en la fase IV del estudio correspondiente a, la “selección de las condiciones de tratamiento en el sistema fotocatalítico nano- TiO_2 /energía visible”, tal y como se describe en el apartado **4.6**. Para ello se realizó un subcultivo de la cepa en medio líquido (caldo nutritivo /SIGMA), y posteriormente se determinaron títulos de concentración conocida del microorganismo. Para lo anterior, se procedió a la aplicación del método de dilución en serie con recuento en placa, a partir de lo cual fueron obtenidas las soluciones a depositar en cada uno de

los ensayos. Adicionando 1 ml del inóculo correspondiente en cada ensayo fotocatalítico.

❖ FASE IV

4.6. Selección de las condiciones de tratamiento en el sistema fotocatalítico nano- TiO₂/ energía visible.

4.6.1. Reactor fotoquímico Q-200

El fotorreactor “Foto Q-200” que fue utilizado, es fabricado por la empresa mexicana SEV-PREND0 con sede en el estado de Querétaro. Este reactor que generalmente es utilizado en el estudio de reacciones asistidas por luz ultravioleta, se compone de un tubo interno recubierto, el cual es fabricado en cuarzo para permitir el paso de la luz UV sin interferir en ella, y dar lugar a la circulación interna de un fluido líquido con el fin de prevenir el calentamiento de la lámpara (ver figura 6); evitando adicionalmente la posible interferencia del calor en el proceso estudiado.

El reactor se encuentra inserto en una cabina que protege al usuario de la radiación UV, haciendo a su vez mas seguro el equipo. En la parte inferior de la cabina se encuentra un agitador magnético que regula una velocidad de 100 a 1000 rpm; cuenta a su vez con su botón de encendido para la lámpara UV, la cual funciona en un rango de potencia de 0.038 a 0.880 mW/cm²; así como con un condensador que permite adicionar una atmosfera inerte.

Para fines de este trabajo fueron adaptados adicionalmente, dos focos de 23 watts para la evaluación de una fuente de energía visible en el proceso fotocatalítico (Figura 7).

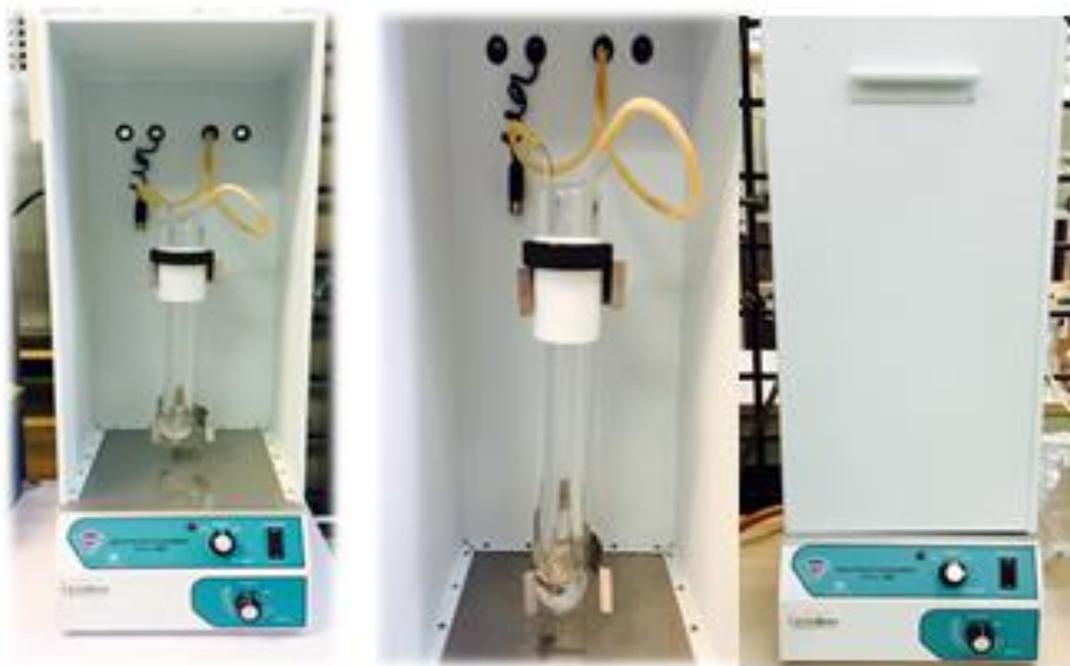


Figura 6. Reactor de fotoquímica Q-200.



Figura 7. Adaptación del Reactor de fotoquímica Q-200, con luz visible.

4.6.2. Ozonizador

El flujo de ozono para el tratamiento fotocatalítico nano-TiO₂ fue suministrado por un ozonizador de la marca "Ozoni" (Ver figura 8), con una fuente de aire que provee un flujo de aire de 1000 cm³/min; y fue dispersado uniformemente dentro del reactor utilizando un difusor convencional.



Figura 8. Ozonizador adaptado al sistema fotocatalítico.

4.6.2.1.1. Preparación de los soportes de nano- TiO₂

La preparación de las placas nano-TiO₂ se realizó con base en los trabajos efectuados por Sinha *et al.*, 2009 y Palomares, 2013.



Figura 9. Diagrama general de la metodología empleada para la preparación de los soportes recubiertos con películas de nano TiO₂.

4.6.3.1. Solución nano estructurada TiO₂

Las soluciones fueron preparadas y almacenadas en frascos de vidrio limpios. La preparación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar con guantes y mascarilla como medidas de protección, y en completa ausencia de luz para evitar activaciones indeseadas de los polvos de TiO₂. Las puntas utilizadas en las micropipetas para la preparación de la solución, fueron desechadas como residuos peligrosos.

Para un volumen final de 200 mL de solución, se preparó una solución con 2g de TiO₂ (Sigma, tamaño de partícula \approx 21 nm) más 1.4 mL de HNO₃ concentrado disueltos en 100 mL de agua des ionizada denominándose “Solución A”. Se preparó además, una segunda solución compuesta de 250 μ L de H₂O₂ al 30% (J.T. Baker), 836 μ L de Isopropóxido de Titanio (TIP) marca Sigma y 100 mL de etanol absoluto, determinada como “Solución B”. Posteriormente se procedió a la mezcla de ambas soluciones agregando lentamente la solución A en la B dentro de una campana de extracción a temperatura ambiente. La mezcla de ambas soluciones se sometió a sonicación por 5 minutos en un recipiente de vidrio limpio, tapado y cubierto de la luz para posteriormente ser almacenada en refrigeración.

4.6.3.1.1. Recubrimiento de las placas con películas de TiO₂

- ***Limpieza de soportes.***

Con el fin de que las placas quedaran libres de cualquier impureza, se realizó una limpieza mediante sonicación en un equipo Bransonic 1510R-MT durante 15 minutos con 4 diferentes solventes en el siguiente orden: agua destilada, etanol grado reactivo, acetona grado técnico y agua des ionizada. Posteriormente se procedió al secado con aire a presión.

- ***Soportes en contacto con la solución de TiO₂.***

Previo a la entrada en contacto con las placas, la solución nanoestructurada se sometió a sonicación por 5 minutos para asegurar una correcta homogenización de la misma. Después de ello, las placas fueron depositadas en un recipiente rectangular de plástico donde les fue adicionada la solución nanoestructurada hasta dejarlas completamente sumergidas por un lapso de 2 horas.

- **Tratamiento térmico, formación de películas delgadas.**

Al transcurrir las dos horas las placas fueron retiradas de la solución de TiO_2 , y dispuestas dentro de la mufla en cajas Petri a una temperatura de $550\text{ }^\circ\text{C}$, por un tiempo de una hora. Una vez concluido el tratamiento térmico, las placas con la película delgada de TiO_2 volvieron en contacto con la solución de TiO_2 , y posteriormente al tratamiento térmico, con las mismas condiciones, una vez terminado el proceso. Finalmente estos soportes se almacenaron en la oscuridad hasta su intervención en la parte experimental. Basado en el trabajo de Sinha y colaboradores en 2009, tomado como referencia para la preparación de las placas nano- TiO_2 ; el recubrimiento de TiO_2 realizado sobre el sustrato de vidrio, al ser analizado por SEM (Microscopia electronica de barrido), arroja películas que resultan homogéneas con un tamaño alrededor de los 50 nm.

4.6.3. Diseño experimental

Para la selección de las condiciones de tratamiento del sistema fotocatalítico nano- TiO_2 / energía visible. Fue evaluado como microorganismo modelo *Escherichia coli*, empleando un diseño factorial fraccionado 2^{7-4} .

4.6.3.1. Diseño factorial fraccionado 2^{7-4}

Con el fin de comprobar la actividad degradativa de los soportes recubiertos con películas nano- TiO_2 en el proceso fotocatalítico, fueron analizadas diferentes condiciones experimentales, determinando la influencia de cada una de estas con base a la construcción de un diseño experimental. En este se evaluaron 7 factores (variables), considerando dos niveles (nivel alto + y nivel bajo -) para cada factor; lo cual corresponde a realizar 2^7 (2^K) experimentos (Montgomery. D, 2004).

Sin embargo, puede considerarse que para fines experimentales el valor de K es grande, lo que aumenta el número de corridas necesarias para realizar una réplica completa del diseño ($2^7= 128$ experimentos); rebasando con rapidez la disponibilidad de los recursos. Por ello se dio lugar a la realización de un diseño factorial fraccionado, expresado como 2^{7-4} . Este diseño elaborado a partir de cuatro generadores, finalmente se proyectó en una sola replica de un diseño 2^3 en un subconjunto de tres factores. Este tipo de diseños son útiles en investigaciones que se encuentran en su etapa inicial, cuando es posible que muchos de los factores considerados en un principio tengan un efecto reducido o nulo sobre la respuesta. Con ello es posible obtener información de los efectos principales y las interacciones

de orden inferior, corriendo únicamente una fracción del experimento factorial completo. De esta manera se obtuvo para este diseño experimental, un total de 8 tratamientos complejos con 7 variables más 5 tratamientos simples control.

En la tabla 5 se pueden apreciar las variables que fueron utilizadas dentro de este diseño factorial fraccionado, así como los valores altos y bajos empleados en los diferentes tratamientos.

Tabla 5. Variables del diseño factorial fraccionado 2^{7-4}

| | pH | Aire | Ozono | Tiempo | [Oxálico] | [Fe] | [Inóculo] |
|----|-----|------------|------------|--------|-----------|--------|---------------|
| -1 | 5.5 | 0 L/min | 0 L/ min | 30 min | 120 ppm | 40 ppm | 10^5 UFC/mL |
| +1 | 7.5 | 2.35 L/min | 0.74 L/min | 60 min | 240 ppm | 80 ppm | 10^7 UFC/mL |

Según lo reportado en diferentes investigaciones, entre las variables que influyen en mayor grado los procesos fotocatalíticos, se encuentra el oxígeno, puesto que este actúa como aceptor de electrones generándose el radical superóxido, como promotor de más radicales hidroxilos. A estos radicales se atribuye el efecto bactericida dentro del proceso fotocatalítico, por lo que resulta ser el oxígeno, un componente esencial para que sean efectuadas reacciones de oxidación efectivas. En este trabajo se incluyó el ozono (O_3) como especie oxidante en la producción de radicales OH^- .

Por otra parte, el aire como variable importante del proceso, se resalta al dar lugar a una continua suspensión del catalizador en la disolución permitiendo una degradación más homogénea; sustentado en lo anterior esta variable también fue evaluada. Además de corroborar esta información, se buscó determinar la influencia del pH, el tiempo y la concentración del contaminante (*Escherichia coli*), ya que estas condiciones se ha expresado, están muy relacionadas con la cinética de degradación fotocatalítica (Garcés *et al.*, 2012). Para finalizar, se buscó estudiar el efecto del hierro en forma de sulfato ferroso y del ácido oxálico en solución dentro del proceso, respecto a si estos favorecen la actividad del catalizador y/o

contribuyen en la inactivación del microorganismo presente en el agua. Para ello se adicionaron volúmenes determinados de una solución stock de cada compuesto en cada tratamiento, ajustando así la concentración final deseada (tabla 5).

El diseño experimental con los 8 tratamientos, se puede apreciar en la Tabla 6.

Tabla 6. Diseño factorial fraccionado 2^{7-4}

| EXPERIMENTO | pH | Aire | Ozono | Tiempo (min) | Oxálico (mg/L) | Fe (mg/L) | Inoculo |
|-------------|----|------|-------|--------------|----------------|-----------|---------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

La variable de respuesta para los tratamientos realizados, atendió a la disminución de la cuenta del microorganismo *Escherichia coli* (UFC/mL) presente.

En la Tabla 7 se presentan las condiciones de los cinco tratamientos control que se anexaron en este diseño experimental. Con estos tratamientos se buscó verificar el efecto de componentes como el TiO_2 asistido por luz UV y luz visible, en la reducción de *Escherichia coli* en agua de piscina, así como del sulfato ferroso y el ácido oxálico en presencia y ausencia de luz visible; como punto de referencia y contraste para el análisis del proceso estudiado.

Tabla 7. Condiciones de los tratamientos control incorporados al diseño factorial fraccionado 2^{7-4}

| CONTROL | CONDICIONES |
|---------|---|
| 1 | Luz UV (0.1 mW/cm ²), sin TiO_2 , por 30 minutos. |
| 2 | Luz visible, con TiO_2 , por 30 minutos |
| 3 | Luz UV (0.1 mW/cm ²), con TiO_2 , por 30 minutos. |
| 4 | Oxálico, Fe, sin TiO_2 , sin luz, por 30 minutos. |
| 5 | Oxálico, Fe, sin TiO_2 , luz visible, por 30 minutos. |

4.6.4. Puesta en marcha del tratamiento fotocatalítico nano-TiO₂/energía visible.

Para cada tratamiento a evaluar en esta fase, se utilizó un volumen de 800ml de agua de piscina previamente autoclavada (121°C/ 1.5 atm/15 minutos), a la que se adicionó una concentración conocida del microorganismo a evaluar (*Escherichia coli*) (Tabla 6), tal como y como se describe en el apartado 3.5. “Cultivo y determinación del inóculo de la cepa modelo”. Así mismo, se procedió al ajuste del pH conforme a los valores máximos y mínimos establecidos por el diseño experimental construido.

Durante cada tratamiento se hizo uso de ocho placas recubiertas con películas delgadas de TiO₂ en un vaso de precipitado con capacidad de 1 litro. La muestra de agua en contacto con los soportes se dejó en reposo por un lapso de 30 minutos en la oscuridad para permitir que el sistema llegara a un equilibrio de adsorción (Palomares, 2013). Una vez transcurrido este tiempo y controladas variables adicionales como el suministro de ozono y la aireación, así como la presencia de la fuente de energía lumínica, se dio inicio al tratamiento correspondiente en el reactor fotocatalítico

Tabla 8. Concentración de los inóculos evaluados.

| | Nivel alto | Nivel bajo | |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> CDBB-B-1010 | Ensayo A: | 64X10 ⁷ UFC/ml | 64x10 ⁵ UFC/ml |
| | Ensayo B: | 23X10 ⁷ UFC/ml | 23x10 ⁵ UFC/ml |
| | Ensayo C: | 38X10 ⁷ UFC/ml | 38x10 ⁵ UFC/ml |
| | Controles: | 64X10 ⁵ UFC/ml | |
| | | 23X10 ⁵ UFC/ml | |
| | 38X10 ⁵ UFC/ml | | |

Finalizado cada tratamiento se realizó un análisis microbiológico por medio de la técnica recuento en placa, evaluando de este modo la disminución del microorganismo en la muestras tratada, y con ello directamente la eficiencia del tratamiento fotocatalítico desarrollado.

❖ FASE V

4.7. Análisis estadístico

Para determinar el efecto y eficiencia de cada una de las variables integradas al proceso en la reducción de *Escherichia coli*, se llevó a cabo un análisis de varianza, efectos principales y regresión lineal, utilizando el Software Design-Expert® versión 8.0.2. El análisis de varianza y efectos principales se realizó para llevar a cabo la comparación de los datos y estimación de los componentes de variación, así como para determinar qué factores incorporados al proceso presentan un efecto significativo en la reducción de *Escherichia coli*. El análisis de regresión lineal se abordó para conocer la dependencia del fenómeno estudiado, respecto a los diferentes factores involucrados en la respuesta.

La comparación de tratamientos y sus variables se realizó a partir de un análisis de comparación de medias entre los tratamientos fotocatalíticos y el grupo de tratamientos control, para obtener estadísticos descriptivos de los diferentes grupos, empleando el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.1. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 9. Cronograma de actividades

| Actividades / Semana | | Agosto | | | | Septiembre | | | | Octubre | | | | Noviembre | | | | Diciembre | |
|----------------------|---|--------|---|---|---|------------|---|---|---|---------|---|---|---|-----------|---|---|---|-----------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 |
| 1 | Presentación e inducción | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Planteamiento de los objetivos | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Revisión bibliográfica | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Diseño metodológico y cronograma | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Diseño experimental | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Toma de muestras | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | Análisis fisicoquímico y microbiológico | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | Elaboración de los soportes de Nano-TiO2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Cultivo y obtencion de soluciones stock (<i>Escherichia coli</i>) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | Aplicación tratamientos Nano-TiO2/Energia visible. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | Análisis estadístico | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | Escritura del trabajo de grado | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | Entrega del trabajo escrito | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | sustentación del trabajo de grado | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

6. RESULTADOS

6.1. Muestreo

Las muestras de agua estudiadas en este trabajo fueron tomadas en una piscina de uso privado, ubicada el municipio Atlatlahucan, Estado de Morelos. En la Tabla 10, se presentan los aspectos generales de la piscina muestreada, así como las características fisicoquímicas y microbiológicas de sus aguas.

Tabla 10. Características de la piscina muestreada.

| CARACTERÍSTICAS DE LA PISCINA | |
|--|-----------|
| Tipo de instalación | Privado |
| Método de tratamiento aplicado | Cloración |
| Dimensiones (Ancho /Largo) | 3m/7m |
| CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS | |
| Temperatura (°C) | 23.2 |
| pH | 7.8 |
| ORP- REDOX (mV) | 637.7 |
| Cloro (ppm) | > 5 |
| CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS | |
| Aerobios mesófilos (UFC/ml) | TNTC |
| Coliformes totales (UFC/ml) | 1 |
| Coliformes fecales (UFC/ml) | 0 |

°C (Grados Celsius), m (metros), mV (milivoltios), ppm (Partes por millón), UFC (Unidades Formadoras de Colonia), TNTC (Too Numerous To Count).

6.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las muestras de agua de piscina.

Para la caracterización fisicoquímica del agua de piscina muestreada, se efectuó la medición de cuatro factores en total que corresponden a la temperatura, el pH, el potencial de óxido reducción (ORP), y la concentración de cloro residual; también

se realizó un análisis microbiológico, para determinar la presencia de microorganismos aerobios mesófilos, bacterias coliformes totales, y coliformes fecales (*Escherichia coli*) en el agua.

En función de los parámetros tenidos en cuenta para la caracterización fisicoquímica del agua de piscina, fue determinado un valor de pH que se ubica ligeramente por encima de los valores ideales (7.2-7.6); partiendo del método de tratamiento del agua aplicado en esta piscina, referente a una desinfección química mediante cloración. Ya que el pH es un factor que presenta gran influencia en la actividad efectiva de compuestos como el cloro. Referente a ello, se encontró que el agua de piscina posee un nivel de concentración de cloro elevado, que supera los valores habituales sugeridos (Anexo 1) (Simard *et al.*, 2013). Sin embargo, pese a este resultado en contraste se halló un valor relativamente bajo en el potencial de óxido reducción (ORP), teniendo en cuenta que se recomienda mantener valores de ORP superiores a 650 o 700 mV, lo que permita establecer una relación más acertada entre la eficiencia del método de desinfección por cloración y la calidad microbiológica real del agua (Yu *et al.*, 2009).

Por su parte, como resultado del análisis microbiológico realizado por el método de filtración por membrana, se identificó un crecimiento abundante de microorganismos aerobios mesófilos que supera los límites de conteo, por lo que este resultado fue reportado como TNTC (Too Numerous To Count) (Davis, 2014). También se logró determinar la presencia de coliformes totales (1 UFC/ 100mL); sin embargo no se observó crecimiento bacterias coliformes fecales (*Escherichia coli*) a partir de las muestras de agua analizadas (Anexo 2).

6.3. Selección de las condiciones de tratamiento en el sistema fotocatalítico nano- TiO₂/ energía visible.

Con el fin de verificar la actividad fotocatalítica y su eficacia en la reducción de *Escherichia coli* tomado como microorganismo modelo, se evaluaron siete diferentes variables considerando dos niveles para cada factor, mediante un diseño experimental fraccionado 2^{7-4} en el que la variable de respuesta atendió a la reducción de la cuenta microbiana.

En cada uno de los tratamientos se determinó la disminución del microorganismo (*Escherichia coli*) en la muestra tratada, a partir del conteo en placa. Al respecto como parte de los resultados se observó, que en función de las concentraciones iniciales del microorganismo evaluadas, hubo una inactivación considerable de la bacteria en los 8 ensayos realizados. Resultando mayor la inactivación de

Escherichia coli en aquellos tratamientos en los cuales fue evaluado el nivel bajo de concentración del inóculo (10^5 UFC/ml), para los que se tuvo como resultado la ausencia total de crecimiento en cuatro de los tratamientos realizados a este nivel de concentración de la bacteria, lo cual fue reportado como <10 UFC/mL de *E. coli* (anexo 3). Por su parte, en aquellos tratamientos efectuados a partir del nivel alto de concentración del inóculo bacteriano (10^7 UFC/ml), aunque hubo una tasa importante de disminución respecto a la población inicial, no se observó una reducción total del microorganismo (tabla 11). De ello es posible precisar una relación evidentemente directa entre la concentración del inóculo microbiano y su influencia en la eficiencia lograda en el proceso de inactivación.

Tabla 11. Resultados tratamientos fotocatalíticos.

| Diseño experimental 2^{7-4} (Tratamiento fotocatalítico nano TiO_2 / energía visible) | | | | | | | | | | |
|---|----|-----------|-------|--------|---------|----|---------|----------------------------|--------|---------------------|
| TRATAMIENTO | pH | Aireación | Ozono | Tiempo | Oxálico | Fe | Inóculo | Variable de respuesta (Ln) | | |
| | | | | | | | | Ln | Media | Desviación Estándar |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | 0 | | |
| | | | | | | | | 0 | | |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9.03 | 8.4667 | 0.3989 |
| | | | | | | | | 8.16 | | |
| | | | | | | | | 8.21 | | |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 6.9 | 7.4133 | 0.4671 |
| | | | | | | | | 7.31 | | |
| | | | | | | | | 8.03 | | |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 5.34 | 4.5033 | 0.6778 |
| | | | | | | | | 4.49 | | |
| | | | | | | | | 3.68 | | |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | 0 | | |
| | | | | | | | | 0 | | |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | 0 | | |
| | | | | | | | | 0 | | |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | 0 | | |
| | | | | | | | | 0 | | |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 8.69 | 8.6867 | 0.5022 |
| | | | | | | | | 8.07 | | |
| | | | | | | | | 9.3 | | |

Aunque en todos los tratamientos se obtuvo una reducción notable de *Escherichia coli*, como parte del comportamiento observado dentro del proceso se identificó un mejor resultado en aquellos ensayos realizados a un nivel bajo de pH (5.5), especialmente en ausencia de ozono. En contraste, se halló que en presencia de ozono, el proceso de inactivación de *Escherichia coli* también arroja buenos resultados a valores de pH más altos (7.5). Por su parte el factor tiempo, no mostró una mejora considerable en el grado de inactivación de la bacteria. Otros factores como la aireación, la concentración de oxálico, y Fe, también fueron estudiados. Sin embargo, para un análisis con más detalle, se presenta más adelante el análisis estadístico referente a cada una de las variables integradas al proceso, y su efecto en reducción de la cuenta microbiana.

Como parte importante en la realización de este trabajo se llevó a cabo la incorporación de un grupo de tratamientos control para un mejor análisis de proceso estudiado. Dicho grupo estuvo integrado por cinco ensayos de control en total (tabla 12). A partir de los tratamientos control, se identificó preliminarmente un grado de inactivación equivalente de *Escherichia coli* en los controles 1 y 3. Atendiendo el primer control al uso de irradiación ultravioleta de forma individual, mientras que el control 3 contempló la práctica de la fotocatalisis heterogénea con TiO₂ empleando esta misma fuente de irradiación (Luz UV); en estos dos se determinó una concentración final del microorganismo <10 UFC/mL después del tratamiento.

En el control 4 referente a uso de oxálico y Fe en ausencia de luz, el comportamiento observado atendió a una disminución moderada de la cuenta microbiana. Mientras que en el control 2 en el cual se utilizó TiO₂ asistido por luz visible como fuente de irradiación, en ausencia de Fe y oxálico, no se apreció un efecto considerable en la reducción. Teniendo en cuenta que para la realización de los ensayos del grupo de control, se emplearon títulos de concentración bacteriana de 10⁵ UFC/mL. Finalmente se observó que en el control 5 referente al uso de oxálico, Fe, luz visible, y ausencia de TiO₂, hubo una disminución considerable del microorganismo estudiado (*Escherichia coli*) (ver anexo 4). Estos resultados son descritos más adelante de manera integrada mediante el análisis estadístico de comparación de medias entre los tratamientos fotocatalíticos y los tratamientos control.

Tabla 12. . Resultados tratamientos control.

| CONTROL | Variable de respuesta (Ln) | | |
|---------|-----------------------------|---------|---------------------|
| | Ln | Media | Desviación Estándar |
| 1 | 0 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 13.78 9.74 13.27 | 12.2633 | 1.7964 |
| 3 | 0 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 9.3 9.47 11.51 | 10.0933 | 1.0041 |
| 5 | 5.39 6.88 6.34 | 6.2033 | 0.6159 |

6.4. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico los resultados de la cuenta microbiana referentes a *Escherichia coli* obtenidos, se normalizaron a partir de la determinación del logaritmo natural (Ln) de los mismos (anexos 5 y 6).

6.4.1. Análisis del Tratamiento fotocatalítico nano TiO₂/ energía visible.

6.4.1.1. Análisis de varianza y efectos principales

Como producto del análisis de varianza para la reducción de *Escherichia coli* en agua de piscina tratada por fotocatalisis nano TiO₂/ energía visible, puede determinarse la significancia del modelo (< 0.0001) a un nivel de confianza del 95 %. En este modelo los datos experimentales se ajustan con un coeficiente de determinación R²= 99.08, siendo esta la proporción de la varianza explicada por las variables independientes estudiadas, con un coeficiente de variación CV%= 12.43 (anexo 7). A su vez el análisis de efectos principales presenta el efecto lineal

estadísticamente significativo de los siete factores incorporados al proceso fotocatalítico ($P < 0.05$) (tabla 13).

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) en la reducción de *Escherichia coli* en agua de piscina tratada por fotocatalisis nano TiO_2 / energía visible.

| Source | SS | Df | MSS | F | Prob > F |
|--------------|--------|----|--------|--------|----------|
| Model | 350.24 | 7 | 50.03 | 245.10 | < 0.0001 |
| A-pH | 76.08 | 1 | 76.08 | 372.67 | < 0.0001 |
| B. Aireación | 55.24 | 1 | 55.24 | 270.58 | < 0.0001 |
| C. Ozono | 51.30 | 1 | 51.30 | 251.32 | < 0.0001 |
| D. Tiempo | 2.71 | 1 | 2.71 | 13.29 | 0.0022 |
| E. Oxálico | 3.67 | 1 | 3.67 | 18.00 | 0.0006 |
| F. Fe | 10.28 | 1 | 10.28 | 50.37 | < 0.0001 |
| G. Inóculo | 150.95 | 1 | 150.95 | 739.44 | < 0.0001 |
| Pure error | 3.27 | 16 | 0.20 | | |
| Cor total | 353.51 | 23 | | | |

SS (Suma de cuadrados), **Df** (Grados de libertad), **MSS** (Suma de cuadrados media).

De acuerdo al análisis de efectos principales para cada una de las variables contempladas en el diseño de experimentos en la reducción de *Escherichia coli*; los factores G (concentración del inóculo), A (pH), y B (aireación), son los que influyen en mayor grado en la inactivación del microorganismo a un nivel de confianza del 95% (figuras 10,11, 12). Puede observarse que para estas tres variables, la respuesta en la reducción de *Escherichia coli* es mejor a partir del nivel bajo considerado para cada factor (pH 5.5, aire 0 L/min, 10^5 UFC/ml).

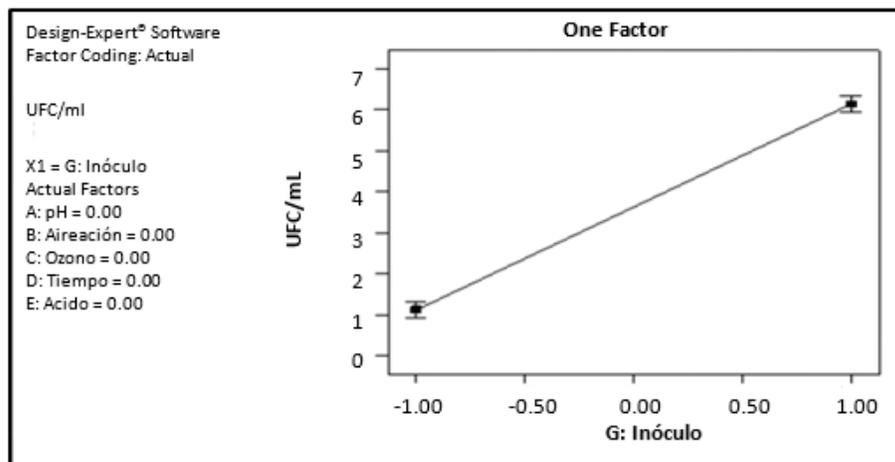


Figura 10. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Inóculo)

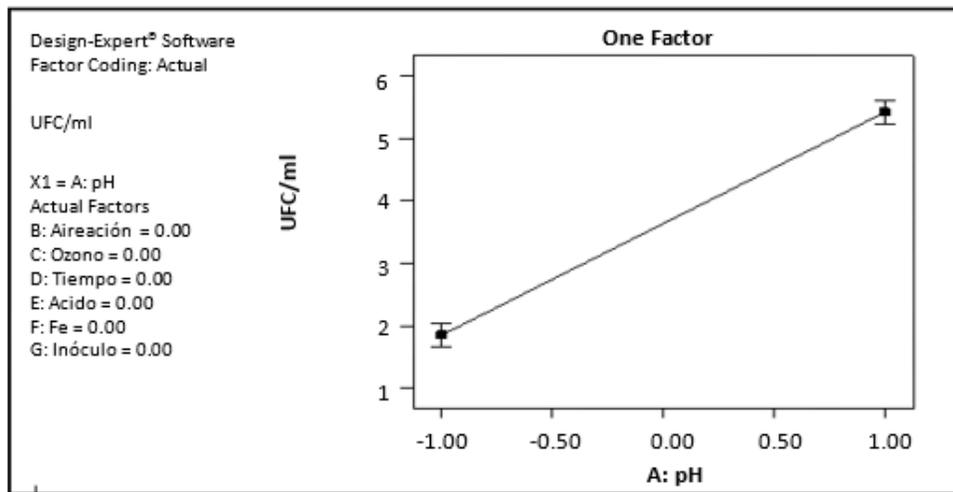


Figura 11. Gráfico de efectos principales para el factor significativo (pH)

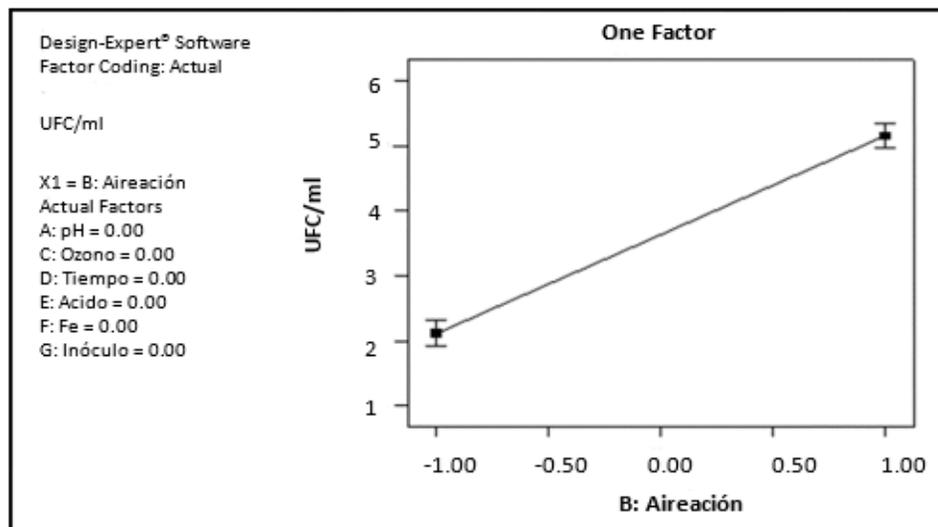


Figura 12. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Aireación)

En la figura 13 puede observarse que el ozono también presenta un efecto importante en la reducción microbiana, los resultados sugieren que la presencia de ozono afecta positivamente la reducción de *Escherichia coli*.

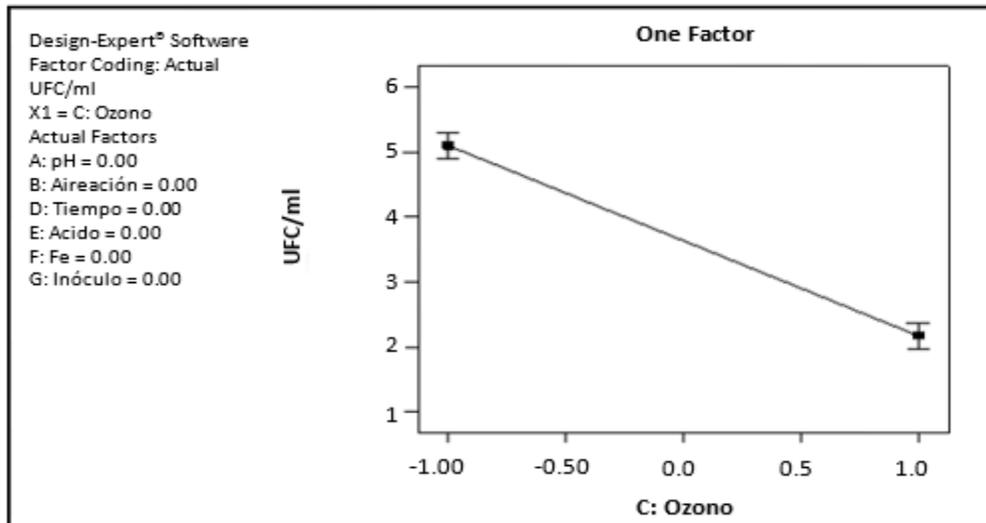


Figura 13. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Ozono)

Los Factores E (oxálico) y F (Fe), aunque con un efecto menos pronunciado, resultan significativos en la disminución de la cuenta bacteriana (figuras 14 y 15). Respecto a estos dos factores los resultados indican que a una concentración baja de oxálico y Fe, la respuesta es mejorada. Finalmente se observa que el factor D (tiempo), pese a que afecta positivamente la reducción de *Escherichia coli*, es la variable que presenta menor influencia en la respuesta (figura 16).

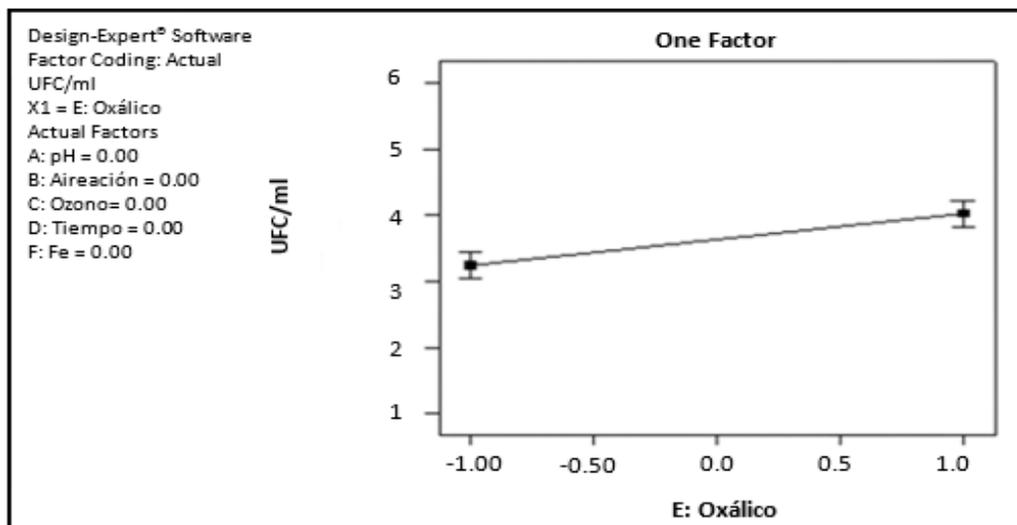


Figura 14. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Oxálico)

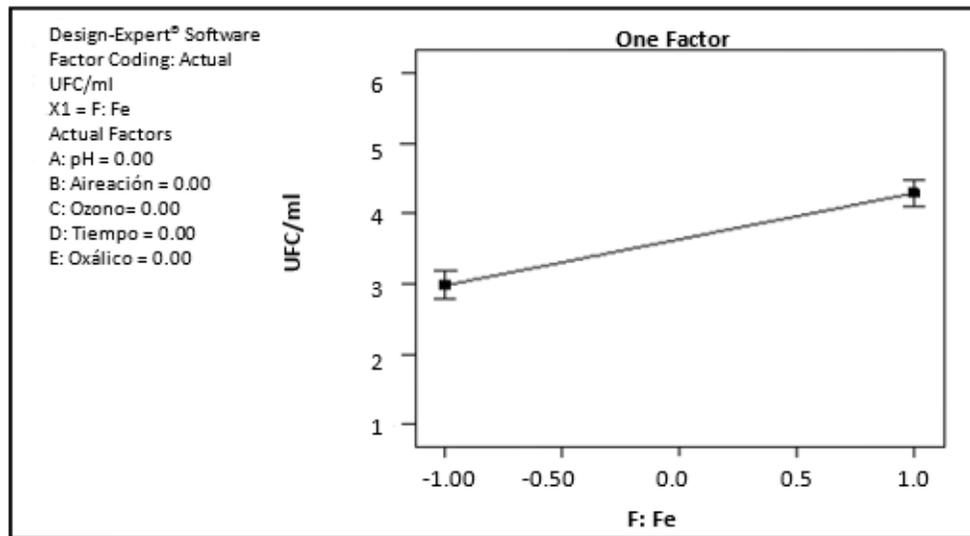


Figura 15. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Fe)

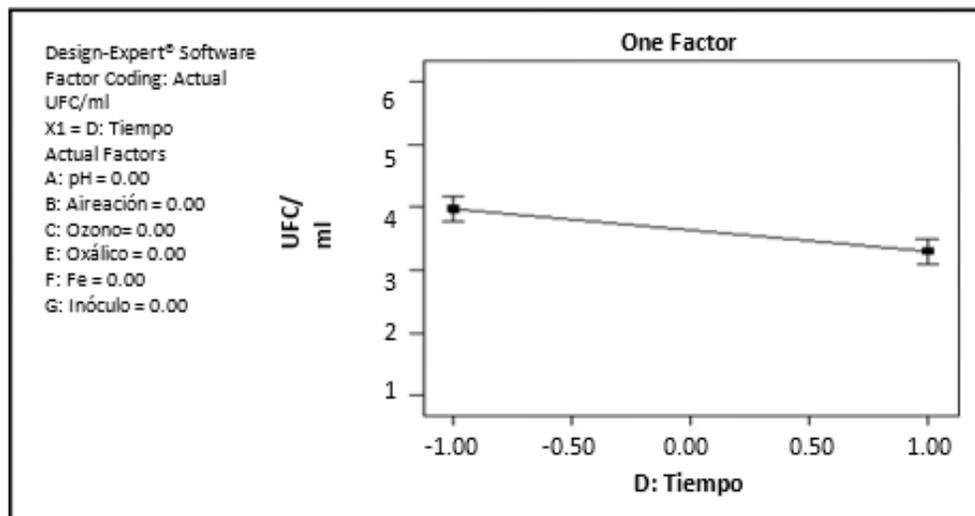


Figura 16. Gráfica de efectos principales para el factor significativo (Tiempo).

6.4.1.2. Análisis de regresión

A fin de estimar la posible relación lineal existente entre la variable dependiente (de respuesta) y las variables independientes (factores de control) integradas al proceso, se procede al uso de los modelos de regresión; lo que permite conocer la dependencia del fenómeno estudiado, respecto a los diferentes factores

involucrados en la respuesta (Montgomery, 2004). Esto permite a su vez establecer un modelo de comportamiento que se adecue al comportamiento real del sistema. Los resultados obtenidos en función del análisis de regresión arrojan un R^2 de 0.9908 que indica que una buena proporción de ajuste se ha logrado con el modelo lineal; y un C.V% = 12.43, con lo que el diseño experimental puede justificarse en un 87.57%, en base a la contribución de cada uno de los factores involucrados en la respuesta de la variable dependiente (tabla 14). Adicionalmente el análisis de regresión aporta un valor de 33.30 para la predicción adecuada, de la respuesta de la variable dependiente (explicada), en función de las variables independientes (explicativas). La predicción adecuada mide la relación señal-ruido. El valor necesario para una predicción adecuada ha de ser superior a 4; lo que sugiere que el diseño puede ser utilizado. Este valor se obtiene a partir de la relación entre la respuesta máxima y mínima predicha, y el producto de su multiplicación por la desviación estándar promedio de cada respuesta predicha (Montgomery, 2004).

Tabla 14. Análisis de regresión para la reducción de *Escherichia coli* por fotocátalisis nano TiO_2 /energía visible.

| | |
|---|--------|
| Coefficiente de determinación (R^2) | 0.9908 |
| Coefficiente de determinación ajustado | 0.9867 |
| Coefficiente de variación (C.V %) | 12.43 |
| Media | 3.63 |
| Desviación estándar | 0.45 |
| Predicción adecuada | 33.300 |

Con la regresión lineal es posible modelar la relación entre las variables independientes (predictoras) y la variable dependiente (predicha), determinando una expresión matemática que permita predecir la variable dependiente a partir de las variables independientes. La relación entre dos o más variables a partir de ecuaciones se denomina regresión lineal múltiple. Este modelo puede expresarse como: $Y_t = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p + \varepsilon$, donde: Y_t corresponde a la variable dependiente, $X_1, X_2 \dots X_p$ a las variables independientes, $\beta_1, \beta_2 \dots \beta_p$ a los parámetros que miden la influencia que las variables independientes tienen sobre el regresando, β_0 a la intersección o término constante, y P al número de parámetros independientes a tener en cuenta en la regresión (Pértega y Pita, 2000).

La ecuación 1 representa el modelo matemático de regresión múltiple obtenido con base a la repercusión de cada una de las variables en la disminución de *Escherichia coli*, que proviene del ordenamiento secuencial de la ecuación final en términos de factores codificados y reales (anexo 7).

Ecuación 1. Modelo matemático del análisis de regresión múltiple para el tratamiento fotocatalítico nano/TiO₂ en la disminución de *Escherichia coli* CDBB-B-1011.

$$\text{UFC (E. coli)} = +3.63375 + 1.78042 * \text{pH} + 1.51708 * \text{Aireación} - 1.46208 * \text{Ozono} - 0.33625 * \text{Tiempo} + 0.39125 * \text{Oxálico} + 0.65458 * \text{Fe} + 2.50792 * \text{Inóculo}$$

En la figura 17 se presenta el gráfico de Pareto, en el se expone de acuerdo al valor del efecto significativo arrojado para uno de los siete factores, el orden de prioridad de cada uno de estos y su influencia en la respuesta de la variable dependiente, en la reducción de *Escherichia coli*.

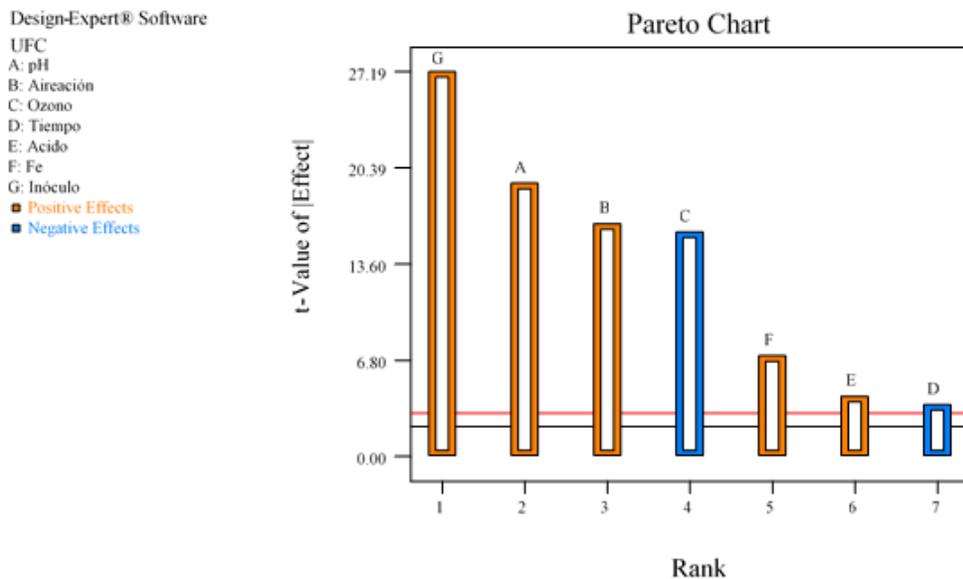


Figura 17. Gráfico de Pareto para el tratamiento fotocatalítico nano- TiO₂ / energía visible frente a la disminución de *Escherichia coli* CDBB-B-1011.

6.4.1.3. Diagnóstico y validación del modelo matemático

En la figura 18 puede observarse en el gráfico de probabilidad normal, que los datos presentan una distribución normal, con lo que se asume como verdadero el principio de normalidad. Además, puede verse la integración de cada una de las siete variables en el proceso estudiado.

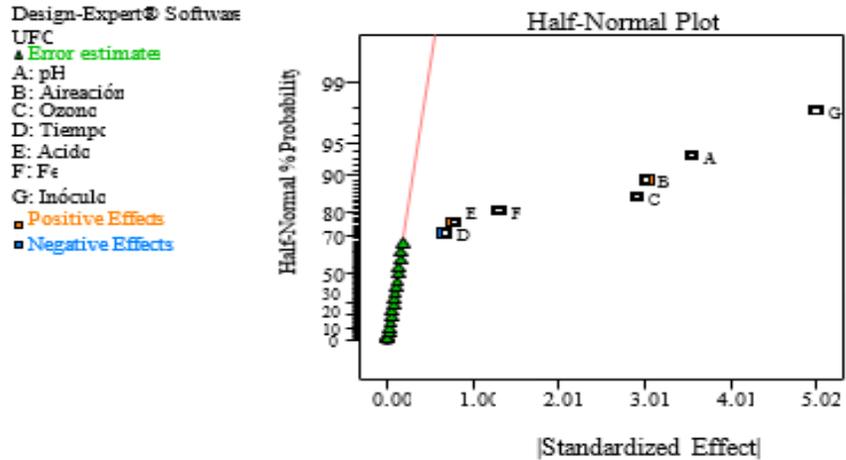


Figura 18. Gráfico de probabilidad normal para el tratamiento fotocatalítico nano TiO_2 / energía visible frente a la disminución de *Escherichia coli* CDBB-B-1011.

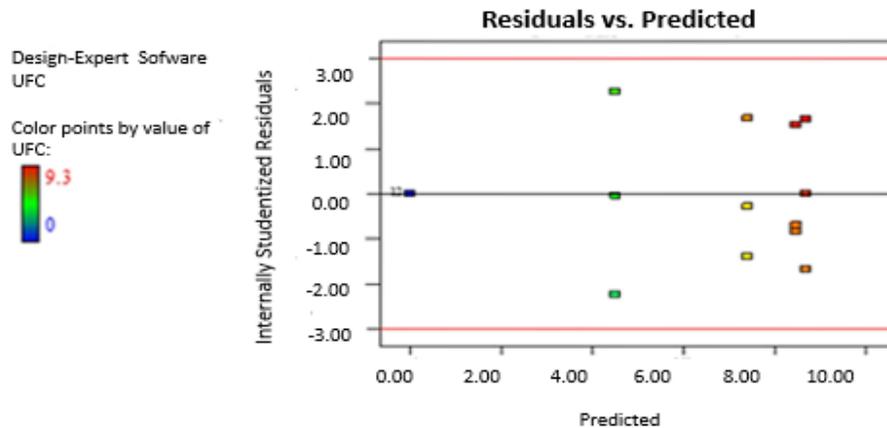


Figura 19. Análisis de valores residuales vs. Valores predichos. Tratamiento fotocatalítico nano TiO_2 / energía visible en la disminución de *Escherichia coli* CDBB-B-1011.

En la figura 19 se expone el gráfico de diagnóstico de valores residuales vs. los valores predichos, en el que se observa una distribución homogénea, en la que no se observa ninguna tendencia. Asumiendo como verdadero el principio de homogeneidad del modelo.

6.4.2. Análisis de comparación de medias entre el tratamiento fotocatalítico nano TiO₂/energía visible y el grupo de tratamientos control.

De acuerdo al análisis de comparación de medias entre el tratamiento fotocatalítico nano TiO₂/ energía visible y los tratamientos control, se obtuvo un efecto comparable sin diferencias significativas en la disminución de la cuenta de *Escherichia coli*, entre los ensayos del grupo de control con solo luz UV, luz UV/TiO₂, y los tratamientos fotocatalíticos en los que se usa ozono a una baja concentración del inculo bacteriano (tratamientos 5, 6 y 7). En contraste se encontró que hay una diferencia significativa ($p= 0.05$) entre los tratamientos en los que se maneja un nivel alto del inculo, con relación a los tratamientos en los que se emplea un nivel bajo del mismo, siendo más notoria la reducción en este último caso; aun en presencia de ozono.

Se observó adicionalmente que no hay diferencia significativa entre el tratamiento fotocatalítico 3 y el control 5; control en el que a diferencia del tratamiento 3, no se emplean los soportes de TiO₂. En este sentido se evidencia que con solo oxálico, Fe, y luz visible, en ausencia de dióxido de titanio, se presenta una reducción considerable de la cuenta microbiana. Por otra parte se encontró una diferencia significativa en el control 4 respecto a los demás ensayos de control, en el que aunque con una tasa menor, existe una disminución de la cuenta bacteriana en presencia de Oxálico, Fe, y ausencia de luz. También se determinó que existe una diferencia significativa en los ensayos 2 y 3 del grupo de control, en los cuales fue evaluado el uso de TiO₂ con luz visible y TiO₂ con luz UV respectivamente; se percibe que con TiO₂ y luz visible no se da una disminución del microorganismo (anexo 8).

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las muestras de agua de piscina.

La calidad del agua es una medida crítica de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los sistemas acuáticos. Estas reflejan la interacción que tiene el agua con el entorno en que se encuentra, contemplando tanto la intervención de los factores naturales, como aquellos mediados por la acción del hombre; lo que permite tener una noción de los posibles efectos que pueden generarse. Desde el punto de vista de la salud pública, el control de la calidad de aguas de recreación como la de piscinas, es de gran importancia. Entre los parámetros principales considerados para el análisis del nivel de aptitud de estas aguas, sin duda los más relevantes son aquellos relacionados con la condición físico-química y microbiológica del líquido (Martínez y Alvarado, 2013); ya que estas características condicionan una serie de riesgos químicos y biológicos considerables para la salud, especialmente en la transmisión de enfermedades infecciosas al hombre. De acuerdo a esto, en este trabajo se llevó a cabo el análisis fisicoquímico y microbiológico de las muestras de agua de piscina; este último basado en la determinación de microorganismos aerobios mesófilos, bacterias coliformes totales y fecales, como indicadores del riesgo biológico en estas aguas.

Aunque cada tipo de agua presenta de manera natural un contenido particular de microorganismos que no resultan necesariamente dañinos; cuando se desea conocer el nivel de aptitud del agua son considerados una serie de análisis enfocados en la determinación de la presencia de microorganismos patógenos (Robles *et al.*, 2013). Determinar el tipo de microorganismos presentes y su concentración en el agua, proporciona herramientas para conocer su calidad, al igual que para la toma de decisiones en relación al control de su tratamiento. Sin embargo, el diagnóstico de microorganismos patógenos de manera específica podría representar la necesidad de análisis especiales y costosos; es por esto que se procede como alternativa a estos inconvenientes, al uso de indicadores microbianos cuya identificación atiende a métodos más sencillos, rápidos y económicos (Murrel *et al.*, 2013). Estos indicadores aportan una idea de la presencia de patógenos en el agua, ya que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, o ante los sistemas de desinfección, resulta similar (WHO, 2006). El grupo de microorganismos coliformes totales y fecales (géneros *Klebsiella spp*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, y *Escherichia coli*, entre otros) han sido considerados como buenos indicadores de contaminación bacteriana en el agua, al ser habitantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente, por estar presentes en el tracto gastrointestinal

en grandes cantidades, así como por permanecer por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas, y comportarse de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección. Otros microorganismos considerados como habitantes naturales del agua siendo el caso de los microorganismos aerobios mesófilos aunque en menor grado, también se contemplan en la evaluación de la calidad del agua, ya que también pueden proceder de la contaminación (Pfaller, 2014). No obstante hoy día para algunos países la determinación de coliformes totales y microorganismos aerobios mesófilos en aguas de piscinas, tiene poca utilidad en la verificación de la calidad microbiológica del agua. Considerando los microorganismos fecales como un mejor reflejo de la presencia de contaminación, aportando un mayor nivel de asociación al riesgo sanitario, en comparación con el resto de coliformes; ya que la determinación de contaminación de origen fecal en el agua ponen en manifiesto la exposición del agua a condiciones que pudieran determinar la llegada a la misma de microorganismos peligrosos, permitiendo la proliferación de especies patógenas (Ramírez *et al.*, 2004). Este es el caso de países como México, cuya normatividad para la regulación de la calidad microbiológica a nivel bacteriano en aguas de piscina, contempla el análisis exclusivo de coliformes fecales (*Escherichia coli*), con un límite de permisibilidad < 40 UFC/100mL de coliformes fecales. A partir de ello podría definirse que el agua de piscina analizada microbiológicamente en este trabajo, se ajusta de manera regular a este parámetro, debido a que no se observó el crecimiento de coliformes fecales a partir de las muestras de agua de piscina evaluadas; por lo que no se resaltaría un riesgo evidente para la transmisión de enfermedades con base en este indicador (NOM-245-SSA1-2010). Sin embargo, aunque la legislación de algunos países no lo contempla, ha de considerarse que la presencia de un número elevado de microorganismos aerobios mesófilos y de coliformes totales aunque a muy baja concentración, tal y como se determinó en las muestras de agua de piscina evaluadas, constituyen una alerta oportuna en torno al control y vigilancia del proceso de desinfección empleado para el tratamiento del agua; a fin de evitar el deterioro de la calidad sanitaria de la misma, con la posible aparición de microorganismos que representen un riesgo para la salud.

A nivel físico-químico factores como la temperatura, el pH, el potencial de óxido-reducción (ORP), y la concentración de cloro, son algunos de los criterios contemplados con mayor frecuencia, por su influencia en los procesos de tratamiento empleados para el mantenimiento adecuado de las piscinas; especialmente en la desinfección por medio de la cloración (Chowdhury *et al.*, 2014). La cloración como método de desinfección del agua, es innegablemente el más utilizado por su economía, fácil uso, y de manera importante por poseer un carácter residual. Sin embargo, el uso de este compuesto cuyo propósito principal atiende al mantenimiento de la calidad microbiológica del agua, está condicionado por una serie de factores para lograr una actividad biocida eficiente, como lo son la temperatura y el pH (WHO, 2006).

El poder desinfectante del cloro radica en su capacidad de oxidación. En presencia de agua el cloro reacciona dando lugar a la formación de ácido hipocloroso, considerada como la forma con mayor potencial de óxido reducción y con más actividad desinfectante; esta forma derivada del cloro predomina a valores de pH 5 aproximadamente. Sin embargo, a niveles de pH superiores a 7.5 se conoce que la forma predominante que deriva del cloro atiende a iones hipoclorito; especies químicas con menor efecto biocida (WHO, 2006). Conforme a lo anterior, puede entenderse la gran influencia del pH en la aplicación satisfactoria de la cloración como método de desinfección en el agua de piscinas. Con lo que es posible precisar que un aumento en el pH disminuye sustancialmente la actividad biocida del cloro. Es por esto que generalmente no resulta suficiente la determinación de la concentración de cloro en el agua, cuando se desea conocer que tan eficiente ha resultado el proceso de desinfección. Con base a ello, la determinación de parámetros adicionales como el potencial ORP (potencial de óxido-reducción), puede ser útil. Esto se debe a que el equilibrio entre las dos formas de cloro en agua antes mencionadas, cambia en función del pH, por lo que una determinada concentración de cloro en el agua no resulta en sí mismo un indicador total de su efecto. Al utilizar la determinación del ORP como control adicional del proceso, podrá establecerse una mejor relación entre la concentración del cloro presente y la actividad real de los procesos de óxido reducción. Teniendo en cuenta que tras esta determinación se está monitoreando la presencia del oxidante o reductor, y no el compuesto químico relacionado con este (Yu *et al.*, 2014).

A este fenómeno descrito podría atribuirse la presencia del contenido considerable de microorganismos aerobios mesófilos que se observó en el agua de piscina analizada en este trabajo, así como el haber logrado detectar aunque en bajo grado, la presencia de coliformes totales; pese a la concentración elevada de cloro que se identificó en la misma. Ya que el agua presentó un nivel de pH ligeramente alto y un ORP por debajo de lo recomendado para un buen proceso de desinfección, sumado a la temperatura reportada, la cual puede favorecer el aumento de la población bacteriana, tal y como se ha mencionado en algunos trabajos donde se sugiere que a temperaturas superiores a los 20°C, puede darse un crecimiento intensivo de los microorganismos especialmente, de aquellos de tipo heterótrofo (Diduch *et al.*, 2016). De ello deriva la importancia de la estabilización del pH para un mejor control en la actividad del cloro durante el proceso de desinfección, ya que un exceso de este compuesto en un rango de pH que no resulte apropiado, puede no ser una garantía en la eliminación total de los microorganismos. Este tipo de casos resaltan la necesidad de procesos mejorados para el tratamiento del agua. Teniendo en cuenta que aunque los rangos de concentración de cloro que se consideran ideales se encuentran entre 0.5 y 2 mg/L (Dallolio *et al.*, 2013; Bach *et al.*, 2015), actualmente se evidencia un uso indiscriminado de este compuesto, que más allá de asegurar la calidad sanitaria del agua de las piscinas, puede repercutir negativamente, al generar diferentes afecciones a la salud, que van desde la irritación dérmica y ocular, hasta efectos cancerígenos y mutagénicos producto de

la formación de subproductos de la desinfección como trihalometanos, ácidos haloacéticos, haloacetoneitrilos, halocetonas, tricloronitrometanos, y cloraminas, durante el proceso de desinfección mediante cloración del agua de piscinas (Doederer *et al.*, 2014).

7.2. Tratamiento fotocatalítico

A partir de los resultados que se obtienen en este trabajo en la evaluación de un sistema fotocatalítico nano TiO₂ / energía visible, para la reducción de *Escherichia coli* como microorganismo modelo; son considerados diferentes factores como responsables de la respuesta obtenida, en la que se resalta una disminución considerable de la cuenta bacteriana en los tratamientos realizados.

Como producto de los estudios abordados en torno a los sistemas fotocatalíticos que emplean materiales semiconductores como el TiO₂ para la degradación de contaminantes; actualmente se tiene conocimiento de ciertos factores o tendencias empíricas generales que condicionan la eficiencia de estos procesos. Entre estos factores se encuentran el tamaño del cristal del material, el área superficial del TiO₂, la presencia de oxígeno, el pH, concentración de compuestos orgánicos, el tiempo, y de manera clave, la energía de fuente de radiación (Hafizah y Sopyon, 2009). Todos estos se involucran tanto con la generación exitosa de los pares e⁻ / h⁺, como con la formación posterior de las especies reactivas de oxígeno que permiten finalmente la degradación de contaminantes en un mayor o menor lapso de tiempo. Un elemento como se ha mencionado que resulta trascendental, partiendo de que estos procesos se basan en reacciones foto-asistidas, atiende precisamente a la energía de fuente de radiación. La energía de banda prohibida del TiO₂ se encuentra dentro del espectro de luz ultravioleta basado en las propiedades ópticas y electrónicas que presentan las partículas de TiO₂ como material semiconductor; cuyo valor de banda prohibida se reporta en 3.2 eV (Ohno *et al.*, 2004). En este sentido se considera a esta energía como la mínima necesaria para que se dé la excitación y formación de pares e⁻ / h⁺ a partir de este material (Zhao *et al.*, 2008; Kaariainen *et al.*, 2009; Villanueva, 2011). La energía de un fotón en la región de la luz ultravioleta es mayor que la de un fotón en la región de la luz visible, lo cual se relaciona directamente con una disminución en el potencial de reacciones de óxido-reducción en materiales como el TiO₂, para los cuales puede ser limitada la posibilidad de impulsar reacciones de este tipo cuando no se alcanzan a cumplir los requisitos termodinámicos y cinéticos para ello (Ohtani, 2010). Ácidos orgánicos como el oxálico, se han empleado para modificar la superficie del TiO₂ y mejorar así su actividad. En investigaciones como la de Sownya y Meennakhi, en 2014 se reporta una foto- degradación efectiva de nitrato en agua, a partir del uso de TiO₂, en presencia de bajas concentraciones de oxálico. En este se obtuvo que en presencia de ácido oxálico se da una mejora considerable en la selectividad frente

los compuestos a degradar en estas reacciones, no obstante se ve necesario para lograr este resultado, que las reacciones sean igualmente asistidas con luz ultravioleta. Esto podría relacionarse con el resultado obtenido en este trabajo, en el que para las condiciones de reacción evaluadas, no logró identificarse la contribución del TiO_2 en la reducción de *Escherichia coli* con el uso de luz visible como fuente de irradiación, aun en presencia de oxálico y hierro como aditivos dentro del proceso; donde las condiciones de operación pudieron no ser suficientes para la activación exitosa del TiO_2 (Ohtani, 2010). Con base a esto, la reducción de *Escherichia coli* en el presente trabajo, se atribuye a factores no relacionados con la actividad del TiO_2 como catalizador.

En función de la naturaleza de cada uno de los componentes integrados al proceso, de manera preliminar se presenta un efecto natural esperado, producto de la adición de oxálico y hierro como aditivos en las reacciones fotocatalíticas. Identificándose que estos dos compuestos pueden influir por si mismos bajo las condiciones evaluadas, generando una reducción del microorganismo en el agua de piscina. La presencia de un ácido orgánico en solución como el oxálico, puede contribuir en la reducción de *Escherichia coli* por dos vías. La primera mediante un declive del pH extracelular y la segunda, en la que la que el ácido atraviesa la membrana celular ocasionando una disminución del pH intracelular, lo cual genera efectos drásticos en la proliferación del microorganismo, con un aumento de la fuerza iónica y de la turgencia celular, producto de la disociación intracelular del ácido generando altas concentraciones de aniones, que a su vez inhiben diferentes procesos del metabolismo por desnaturalización de enzimas esenciales, y pérdida de la integridad de bases nitrogenadas como la purina. Esto incrementa la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que puede desencadenar en la lisis celular (Maris *et al.*, 2004). No obstante el efecto de cada ácido orgánico ha de determinarse empíricamente para cada microorganismo, pues son conocidos los mecanismos de homeostasis empleados por algunas bacterias para sobrellevar diferentes condiciones de estrés.

Por su parte la adición de sales inorgánicas como el sulfato ferroso, puede asociarse en la reducción de *Escherichia coli*, con efectos vinculados a la inducción del estrés osmótico, por difusión del hierro hacia el interior de la célula, y a su vez con un mayor flujo de sustancias tóxicas producto de estos cambios. Sin embargo, la capacidad de *Escherichia coli* para continuar siendo viable en presencia de diferentes ácidos orgánicos, y concentraciones elevadas de solutos, se atribuye a la activación de diferentes mecanismos que median un equilibrio de las condiciones intracelulares y extracelulares (Foster, 2004). Entre estos se encuentra la regulación de las propiedades físicas de la membrana con cambios en la permeabilidad a nivel del contenido de lípidos, lo que modifica el transporte iónico, así como por la activación de sistemas como los AR1, AR2, y AR3, asociados con la resistencia a los ácidos, cuya activación se da aproximadamente a valores de pH 5 (Maurer *et*

al., 2005). Estos sistemas en condiciones aeróbicas como anaeróbicas suelen involucrar la descarboxilación de aminoácidos para lograr una elevación en el pH, y así mantener la viabilidad celular. Otros mecanismos de respuesta atienden a la inducción de genes responsables de la reparación de daños como los OxyR y SoxR, que evitan el daño del ADN en condiciones de estrés por acidez (HT y Foster, 2003). También se ha observado en estudios como el realizado por Chu y Lu en 2004, que la presencia de fuentes de carbono asimilables como el ácido oxálico en el agua, son empleadas a favor por los microorganismos contribuyendo a elevar su metabolismo y con ello la tasa de reproducción. Con base a esto, puede considerarse que la reducción de *Escherichia coli* en este trabajo podría verse reforzada, por la actividad conjunta de reacciones adicionales que involucran la formación de complejos entre el oxálico y el sulfato ferroso, en presencia de la luz.

En investigaciones como la realizada por Spuhler y colaboradores en 2010, para la descontaminación de agua de bebida conteniendo *Escherichia coli* K12, se ha reportado que en presencia de ligandos orgánicos como ácidos carboxílicos (ácido oxálico, ácido malónico, ácido cítrico), el hierro puede formar complejos estables que exhiben bandas de transferencia de carga del ligando al metal en el espectro visible, que resultan foto- químicamente activos. En este proceso pueden generarse especies radicales intermedias como el CO_2^- (radical anión dióxido de carbono), el cual posee un elevado potencial redox (Jeong y Yoon, 2004). Así mismo, estudios relacionados han reportado que una descarboxilación rápida de estos radicales intermedios contribuyen en la producción simultánea de iones O_2^- y de H_2O_2 en sistemas acuosos. El peróxido de hidrogeno generado constituiría a su vez a partir de un conjunto de reacciones consecutivas mediadas por la presencia de hierro, una fuente para la generación de radicales hidroxilo (OH) (Jeong y Yoon, 2005). Esta formación de compuestos en conjunto, serían los encargados por esta vía de generar los daños a nivel de los constituyentes celulares producto del estrés oxidativo, mediante el ataque a proteínas, y a los componentes de la membrana (especialmente lípidos), aumentando la permeabilidad, y/o interrumpiendo los gradientes iónicos transmembrana; ocasionando finalmente la inactivación del microorganismo. También se ha reportado una vía indirecta por medio de la cual el hierro al introducirse en la célula puede reaccionar con el H_2O_2 que se obtiene como producto de la actividad metabólica de algunas bacterias, dando lugar a la formación de especies radicales OH adicionales a nivel intracelular, lo que contribuye en la generación de daños a nivel celular; este fenómeno también se ha observado en condiciones de oscuridad. Se considera que el hierro en su forma Fe^{2+} presenta mayor facilidad en su difusión a nivel de la célula, por su baja densidad de carga, por lo que se considera que esta forma del hierro es la que presenta un mayor efecto bactericida (Spuhler *et al.*, 2010).

La aplicación de este tipo de reacciones que abarcan la formación de compuestos fotosensibles entre algunos ligandos orgánicos y el hierro, que dan lugar a la

generación de especies con elevado potencial de óxido-reducción, ha mostrado buenos resultados para la foto-reducción de diversos compuestos inorgánicos como el cromo (Cr) y la foto- degradación de contaminantes orgánicos como colorantes, bacterias (*E.coli*) y herbicidas en el caso del 2,4-diclorofenoxiacético (Kwan y Chu, 2007; Ruales *et al.*, 2016). No obstante se contemplan algunas necesidades particulares como el ajuste y mantenimiento de pH de estas reacciones, para lo que ha propuesto el uso de sistemas de auto titulación para mantener estable el pH del sistema. Por otra parte, se ha mencionado que aunque las reacciones que involucran la presencia de hierro en procesos de foto-degradación se dan mejor en condiciones de acidez; en presencia de compuestos ligandos orgánicos se da la posibilidad de ampliar el rango de pH de trabajo a valores entre 1.2 y 8.5, ya que estos compuestos permiten al hierro mantener su solubilidad en estos intervalos y una buena absorbancia en la región del espectro visible, situación a favor para su aplicación en sistemas acuosos (Jeong y Yoon, 2005, Ruales *et al.*, 2016). Asimismo se ha identificado que factores como el suministro de oxígeno, no suelen afectar considerablemente estos procesos (Jeong y Yoon, 2004). Otras consideraciones como las proporciones y concentraciones óptimas entre el ligando orgánico y el hierro, aunque siempre se busca que sean en las cantidades más bajas, se observa que varían en función de las condiciones generales en que sean abordadas este tipo de reacciones y la naturaleza del enfoque de su aplicación, con base a la literatura revisada. Actualmente este tipo de reacciones mediadas por hierro y ligandos orgánicos, son motivo de interés al ser consideradas como una vía alterna para la foto- degradación de contaminantes, sin la necesidad de agregar compuestos catalizadores de elevado costo como el peróxido de hidrogeno, siendo el caso particular de las reacciones de oxidación de tipo Fenton. Ya que tal y como se ha descrito, el peróxido de hidrogeno podría obtenerse *in situ* a partir de la formación de complejos entre ligandos orgánicos y el hierro. No obstante entre algunas particularidades que son evaluadas derivadas de estas reacciones, está la necesidad de llevar a cabo la separación de los productos finales de la reacción, en situaciones que lo ameriten (Sownya y Meennakshi, 2014). Esta consideración resultaría pertinente en aplicaciones referentes a la descontaminación de aguas como la de piscina.

Entre los parámetros considerados en los procesos que median la reducción de poblaciones microbianas, se encuentran la condición fisiológica y concentración inicial de los microorganismos. De acuerdo a algunos estudios como el realizado por Rincón y Pulgarin en 2004, en los cuales se ha evaluado la influencia de estos factores en diferentes métodos de desinfección, especialmente a nivel fotocatalítico para la reducción de bacterias Gram negativas y Gram positivas; se ha determinado que de acuerdo a la condición fisiológica del microorganismo, habrá un menor o mayor grado de susceptibilidad ante los procesos de desinfección, y que a una baja concentración de estos el resultado en la reducción será mayor. Esto supone que a concentraciones altas del agente microbiano, se precisa de un tiempo mayor para lograr la disminución de la viabilidad celular; lo que atiende a una cinética de primer

orden. Lo cual responde al comportamiento observado en la reducción de *Escherichia coli* en el presente trabajo; en el que se destaca además que a bajas concentraciones del inóculo bacteriano resulta difícil percibir una variabilidad en la reducción de la cuenta microbiana bajo diferentes condiciones de tratamiento.

Por otra parte un mayor efecto en la reducción de *Escherichia coli* como el observado en este trabajo en presencia de ozono, puede ser comprendido con base en la capacidad conocida que presenta este compuesto para eliminar por sí mismo de manera eficiente, una amplia gama de contaminantes orgánicos persistentes y microorganismos (Audenaert *et al.*, 2010). El poder germicida del ozono está bien documentado. Se ha reportado conforme a las cinéticas de inactivación que a concentraciones de ozono superiores a los 0.4mg/L se presenta una rápida disminución de microorganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, esporas de *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, entre muchos otros, en aguas potables y residuales (Torres *et al.*, 2010). Se sugiere que a concentraciones de 1.5mg/ L puede inactivarse hasta 5 unidades logarítmicas de microorganismos como *Candida albicans*, en un tiempo menor a los 3 minutos. El efecto del ozono recae en los daños que ocasiona en moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que provoca la pérdida de la viabilidad celular. Este efecto biocida se asocia a la oxidación directa de los contaminantes en su forma molecular (O₃), o mediante la generación de ROS como radicales OH por descomposición del ozono en medio acuoso; dicha actividad se ha reportado a niveles de pH ácidos como básicos (Castagna y Ranieri, 2009; Palomares, 2013). En este sentido se ha sugerido que su uso a bajas concentraciones acoplado a tecnologías de oxidación avanzada para la desinfección del agua, puede resultar útil al promover una mayor degradación de las sustancias contaminantes, y mejorar la actividad de algunos catalizadores como el TiO₂ (Muruganandham y Wu, 2007). Sin embargo, aunque este compuesto es visto como uno de los oxidantes más potentes para la desinfección del agua, el no tener un carácter residual y requerir un suministro continuo, aumenta los costos para el tratamiento de aguas como las de piscina (WHO, 2006). Conforme a los resultados obtenidos y las condiciones de tratamiento evaluadas en este trabajo, se observa que la presencia de este compuesto puede favorecer la disminución de *Escherichia coli*, particularmente cuando existe una alta concentración del microorganismo.

Finalmente como producto de las observaciones realizadas, el efecto que puede ejercer la irradiación con luz ultravioleta de manera individual, y en torno a aplicaciones fotocatalíticas en la inactivación de *Escherichia coli*, puede entenderse con base a las propiedades conocidas de la luz UV-A y UV-C para generar efectos deletéreos en los microorganismos. Son innumerables los trabajos que reportan su eficiencia para la inactivación de gran variedad de microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, protozoos y virus (Pigeot *et al.*, 2012); especialmente por su capacidad de penetración en medios poco turbios como el agua de piscinas.

8. CONCLUSIONES

Producto del análisis microbiológico realizado al agua de piscina objeto de estudio en este trabajo, se determina que aunque esta no evidencia un riesgo de contaminación biológica por microorganismos patógenos de origen fecal; presenta cierto nivel de deterioro en su calidad, con la presencia de coliformes totales en baja concentración, y un contenido abundante de microorganismos aerobios mesófilos. Esto demarca la importancia de llevar a cabo un mejor control y vigilancia del método de desinfección aplicado al agua.

A nivel de los factores fisicoquímicos contemplados para el análisis del agua de piscina muestreada en este trabajo, se identificó que esta posee un nivel de pH que se encuentra por encima de los valores considerados como ideales para el mantenimiento de estas aguas, así como un bajo potencial ORP; lo que puede repercutir en la eficiencia alcanzada para la desinfección del agua en procesos como la cloración. A su vez se resalta que una concentración elevada de cloro como la encontrada, constituye un riesgo químico importante por los efectos adversos a la salud que este compuesto puede generar; lo que demanda un mayor control en el proceso de dosificación de este compuesto.

En función de las condiciones de reacción empleadas para la evaluación del sistema fotocatalítico nano-TiO₂/ energía visible, no es factible identificar la contribución del TiO₂ en la reducción de *Escherichia coli* en agua de piscina; por lo que se considera que la presencia de ácido oxálico y sulfato ferroso como aditivos en el proceso, no logran ejercer un efecto que promueva una mejora en la actividad de este catalizador en el espectro visible.

Se identifica que los siete factores evaluados en el proceso fotocatalítico presentan un efecto significativo en la reducción de *Escherichia coli* en agua de piscina. Este proceso se vio favorecido a bajas concentraciones del inóculo bacteriano, un nivel bajo de pH, ausencia de aire, bajas concentraciones de hierro y oxálico, presencia de ozono, y en menor grado por un mayor tiempo de exposición.

Entre los factores evaluados, la concentración del inóculo es el que presenta un mayor efecto en la reducción de *Escherichia coli* en agua de piscina. Es posible precisar una relación evidentemente directa entre la concentración del inóculo microbiano y su influencia en la eficiencia lograda en el proceso de inactivación.

El ácido oxálico y el sulfato ferroso en el proceso de fotocatalisis, contribuyen de forma considerable en la reducción poblacional de microorganismos como *Escherichia coli* en aguas de piscina, tanto por las características intrínsecas de estos compuestos que afectan por diferentes vías la estructura, la fisiología y el metabolismo bacteriano; como por la posibilidad que sugiere su participación en reacciones asistidas por la luz en el espectro visible, que dan lugar a la formación de complejos foto-químicamente activos, y con ello la generación de especies con elevado potencial de óxido-reducción, que favorecen la pérdida de la viabilidad celular. Sin embargo, se consideran necesarios ensayos adicionales que permitan conocer con más detalle la calidad de este proceso, para determinar la viabilidad de su aplicación en la reducción de microorganismos patógenos de origen fecal en aguas de piscina.

9. RECOMENDACIONES

Resulta pertinente la aplicación de métodos que permitan confirmar e identificar la presencia de especies oxidantes y/o reductoras generadas en presencia de oxálico, sulfato de hierro y luz visible durante el proceso, para que pueda establecerse con mayor certeza el efecto que estas tienen en la inactivación de los microorganismos.

Es recomendable un mayor control de variables como el pH. Se sugiere mantener estable este factor durante las reacciones fotocatalíticas, así como su monitoreo. También resulta oportuno evaluar el efecto del ácido oxálico y el sulfato ferroso a concentraciones más bajas; así como utilizar títulos bacterianos altos que permitan detectar en mayor grado el comportamiento de los microorganismos, bajo diferentes condiciones de reacción.

Se considera prudente abordar para el estudio de estos experimentos, un menor número de variables a fin de tener un mayor control de las mismas, y con ello una inferencia más precisa de los resultados. A su vez resulta conveniente, emplear diseños experimentales que permitan contemplar de mejor forma las interacciones entre cada una de las variables involucradas al proceso, y su efecto en los tratamientos; aminorando los sesgos que puedan generarse, y facilitar así un mejor análisis.

10. GLOSARIO

Aditivo: elemento o sustancia que se añade a otro u otra para aumentar o mejorar cualidades.

Bactericida: sustancia o agente físico que es capaz de destruir las bacterias.

Desinfección: proceso de destrucción o inactivación de microorganismos patógenos como bacterias, virus y protozoos; ya sea por medios físicos, químicos, o mecánicos.

Energía de banda prohibida: energía que debe recibir un electrón de la banda de valencia para ser excitado a un estado libre, y poder participar en la conducción (banda de conducción).

Efecto deletéreo: mortífero o venenoso.

Fotocatálisis: reacción catalítica que involucra la absorción de luz por parte de un catalizador o sustrato. Es la aceleración de la velocidad de una fotorreacción en presencia de un catalizador.

Fotoquímica: sub-disciplina de la química que estudia las interacciones entre átomos, moléculas y la luz. Abarca las transformaciones químicas provocadas o catalizadas por la emisión o absorción de luz visible o radiación ultravioleta. Una molécula en su estado fundamental puede absorber un quantum de energía lumínica, esto produce una transición electrónica, en el que una molécula pasa a un estado de mayor energía o estado excitado, resultando más reactiva que en su estado fundamental.

Foto-sensibilización: generación mediante absorción de luz, del estado excitado de un foto-sensibilizador, de manera que éste durante el tiempo de vida de su estado excitado, es capaz de ceder o transferir su exceso de energía a otra molécula presente en el medio circundante, obteniéndose un estado excitado de la misma.

Nanotecnología: área de la ciencia que abarca el análisis, síntesis, diseño, manipulación y aplicación de materiales, dispositivos, y sistemas a través del control

de la materia a nanoescala, así como el aprovechamiento de fenómenos y propiedades de la materia a ese nivel.

Nanomaterial: materiales fabricados en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en escala de tamaño entre 1 y 100 nanómetros.

Nanocatalizador: sustancia o material con propiedades catalíticas que tiene al menos una dimensión a nanoescala, ya sea externa o en términos de las estructuras internas.

Potencial de óxido reducción: es una medida de la actividad de los electrones. El potencial redox se mide en milivoltios o voltios. Un valor positivo es indicativo de un ambiente que favorece las reacciones de oxidación y un valor negativo es indicativo de un ambiente altamente reductor.

Oxido –reducción: reacción química en la que uno o más electrones se transfieren entre los reactivos, provocando un cambio en sus estados de oxidación.

Reacción Fenton: reacción de oxidación en la cual son producidas especies radicales altamente reactivas (radicales hidroxilo), en presencia de peróxido de hidrogeno y metales de transición como catalizadores (generalmente hierro); en condiciones acidas, y de presión y temperatura ambiente.

Semiconductores: Elementos que se comportan como conductores o aislantes dependiendo de factores como el campo eléctrico, la presión, la radiación, entre otros. Con capacidad de conducir la electricidad mejor que un aislante bajo determinadas condiciones, pero en menor grado que los elementos conductores (metales).

BIBLIOGRAFIA

ALROUSAN, D.; DUNLOP, P.; MCMURRAY, T. y BYME, A. Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilized nanoparticle TiO₂ film. En: Water Research. Vol.; 43(2009). pp. 47-54.

APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 21 st edition. Centennial Edition, Washington D.C. 2005.

AUDENAERT, Wim.; CALLEWAERT, Manly.; NOPENS, Ingmar.; CROMPHOUT, Jan.; VANHOUCKEC, Robert.; ANN, Dumoulina.; DEJANS, Pascal.; y VAN, Hullea. Full-scale modelling of an ozone reactor for drinking water treatment. En: Chemical Engineering Journal. Vol.; 157. (2010); pp. 551–557.

BACH, Larissa.; GARBELINI, Ellery.; STETS, Sandra.; PERALTA, Patricio.; Peralta.; EMMEL, Alexandre. Experimental design as a tool for studying trihalomethanes formation parameters during water chlorination. En: Microchemical Journal. Vol.; 123. (2015); pp. 252–258.

BANDALA, Erick; CORONA, Benito; GUI SAR, Raul; USCANGA, Malesio. Aplicación de Procesos Avanzados de Oxidación en la Desactivación Secuencial de Microorganismos Resistentes en Agua. En: Ciencia Ahora.; (2007); pp. 52-63.

BONETTA, Silvia; BONETTA, Sara; MOTTA, Francesca; STRINI, Alberto; y CARRARO. Elizabetta. Photocatalytic bacterial inactivation by TiO₂-coated surfaces. En: AMB Express. Vol.; 1. (2013); pp. 3-59

BRASLAVSKY, S; BRAUN, A; CASSANO, A; EMELINE, A; PALMISANO, M; PARMON, M; y SERPONE, N; Glossary of terms used in photo- catalysis (IUPAC Recommendations). En: Pure Appl. Chem. Vol.; 83 (2011); pp. 931–1014.

BUI, T.; FELIX, C.; PIGEOT, S.; HERRMANN, J.; LEJEUNE, P.; y GUILLARD, C. Photocatalytic inactivation of wild and hyper-adherent *E. Coli* strains in presence of suspended or supported TiO₂. Influence of the isoelectric point of the particle size and of the adsorptive properties of titania. En: Journal of Advanced Oxidation Technologies. Vol.; 11. (2008); pp. 510-518.

CABALLERO, L.; WHITEHEAD, K.A.; ALLEN, N.S. y VERRAN, J. Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO₂ using fluorescent light. En: Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 2009; Vol.; 202. (2009). pp. 92–98.

CASTAGNA, A; y RANIERI, A. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. En: Environmental Pollution. Vol.; 157. (2009); pp.1461–1469.

CASTRO, Nohelia; y CHAIDEZ, Cristóbal. Riesgos Microbiológicos Asociados al Uso de Piscinas Públicas. En: Agua Latinoamérica. Vol.; 3. (2003); pp.16-20.

CDC. Releases surveillance data on waterborne disease outbreaks. [en línea]. < http://www.cdc.gov/media/releases/2011/a0922_waterborne_disease.html > [citado en 2 de diciembre de 2015].

CHATURVEDI, Shalini; DAVE, Pragnesh. ; y SHAH, N. Applications of nano-catalyst in new era. En: Journal of Saudi Chemical Society. Vol.; 16. (2012); pp. 307–325.

CHONG, M. N.; JIN, B; CHOW, C. y SAINT, C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology. A review. En: Wat Res. Vol.; 44. No. 10 (2010); pp. 2997-3027.

CHOWDHURY, Shakhawat; ALHOOSHANI, Khalid; KARANFIL, Tanju. Disinfection byproducts in swimming pool: Occurrences, implications and future needs. En: Water research. Vol.; 53. (2014); pp. 68 – 109.

CHU, Chenghwa.; y LU, Chungsyng. Effects of oxalic acid on the regrowth of heterotrophic bacteria in the distributed drinking water. En: Chemosphere. Vol.; 57. (2004); pp. 531–539.

COLEMAN, H.; MARQUIS, C.; SCOTT, J.; CHIN, S.; y AMAL, R. Bactericidal effects of titanium dioxide-based photocatalysts. En: Chemical Engineering Journal. Vol.; 113. (2005); pp. 55–63.

COLMENARES, M. C; CORREIA, Angelina. y SOUSA, C. Evaluación de la calidad fisicoquímica y bacteriológica en piscinas del estado Carabobo, Venezuela. En: Boletín de malariología y salud ambiental. Vol.; 48. No. 1 (2008); pp. 73-82.

COTE COY, C. Aislamiento, identificación bioquímica y pruebas de cloro resistencia in vitro a cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* obtenidas en la red de distribución del acueducto de Bogotá. Bogotá. 2006. Tesis de grado. (Profesional en Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

DALLOLIO, L.; BELLETTI, M.; AGOSTINI, A.; TEGGI, M.; BERTELLI, M.; BERGAMINI, C.; CHETTI, L. y LEONI, E. Hygienic surveillance in swimming pools: Assessment of the water quality in Bologna facilities in the period 2010–2012. En: Microchemical Journal. Vol.; 110. (2013); p. 624–628.

DAVIS, Catherine. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. En: Journal of Microbiological Methods. Vol.; 103. (2014); pp.9-17.

DE CASTRO, Natalia. Evaluación de un reactor de fotocátalisis heterogénea con nano TiO_2 /ozono/aire para la reducción de microorganismos patógenos presentes en aguas de piscinas. Trabajo de grado (Microbiología).2015. Universidad de Pamplona.

DEUK, Yong.; JU-HYUN, Park; KIM, Young-Hun ; LEE, Myung.; y CHO, Nam. Effect of Nb doping on morphology, crystal structure, optical band gap energy of TiO_2 thin films. En: Current Applied Physics. Vol.; 14.(2014); pp. 421-27.

DIAZ, Helena; ESTELLER, María y GARRIDO, Sofía. Calidad físico-química y microbiológica del agua en parques acuáticos. En: Hidrobiológica. Vol.; 21 (2011); pp. 1-7.

DIDUCH, Malwina.; POLKOWSKA, Zaneta.; y NAMIESNIK, Jacek. The role of heterotrophic plate count bacteria in bottled water quality assessment. En: Food Control. Vol.; 61. (2016); pp. 188-195.

DOEDERER, Katrin.; GERNJAK, Wolfgang.; WEINBERG, Howard.; FARRE, María. Factors affecting the formation of disinfection by-products during chlorination and chloramination of secondary effluent for the production of high quality recycled water. En: Water research. Vol.; 48. (2014); pp. 218 -228.

DOMÍNGUEZ SUAREZ, Sara. Estudio de la degradación fotocatalítica de docecilbencenosulfonato (DBS) en reactores con lámparas de mercurio y con leds. Tesis (ingeniera química). 2012. Universidad de Cantabria. Escuela técnica superior de ingenieros industriales y de telecomunicaciones.

DROBNIC, Franchek. Impacto sobre la salud de los compuestos utilizados en el tratamiento del agua en las piscinas. Revisión. En: Apunts. Medicina de l'Esport. Vol.; 44. (2009); pp. 42-47.

FANTUZZI, G.; RIGHI, E.; PREDIERI, G.; GIACOBAZZI, P; AGGAZZOTTI, G. Prevalence of ocular, respiratory and cutaneous symptoms in indoor swimming pool workers and exposure to disinfection by-products (DBPs). En: International Journal of Environmental Research and Public Health. Vol.; 7. (2010); pp. 1379-1391

FERNÁNDEZ IBÁÑEZ, Pilar. Desinfección con reactores solares: experiencia operativa. "Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación de agua" (SOLARSAFEWATER). Capítulo 14. (2005); pp. 221-235.

FLORENTIN, Arnaud; HAUTEMANIÈREA, Alexis y HARTEMANN, Philippe. Health effects of disinfection by-products in chlorinated swimming pools. En: International Journal of Hygiene and Environmental Health. Vol.; 214. (2011); pp. 461–469.

FORERO, Jorge; ORTIZ, Olga; y RIOS, Fabián. Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. En: Ciencia Tecnología y Futuro. Vol.; 3 (2005); pp. 97-109.

FOSTER, Howard A.; DITTA, Iram B; VARGHESE, Sajnu y STEELE, Alex. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. En: Appl Microbiol Biotechnol. Vol.; 90. (2011); p. 1847–1868.

FOSTER, Richard. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. En: Journal of Bacteriology. Vol.; 186. (2004); pp. 6032–6041.

FUJISHIMA, A., ZHANG, X, 2006. Titanium Dioxide Photocatalysis: Present Situation and Future Approaches. En: Comptes Rendus Chimie. Vol.; 9 (2006); pp. 750-760.

GARCÉS, L.; MEJIA, E.; SANTAMARÍA, J. La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales. En: Revista Lasallista de Investigación. Vol.;1. (2012); pp. 83-92.

GIRALDO GARCÍA, Andrés Felipe; MARROQUÍN MESA, Viviana Arelis. Síntesis y refinamiento de la estructura de dióxido de titanio dopada con cromo (Ti_{1-x}Cr_xO₂). 2014. Grupo de Investigación en Fotocatálisis y Estado Sólido. Universidad Tecnológica de Pereira.

GOGATE, P; y PANDIT, A. A review of imperative technologies for wastewater treatment: oxidations technologies at ambient conditions. En: Environmental Research. Vol.; 8. (2004); pp.501-551.

GOGNIAT, Gaetan y DUKAN, Sam. TiO₂ photocatalysis causes DNA Damage via Fenton Reaction- generated Hydroxyl during the recovery period. En: Applied and environmental microbiology. Vol.; 73. No.23 (2007); pp. 7740 – 7743.

GORDON, Nichols. Infection risks from water in natural and man-made environments. Londres: EuroSurveill, 2006. Vol; 11. pp. 76–78.

GOURMELON, M.; CILLARD, J.; y POMMEPUY, M. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. En: Appl Bacteriol. Vol.; 77. (1994); pp. 105–112.

GUPTA, S.; y TRIPATHI, M. A review of TiO₂ nanoparticles. En: Chinese Science Bulletin. Vol.; 56. (2011); pp. 1639-1657.

HAFIZAH, N.; y SOPYAN, L. Nanosized TiO₂ Photocatalyst Powder vía Sol-Gel Method: Effect of Hydrolysis Degree on Powder Properties. En: International Journal of Photoenergy. (2009); pp. 1-8.

HASHIMOTO, Kazuito.; IRIE, Hiroshi.; y FUJISHIMA, Akira. TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. En: Japanese Journal of Applied Physics. Vol.; 44. (2005); pp. 8269-8285.

HERRMANN, J. Fundamentals and microconceptions in photocatalysis. En: Journal of Photochemistry and Photobiology. Vol.; 216. (2010); pp. 85-93.

HT, Richard.; FOSTER JW. Acid resistance in *Escherichia coli*. En: Advances in Applied Microbiology, Vol.; 52. (2003); pp.167 186.

IZQUIERDO, Enrique. Evaluación del desarrollo de *Legionella pneumophila* mediante el análisis de materiales de sistemas de distribución de agua. En: Malariología y salud ambiental. Vol.; 49. (2009); pp. 167-171.

JARAMILLO, PÁEZ C.A. y TABORDA OCAMPO G. La fotocatalisis: aspectos fundamentales para una buena remoción de contaminantes. En: Revista Universidad de Caldas. (2006); pp. 71-88.

JAVAID, Shaghrif.; FARRUKH, Muhammad; MUNEEER, Igra.; SHAHID, Maryam.; RAHMAN,; Muhammad; y AKRAJAS Umar. Influence of optical band gap and particle size on the catalytic properties of Sm/SnO₂-TiO₂ nanoparticles. En: Superlattices and Microstructures. Vol.; 82. (2015); pp. 234-247.

JEONG, Joonseon.; YOON, Jeyong. Dual roles of CO₂ - for degrading synthetic organic chemicals in the photo/ferrioxalate system. En: Water Research. Vol.; 38. (2004); pp. 3531-3540.

JEONG, Joonseon.; YOON, Jeyong. PH effect on OH radical production in photo/ferrioxalate system. En: Water Research. Vol.; 39. (2005); pp. 2893-2900.

KAARIANEN, M., KAARIANEN, T., y CAMENRON, D. Titanium dioxide thin films, their structure and its effect on their photoactivity and photocatalytic properties. En: Thin Solid Films. Vol.; 517. (2009); pp. 6666-6670.

KWAN, C.Y; Y CHU, W. The role of organic ligands in ferrous-induced photochemical degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. En: Chemosphere. Vol.; 67. (2007); pp. 1601-1611.

LARA, Ana. Diseño Estadístico de Experimentos, Análisis de Varianza y temas relacionados: tratamiento informático mediante SPSS. Segunda edición. PAIS: Editorial Proyecto Sur de Ediciones. 2005.

LEE, Kyung; MIN, Hoon; y JANG, Jyongsik. Mesoporous Nanofibers from Dual Structure-Directing Agents in AAO: Mesostructural Control and their Catalytic Applications. En: Chem. Eur. Vol.; 15. (2009); pp. 2491.

LEGUIZAMON, Juliana; QUIÑONEZ, César; ESPINOSA, Hilda; SARRIA, Víctor. Fotosensibilización de TiO₂ con un colorante comercial para la foto-degradación de contaminantes orgánicos en agua. Rev U.D.C.A. (2010); Vol., 13. pp. 185-190.

LORETO, Santa; IBARLUZEA, Jesús; BASTERRECHEA, Mikel; GOÑI, Fernando; ULIBARRENA, Enrique; ARTIEDA, Juncal y ORRUÑO, Ibai. Indoor air and bathing water pollution in indoor swimming pools in Guipúzcoa (Spain). En: Gac Sanit. Vol.; 23. (2009); pp. 115-120.

LUBICK, Naomi; y BETTS, Kellyn. Silver socks have cloudy lining. En: Environ. Sci. Technol. Vol.; 42. (2008); pp. 3910–3910.

LUMB, R.; STAPLEDON, R.; SCROOP, A.; BOND, P.; CUNLIFFE, D.; GOODWIN, A.; DOYLE, R. y BASTIAN, I. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. En: Appl. Environ. Microbiol. Vol.; 70. (2004); pp. 4906–4910.

MACYKA, Konrad.; GRAZYNA, Stocze.; BUCHALSKAA, Marta.; KUNCEWICZ, Joanna.; PRZEMYSŁAW, Łabuz. Titanium (IV) complexes as direct TiO₂ photosensitizers. En: Coordination Chemistry Reviews. Vol.; 254. (2010); pp. 2687–2701.

MALATO, S.; FERNÁNDEZ IBÁÑEZ, P.; MALDONADO, M.I.; BLANCO, J. y W. GERNJAK. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. En: Catalysis Today. Vol.; 147. (2009); p. 1–59.

MARIS, Van.; WN, Konings.; JP, Van Dijken.; JT, Pronk. Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. En: Metabolic Engineering. Vol.; 6. (2004); pp. 245–255.

MARTINEZ, Rosa Y ALVARADO, Luzmila. Bacteriological quality of water of public and private pools of the city of Cumaná, Sucre state, Venezuela. Boletín de malariología y salud ambiental. Vol.; 1. (2013); pp. 37-45.

MARTÍNEZ, A. Preparación y caracterización de polvos nanoestructurados de TiO₂ - Ir y TiO₂ - Rh por sol-gel y su evaluación fotocatalítica, 2011. (Maestría), Instituto Politécnico Nacional, Querétaro, México.

MATSUNAGA, Tadashi.; TOMODA, Ryoza.; NAKAJIMA, Toshiaki.; y WAKE, Hitoshi. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. En: *Microbiology Letters*. Vol.; 29 (1985); pp. 211-214.

MAURER LM, E.; Yohannes.; SS, Bondurant.; M, Radmache.; JL, Slonczewski. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. En: *Journal of Bacteriology*. Vol.; 187. (2005); pp. 304–319.

MOKHBI, Yasmina; KORICHI, Mourad; SIDROUHO, Hadj y CHAOUICHE, Khaoula. Treatment heterogeneous photocatalysis; Factors influencing the photocatalytic degradation by TiO₂. En: *Energy Procedia* Vol.; 50. (2014); pp. 559 – 566.

MONTGOMERY, Douglas. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. México D.F: Editorial Limusa, S.A de C.V. 2004. pp.328.

MURRELL, Jeny.; BADÍA, Marcial.; ÁLVAREZ, Beatriz.; HERNÁNDEZ, Nidia.; y PÉREZ, Maira. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. En: *CENIC, Ciencias Biológicas*. Vol.; 3. (2013).

MURUGANANDHAM, M.; WU, Chen. Evaluation of water treatment sludge as a catalyst for aqueous ozone decomposition. En: *Catalysis Communications*. Vol.; 8. (2007); pp. 1609–1614.

MWH. Water treatment: Principles and design. Segunda edición, John Wiley and Sons, Inc., Nueva Jersey, Estados Unidos de América. Editorial Hoboken. (2005).pp. 955-1034.

NARVÁEZ, Leonardo.; y COHEN, Juan. Aplicación de la fotocatalisis heterogénea solar para la degradación de residuos farmacéuticos en efluentes líquidos. 2012. Tesis Profesional (Ingeniero Químico). Universidad de Cartagena.

NICHOLS, CG. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. En: *Nature*. Vol.; 23. (2006); pp. 470-476.

OLA, Oluwafunmilola.; VALER; Maroto. Review of material design and reactor engineering on TiO₂ photocatalysis for CO₂ reduction. En: *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. Vol.; 24.(2015); pp. 16–42.

OHNO T.; AKIYOSHI, M.; UMEBAYASHI, T.; ASAI, K.; TAKAHIRO, Mitsuc.; MICHIO, Matsumurac.; Preparation of S-doped TiO₂ photocatalysts and their

photocatalytic activities under visible light. En: Applied Catalysis A: General. Vol: 265. (2004); pp. 115-121.

OHTANI, B. Photocatalysis A to Z- What we know an what we do not know in a scientific sense. En: Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. Vol.; 11. (2010); pp. 157-178.

PALOMARES GARCIA, Fernando de Jesús. Degradación del colorante Azul de metileno mediante Fotocatálisis heterogénea, ozonización y procesos Foto-Fenton asistidos con Ferrioxalato. La Cruz de Huanacastle, 2013. Tesis Profesional (Licenciado en Ingeniería Ambiental). Instituto tecnológico de Bahpia de Banderas.

PAPADOPOULOU, Chrissanthy.; ECONOMOU, Vangelis.; SAKKAS, Hercules.; GOUSIA, Panagiota; GIANNAKOPOULOS, X.; DONTOROU, Catherine; FILIOUSSIS, George; GESSOULI, Helen; KARANIS, Panagiotis Y LEVEIDIOTOU, Stamatina. Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: Investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates. En: Int. J. Hyg. Environ. Health. Vol.; 21. (2008); pp. 385–397.

PASQUARELLA, Cesira; VERONESI, Licia; NAPOLI, Christian; CASTALDI, Silvana; PASQUARELLA, María; SACCANI, Elisa; COLUCCI, María Eugenia; AUXILIA, Francesco; GALLÈ, Francesca; DI ONOFRIO, Valeria; TAFURI, Silvio; SIGNORELLI, Carlo y LIGUORI, Giorgio. What about behaviours in swimming pools? Results of an Italian multicentre study. En: Microchemical Journal. Vol.; 112. (2014); pp. 190–195.

PERAL PÉREZ, José. Síntesis, caracterización y ensayos cinéticos del nanocomposite RuO₂/TiO₂/MWCNT/Pt en la producción fotocatalítica de combustibles solares bajo iluminación UV y VIS. 2011. Iniciación a la investigación y trabajo final del máster (Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Químicas). Universidad Autónoma de Barcelona.

PERTEGA, Díaz.; PITA Fernández Técnicas de regresión: Regresión Lineal Múltiple. Técnicas de regresión: Regresión Lineal Múltiple. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario de La Coruña España. En: CAD ATEN PRIMARIA. Vol., 7; (2000): pp. 173-176.

PFALLER, S. Innovative Methods for Determining the Microbiological Quality of Drinking Water. En: Assuring Purity of Drinking Water. Vol.;2. (2014); pp. 230-248.

PHAM, Thanh.; y BYEONG, Lee. Cu doped TiO₂/GF for photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* in bioaerosols under visible light irradiation: Application and mechanism. En: Applied Surface Science. Vol.; 296. (2014); pp. 15-23.

PIGEOT, S.; SIMONET, F.; CERDA, E.; LAZZARONI, J.C.; ATLAN, D.; GUILLARD, C. Photocatalysis and disinfection of water. Identification of potencial bacterial targets. En: Applied catalysis environmental. Vol.; 104. (2011); pp. 390-398.

PIGEOT, S.; SIMONET, F.; ATLAN, D.; LAZZARONI, D; GUILLARD, C. Bactericidal efficiency and mode of action: A comparative study of photochemistry and photocatalysis. En: water research. Vol.; 46. (2012); pp. 3208 – 3218.

POWELL, P.A.; APELLA, María ; LITTER, Marta I. y BLESA, Miguel A. Desinfección solar de aguas por fotólisis y fotocatalisis: Aplicación en Tucumán, Argentina. En: Visión desde la Física y la Química en los Albores del Siglo XXI. Cap. III. (2006); p. 725-733.

RAMÍREZ, Silvia.; RIVAS, Alfieri.; SÁNCHEZ, M. Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos en agua potable envasada y distribuida en San Diego, estado Carabobo, Venezuela. En: Rev. Soc. Ven. Microbiología. Vol.; (2004); pp.1-2.

RICHARDSON, S.D. Desinfection By- products: formation and occurrence in drinking wáter treatment. En: Encyclopedia of Envorinmental Health. Vol.; (2011); pp. 110-136.

RINCON, Ángela.; PULGARIN, Cesar. Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. En: Applied Catalysis B: Environmental. Vol.; 49. (2004); pp. 99–112.

RIZZO, L. Inactivation and injury of total coliform bacteria after primary disinfection of drinking water by TiO₂ photocatalysis. En: Journal of Hazardous Materials. Vol.; 165. (2009). pp. 48–51.

ROBERTSON, Peter.; ROBERTSON, Jeannete.; y BAHNEMANN, Detlef. Removal of microorganisms and their chemical metabolites from water using semiconductor photocatalysis. En: Journal of Hazardouz Materials. Vol.; 211-212. (2012); pp. 161-171.

ROBLES, Esperanza; RAMIREZ, Elizabeth; DURAN, Ángel; MARTÍNEZ, María; y GONZÁLES, María. Calidad bacteriológica y fisicoquímica del agua del acuífero Tepalcingo-Axochiapan, Morelos, México. En: Avances en Ciencias e Ingeniería. Vol.; 4. (2013); pp. 19-28.

RUALES, Cristina.; BARONA, José Fernando.; SIENKIEWICZC, Andrzej.; VÉLEZ, Julia.; BENÍTEZ, Luis. Bacterial inactivation with iron citrate complex: A new source

of dissolved iron in solar photo-Fenton process at near-neutral and alkaline pH. *Applied Catalysis B: Environmental*. Vol.; 180. (2016); pp. 379–390.

SAITO, T; IWASE, T; HORIE, J. y MORIOKA, T. Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutants *Streptococci*. En: *Journal of Photochemistry and photobiology*. Vol.; 14. (1992); pp. 369-379.

SCUDERI, V.; BUCCHERI, M.; IMPELLIZZERI, G.; DI MAURO, A.; RAPPAZZO, G.; BERGUM, K.; SVENSSON, B.; y PRIVITERA, V. Photocatalytic and antibacterial properties of titanium dioxide flat film. En: *Materials Science in Semiconductor Processing*, en prensa. (2015).

SCHETS, Franciska; SCHIJVEN, Jack F y DE RODA HUSMAN, Ana Maria. Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. En: *Water research*. Vol.; 45. (2011); pp. 2392-2400.

SCHWARTZ, J.; HEISLER, S.; FRIEDRICH, F. y FAUBEL, W. Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks. En: *Chemosphere*. Vol.; 77. (2009); pp. 249-257.

SECRETARIA DE SALUD. Norma Oficial Mexicana NOM-000-SSA1-2010. Requisitos sanitarios y calidad de agua que deben cumplir las albercas para uso Recreativo humano. Estados Unidos Mexicanos: Secretaria de salud, 2010. (NOM000-SSA1-2010).

SHANNON, M.; BOHN, P.; ELIMELECH, M.; GEORGIADIS, J.; MARINAS, B., y MAYES, A. Science and technology for water purification in the coming decades. En: *Nature* Vol.; 45. (2008); pp. 301-310.

SIMARD, Sabrina.; TARDIF, Robert.; RODRIGUEZ, Manuel. Variability of chlorination by-product occurrence in water of indoor and outdoor swimming pools. En: *Water Research*. Vol.; 47. (2013); PP.1763-1772.

SINHA, S.; TAPIA, OROZCO, N., G.; ACOSTA, RAMÍREZ, D., S. y RODRÍGUEZ, VÁZQUEZ, R. Effect of surfactant on TiO₂/UV mediated heterogeneous photocatalytic degradation of DDT in contaminated water. En: *Nanotech*. Vol.; 2. (2009); pp. 411 – 414.

SOLLER, Jeffrey; SCHOEN, Mary; BARTRAND, Timothy; RAVENSCROFT, John y ASHBOLT, Nicolas. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal Contamination. En: *Water research*. Vol.; 44. (2010); pp. 4674 -469.

SOWMYA, Appunni.; y MEENAKSHI, Sankaran. Photocatalytic reduction of nitrate over Ag-TiO₂ in the presence of oxalic acid. En: Journal of Water Process Engineering. (2014); pp. 1-8.

SPUHLER, Dorothee; HERRERA, Julian; PULGARIN, Cesar. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂, and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. En: Applied Catalysis B: Environmental. Vol.; 96. (2010); pp. 126-141.

SUZUKI, Harufumi.; ARAKI, Sadao; y YAMAMOTO, Hideki. Evaluation of advanced oxidation processes (AOP) using O₃, UV, and TiO₂ for the degradation of phenol in water. En: Journal of Water Process Engineering. Vol.;7. (2015); pp. 54-60.

TAPIA OROZCO, Natalia. Efecto de un surfactante en la generación de ROS y en la degradación de endosulfan por fotocatalisis heterogénea nanoestructurada. Mexico D.F, 2014. Tesis Doctoral. CINVESTAV.

TÉLLEZ COBOS, Luz Ángela; DÍAZ MARTÍN, Fabián Andrés. Síntesis de TiO₂ dopado con nitrógeno con actividad fotocatalítica bajo luz visible. 2010. Tesis profesional (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander.

TERRÁEZ, Manuel y ANGEL, Juan. Análisis de Varianza ANOVA. [en linea]. < <http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/ANOVA.pdf> > [citado en 30 de septiembre de 2015]

THABET, Sana; WEISS-GAYET, Michele.; FREDERIC, Dappozze.; PASCALE, Cotton.; y CHANTAL, Guillard. Photocatalysis on yeast cells: Toward targets and mechanisms. En: Applied Catalysis B: Environmental. Vol.; 140–141. (2013); pp.169-178.

TORRES, Irán.; VENTA, Mayra.; CASTRO, Carlos.; URRUTIA, Elaine.; y CHACÓN, Yamelis. Actividad antimicrobiana de los subproductos generados por la reacción del ozono con los microorganismos. En: Revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol.; 41. (2010). pp.121-125.

UNGUREANU, Camelia.; DUMITRIU, Cristina.; POPESCU, Simona.; ENCULESCU, Mónica.; TOFAN, Vlad.; POPESCU, Marian.; y PIRVU, Cristian. Enhancing antimicrobial activity of TiO₂/Ti by torularhodin bioinspired surface modification. En: Bioelectrochemistry. En prensa. (2015); pp. 1-34.

VELASCO, Edwing; MORENO, Andrea.; y GIRALDO, Sonia. Efecto de la presencia de sales inorgánicas sobre la inactivación fotocatalítica de *E. coli* en agua. En: Ingeniería y Ciencia. Vol.; 9. (2013); pp. 193-208.

VILLANUEVA JARAMILLO, Carolina. Fotocatálisis con TiO_2 /ultravioleta y TiO_2 CuSO_4 /visible como sistemas de desinfección para inactivar *E. coli* proveniente de agua residual doméstica. Bogotá, 2011. Tesis de grado (Maestría en Ciencias Biológicas). Pontificia Universidad Javeriana.

WHO. Guidelines for safe recreational water environments. HEALTH AND SAFETY IN RECREATIONAL WATERS. WORLD HEALTH ORGAN. (2014); pp. 92:79.

WHO. MICROBIAL HAZARDS. En: Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Swimming Pools and similar Environments, Vol; 2.(2006). pp. 26-146.

YANG, W.; SCOTT, Amal. Progress in heterogeneous Photocatalysis: from classical radical Chemistry to Engineering Nanomaterials and Solar Reactors. En: The Journal of Physical Chemistry Letters. Vol.; 3. (2012); pp. 629-639.

YU, Ruey-Fang.; CHENB, Ho-Wen.; CHENGA, Wen-Po.; SHENA, Yu- Chiu. Application of pH-ORP titration to dynamically control the chlorination and dechlorination for wastewater reclamation. En: Desalination. Vol.; 244. (2009); pp. 164–176.

ZHAO, L.; YU, Y., SONG, L.; HU, X.; y LARBOT, A. Synthesis and characterization of nanostructured. En: Applied Surface Science. Vol.; 239. (2005); pp. 285–291.

ANEXOS

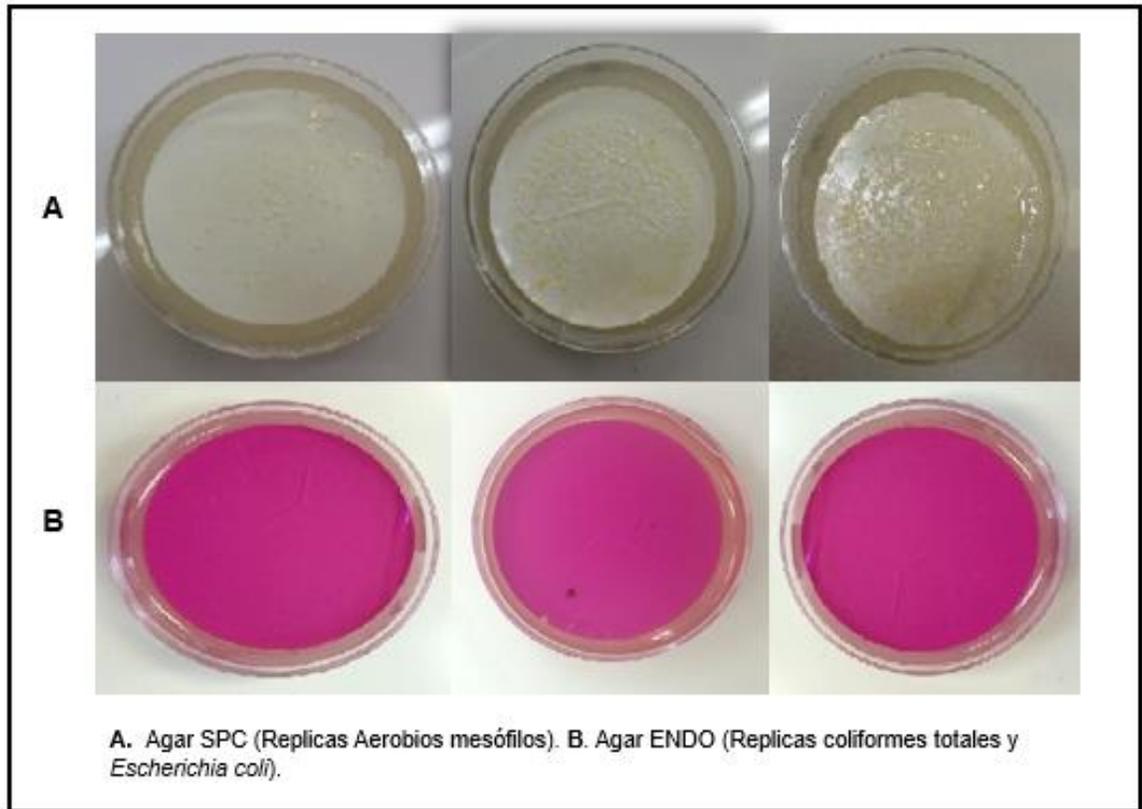
Anexo 1. Resultado determinación de cloro en muestra de agua de piscina.



Concentración de cloro registrada > 5 ppm a un valor de pH de 7.8

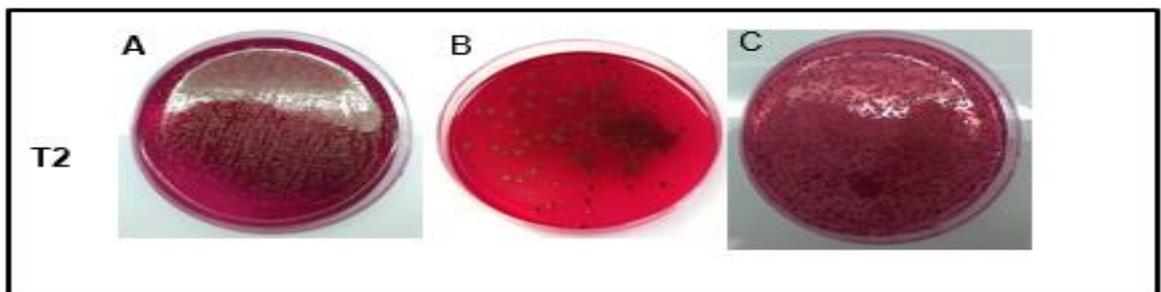
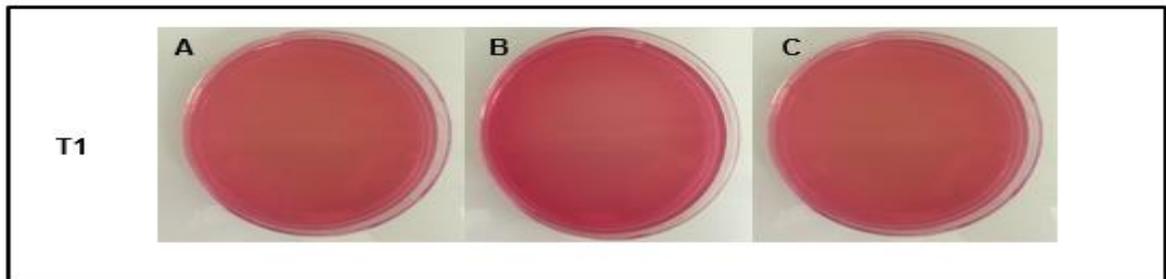
Anexo 2. Resultado análisis microbiológico de agua de piscina.

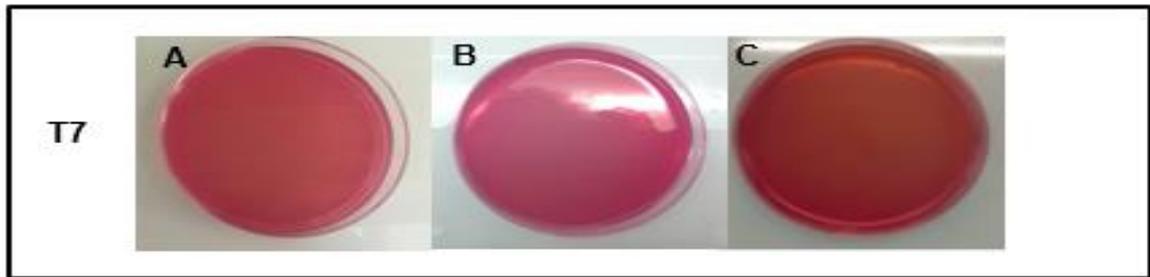
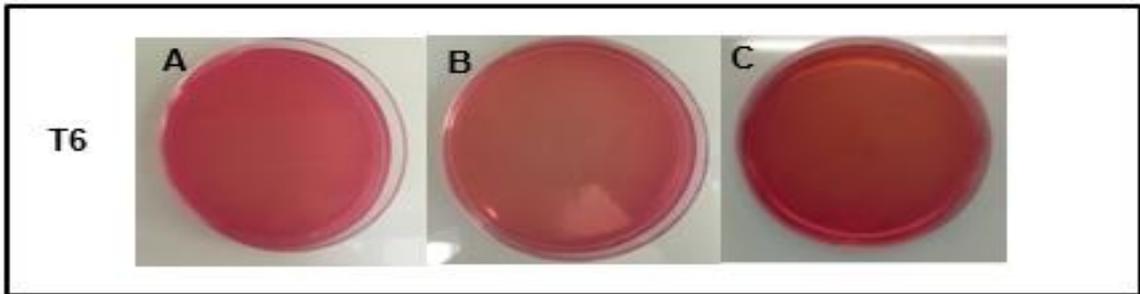
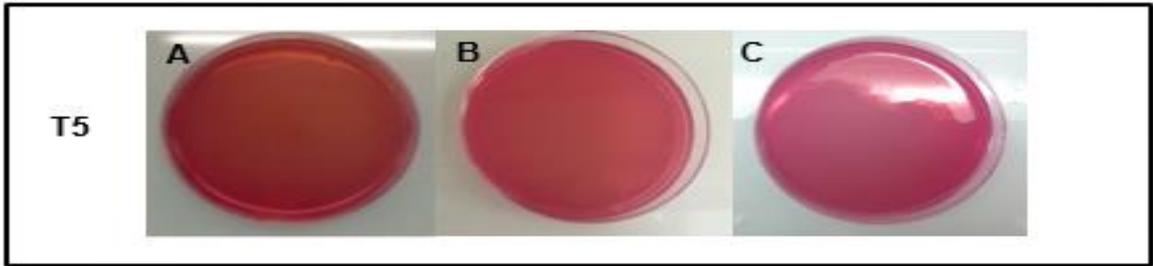
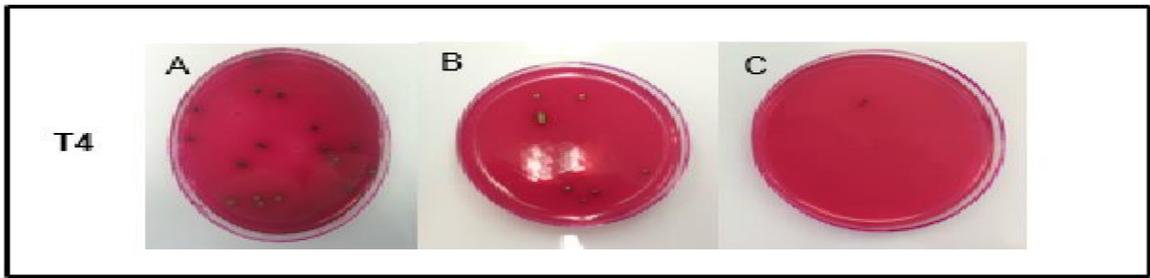
A. Crecimiento abundante de microorganismos aerobios mesófilos, **B.** presencia de coliformes totales en baja concentración (1 UFC/ 100mL), y ausencia de crecimiento de bacterias coliformes fecales (*Escherichia coli*).



Anexo 3. Resultados reducción de microorganismos patógenos (*Escherichia coli* CDBB-B- 1010) por fotocatalisis nano TiO₂/Energía visible.

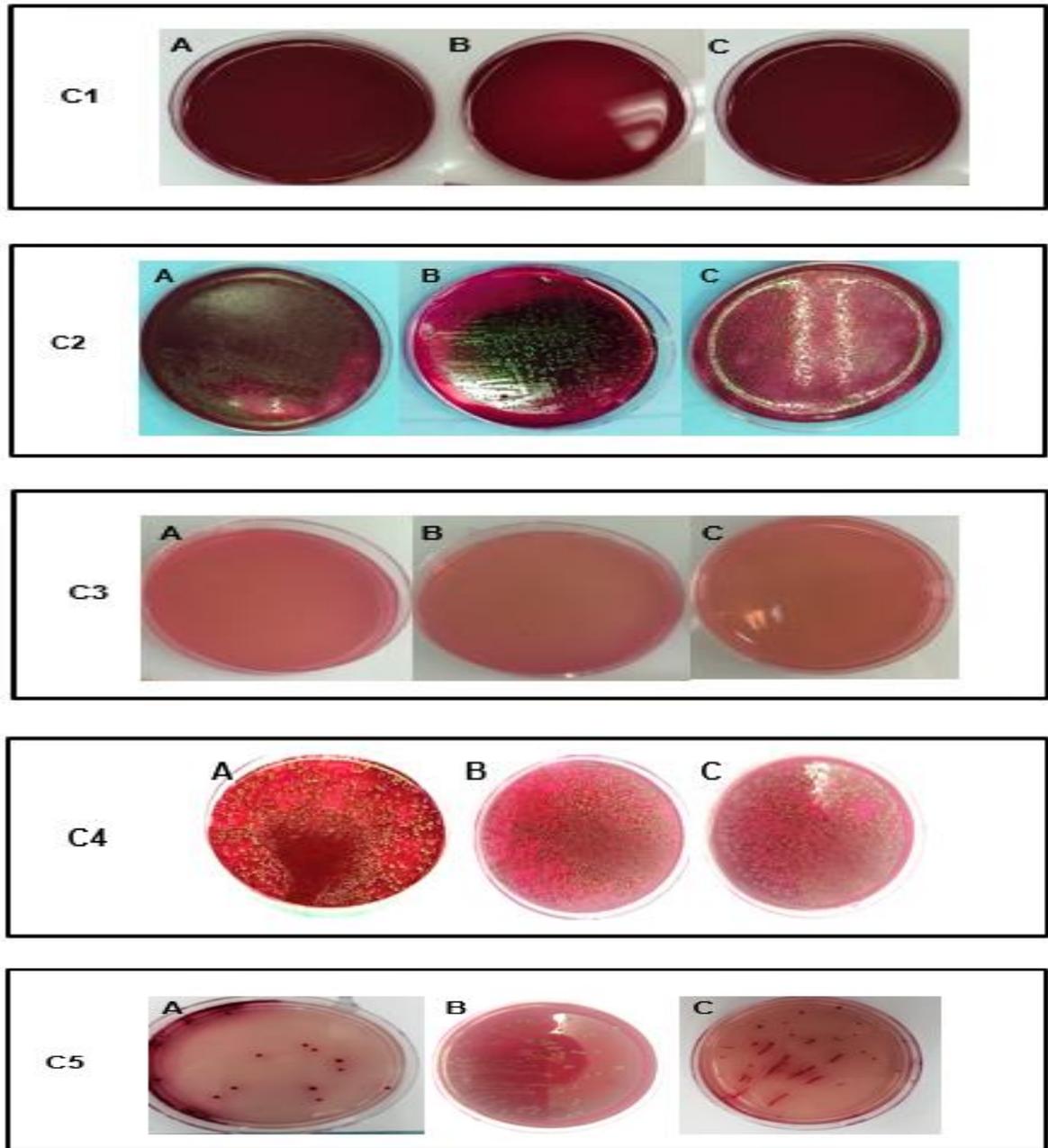
Disminución de *Escherichia coli* en la muestra tratada, a partir del conteo en placa. Inactivación considerable de la bacteria en los 8 ensayos realizados, con una mayor reducción en los tratamientos evaluados a un nivel bajo de concentración del inoculo (T1, T4, T5, T6, y T7).





Anexo 4. Resultados tratamientos control (*Escherichia coli* CDBB-B- 1010).

Inactivación equivalente de *Escherichia coli* en los controles 1 (Luz UV) y 3 (Luz UV-TiO₂). Disminución moderada de la cuenta microbiana en el control 4 (ácido oxálico y Fe, en ausencia de luz). Control 2 (TiO₂, luz visible, ausencia de Fe y ácido oxálico) no se aprecia un efecto considerable en la reducción. Control 5 (ácido oxálico, Fe, luz visible, y ausencia de TiO₂) disminución considerable del microorganismo.



Anexo 5. Valores normalizados mediante la determinación del logaritmo natural (Ln) de los resultados de la cuenta microbiana referentes a *Escherichia coli*. Resultados tratamiento fotocatalítico nano- TiO₂/ energía visible.

| Diseño experimental 2 ⁷⁻⁴ (Tratamiento fotocatalítico nano TiO ₂ / energía visible) | | | | | | | | | |
|---|-----|-----------|-------|--------|---------|----|---------|-----------------------|---------------------|
| TRATAMIENTO | 1pH | Aireación | Ozono | Tiempo | Oxálico | Fe | Inóculo | Variable de respuesta | |
| | | | | | | | | Ln | UFC/ml |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 9,03 | 84 X10 ² |
| | | | | | | | | 8,16 | 35 X10 ² |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 8,21 | 37 X10 ² |
| | | | | | | | | 6,9 | 10 X10 ² |
| | | | | | | | | 7,31 | 15 X10 ² |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 8,03 | 31 X10 ² |
| | | | | | | | | 5,34 | 21 X10 |
| | | | | | | | | 4,49 | 9 X10 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 3,68 | 4 X10 |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 0 | <10 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 0 | <10 |
| | | | | | | | | 8,69 | 60 X10 ² |
| | | | | | | | | 8,07 | 32 X10 ² |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9,3 | 11 X10 ² |

Anexo 6. Valores normalizados mediante la determinación del logaritmo natural (Ln) de los resultados de la cuenta microbiana referentes a *Escherichia coli*. Resultados tratamientos control.

| Control | Variable de respuesta | |
|---------|-----------------------|---------------------|
| | Ln | UFC/mL |
| 1 | 0 | <10 |
| | 0 | <10 |
| | 0 | <10 |
| 2 | 13,78 | 97X10 ⁴ |
| | 9,74 | 17X10 ³ |
| | 13,27 | 58 X10 ⁴ |
| 3 | 0 | <10 |
| | 0 | <10 |
| | 0 | <10 |
| 4 | 9,3 | 11 X10 ³ |
| | 9,47 | 13 X10 ³ |
| | 11,51 | 10 X10 ⁴ |
| 5 | 5,39 | 22 X10 |
| | 6,88 | 9 X10 |
| | 6,34 | 57 X10 |

Anexo 7. Análisis de varianza (ANOVA) en la reducción de *Escherichia coli* en agua de piscina tratada por fotocátalisis nano TiO₂/ energía visible.

La técnica ANOVA compara las medias de Y (variable dependiente) asociadas a los distintos niveles del factor (X₁, X₂,..., X_n). Para ello se compara una medida de la variación entre diferentes niveles (MS-factor) con una medida de la variación dentro de cada nivel (MS-error). Si el MS-factor es significativamente mayor que el MS-error, se concluye que las medias asociadas a diferentes niveles del factor (variable independiente) son distintas. Esto significa que el factor influye significativamente sobre la variable dependiente Y (Análisis de varianza ANOVA <http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/ANOVA.pdf> citado 30 de noviembre de 2015).

| Response 1 UFC | | | | | |
|--|----------------|----|-------------|---------|---------------------|
| ANOVA for selected factorial model | | | | | |
| Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III] | | | | | |
| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F value | p- value Prob< F |
| Model | 350.24 | 7 | 50.03 | 245.10 | < 0.0001 |
| A- pH | 76.08 | 1 | 76.08 | 372.67 | < 0.0001 |
| B- Aireación | 55.24 | 1 | 55.24 | 270.58 | < 0.0001 |
| C-Ozono | 51.30 | 1 | 51.30 | 251.32 | < 0.0001 |
| D- Tiempo | 2.71 | 1 | 2.71 | 13.29 | 0.0022 |
| E- Oxálico | 3.67 | 1 | 3.67 | 18.00 | 0.0006 |
| F- Fe | 10.28 | 1 | 10.28 | 50.37 | < 0.0001 |
| G- Inóculo | 150.95 | 1 | 150.95 | 739.44 | < 0.0001 |
| Pure Error | 3.27 | 16 | 0.20 | | |
| Cor Total | 353.51 | 23 | | | |

El valor F de 245,10 del modelo, implica que el modelo es significativo. Solo hay oportunidad del 0.01% de que el " valor- F del modelo" pueda ocurrir debido al ruido.

Los valores de "Prob> F" menores de 0,0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, C, D, E, F, G son los términos del modelo significativos. Los valores superiores a 0.1000 indican que los términos modelo no son significativos. Si hay muchos términos en el modelo que resultan insignificantes, la reducción de modelo puede mejorar su modelo.

| | | | |
|---------------------|-------|---------------------|--------|
| Desviación estandar | 0.45 | R-Cuadrado | 0.9908 |
| Media | 3.63 | Adj R-Cuadrado | 0.9867 |
| C.V. % | 12.43 | Pred R-Cuadrado | 0.9792 |
| PRESS | 7.35 | Predicción adecuada | 33.300 |

El "Pred R-Cuadrado" de 0.9792 es razonable de acuerdo con el "Adj R cuadrado" de 0.9867.

"La predicción adecuada" mide la relación señal-ruido. Una mayor proporción de 4 es deseable. Su razón de 33.300 indica una señal adecuada. Este modelo se puede utilizar para navegar por el espacio de diseño.

| Coefficient Factor | Standard Stimte | 95% CI Df | 95% CI Error | Low | High | VIF |
|--------------------|-----------------|-----------|--------------|-------|-------|------|
| Intercept | 3.63 | 1 | 0.092 | 3.44 | 3.83 | 1.00 |
| A- pH | 1.78 | 1 | 0.092 | 1.58 | 1.98 | 1.00 |
| B- Aireación | 1.52 | 1 | 0.092 | 1.32 | 1.71 | 1.00 |
| C- Ozono | -1.46 | 1 | 0.092 | -1.66 | -1.27 | 1.00 |
| D- Tiempo | -0.34 | 1 | 0.092 | -0.53 | -0.14 | 1.00 |
| E- Oxálico | 0.39 | 1 | 0.092 | 0.20 | 0.59 | 1.00 |
| F- Fe | 0.65 | 1 | 0.092 | 0.46 | 0.85 | 1.00 |
| G- Inóculo | 2.51 | 1 | 0.092 | 2.31 | 2.70 | 1.00 |

Con la ecuación final en términos de factores codificados (A, B, C, D, E, F, G) y su equivalente, la ecuación final de factores reales (pH, aireación, ozono, tiempo, oxálico, Fe, inóculo), se conforma el modelo de regresión lineal múltiple con el ordenamiento secuencial de cada uno de los factores respecto a la expresión numérica de su efecto sobre la variable dependiente (reducción de *E. coli* expresado como UFC).

La relación entre dos o más variables a partir de ecuaciones se denomina regresión lineal múltiple. Este modelo puede expresarse como:

$$Y_t = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p + \varepsilon$$

donde:

- Y_t corresponde a la variable dependiente
- $X_1, X_2 \dots X_p$ a las variables independientes
- $\beta_1, \beta_2 \dots \beta_p$ parámetros que miden la influencia que las variables independientes tienen sobre el regresando
- β_0 es la intersección o término constante, y P al número de parámetros independientes a tener en cuenta en la regresión (Pértega y Pita, 2000).

La ecuación final en términos de factores codificados:

$$\begin{aligned} \text{UFC} &= \\ +3.63 & \\ +1.78 & * A \\ +1.52 & * B \\ -1.46 & * C \\ -0.34 & * D \\ +0.39 & * E \\ +0.65 & * F \\ +2.51 & * G \end{aligned}$$

La ecuación final en términos de factores reales:

$$\begin{aligned} \text{UFC} &= \\ +3.63375 & \\ +1.78042 & * \text{pH} \\ +1.51708 & * \text{Aireación} \\ -1.46208 & * \text{Ozono} \\ -0.33625 & * \text{Tiempo} \\ +0.39125 & * \text{Oxálico} \\ +0.65458 & * \text{Fe} \\ +2.50792 & * \text{Inóculo} \end{aligned}$$

Ecuación 1. Modelo matemático del análisis de regresión múltiple para el tratamiento fotocatalítico nano/TiO₂ en la disminución de *Escherichia coli* CDBB-B-1011.

$$\text{UFC (E. coli)} = +3.63375 + 1.78042 * \text{pH} + 1.51708 * \text{Aireación} - 1.46208 * \text{Ozono} - 0.33625 * \text{Tiempo} + 0.39125 * \text{Oxálico} + 0.65458 * \text{Fe} + 2.50792 * \text{Inóculo}$$

Fuente: Software Design-Expert® versión 8.0.2.

Anexo 8. Análisis de comparación de medias entre el tratamiento fotocatalítico nano TiO₂ /energía visible y el grupo de tratamientos control.

Análisis de comparación de medias basado en un modelo lineal general (GML), para la determinación de medias con diferencia significativa, a un nivel de confianza del 95% (alfa 0.05).

a. Datos procesados

| Observaciones | Tratamiento | Logaritmo natural Ln (UFC/mL) |
|---------------|-------------|-------------------------------|
| 1 | t1 | 0.00 |
| 2 | t1 | 0.00 |
| 3 | t1 | 0.00 |
| 4 | t2 | 9.03 |
| 5 | t2 | 8.16 |
| 6 | t2 | 8.21 |
| 7 | t3 | 6.90 |
| 8 | t3 | 7.31 |
| 9 | t3 | 8.03 |
| 10 | t4 | 5.34 |
| 11 | t4 | 4.49 |
| 12 | t4 | 3.68 |
| 13 | t5 | 0.00 |
| 14 | t5 | 0.00 |
| 15 | t5 | 0.00 |
| 16 | t6 | 0.00 |
| 17 | t6 | 0.00 |
| 18 | t6 | 0.00 |
| 19 | t7 | 0.00 |
| 20 | t7 | 0.00 |
| 21 | t7 | 0.00 |
| 22 | t8 | 8.69 |
| 23 | t8 | 8.07 |
| 24 | t8 | 9.30 |
| 25 | c1 | 0.00 |
| 26 | c1 | 0.00 |
| 27 | c1 | 0.00 |
| 28 | c2 | 13.78 |

| | | |
|----|----|-------|
| 29 | c2 | 9.74 |
| 30 | c2 | 13.27 |
| 31 | c3 | 0.00 |
| 32 | c3 | 0.00 |
| 33 | c3 | 0.00 |
| 34 | c4 | 9.30 |
| 35 | c4 | 9.47 |
| 36 | c4 | 11.51 |
| 37 | c5 | 5.39 |
| 38 | c5 | 6.88 |
| 39 | c5 | 6.34 |

Sistema de SAS
El procedimiento GLM
Información Nivel Clase
Valores niveles de clase

Tratamientos 13 c1 t7 t6 t5 t4 t3 t2 t1 c5 c4 c3 c2 t8

Número de observaciones Leer 39
Número de observaciones utilizadas 3

Sistema SAS

El procedimiento GML

El modelo lineal general (GML) permite determinar si las medias de dos o más grupos son diferentes. Este modelo puede realizar comparaciones múltiples entre las medias de los niveles de los factores, para hallar diferencias significativas.

Diferencia mínima significativa (LSD)

Tras la realización del análisis de varianza, si este análisis confirma la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, se procede a investigar que medias son distintas. El método de comparación múltiple, es empleado para la comparación de más de dos medias de tratamientos. Esta prueba determina la diferencia mínima significativa (LSD), como el valor mínimo necesario para considerar diferentes dos

tratamientos. El proceso consiste en una prueba de hipótesis por parejas basada en la distribución t (Lara, 2005).

La mínima diferencia significativa (LSD) se expresa como:

$$LSD = t_{\alpha/2; N-1} \sqrt{\hat{S}_R^2 \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

Donde:

- ***ni y nj*** hacen referencia al número de observaciones correspondiente a cada media
- ***N - 1*** a el número de grados de libertad de la varianza residual
- ***Tα / 2; N-1*** al valor crítico de la distribución t con N - 1 grados de libertad que deja una probabilidad a su derecha igual a α/2.

Variable dependiente: UFC

| Fuente | DF | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor F | Pr>F |
|------------------|----|-------------------|------------------|---------|--------|
| Modelo | 12 | 7.729.439.641 | 644.119.970 | 97.88 | <.0001 |
| Error | 26 | 171.100.667 | 0.6580795 | | |
| Corrección total | 38 | 7.900.540.308 | | | |

| R- cuadrado | Coeficiente de variación | Raíz MSE | UFC mediana |
|-------------|--------------------------|----------|-------------|
| 0.978343 | 1.829.928 | 0.811221 | 4.433.077 |

| Fuente | DF | Tipo I SS | Cuadrado medias | Valor F | Pr>F |
|-------------|----|---------------|-----------------|---------|--------|
| Tratamiento | 12 | 7.729.439.641 | 644.119.970 | 97.88 | <.0001 |

Sistema SAS

El procedimiento GML

Pruebas t (LSD) para UFC

NOTA: Esta prueba no controla la tasa de error por experimento.

| | |
|---------------------------------|-------------|
| Alfa | 0.05 |
| Error grados de libertad | 26 |
| Error cuadrático medio | 0.658079 |
| Valor crítico de t | 205.553 |
| Mínima diferencia significativa | 13.615 |

- b. Resultado del análisis de comparación de medias entre el tratamiento fotocatalítico nano TiO₂/energía visible y el grupo de tratamientos control.

Las medias representadas con la misma letra no presentan diferencia significativa. Las Medias representadas con diferente letra, son significativamente diferentes.

| t Agrupamiento | Media | N | Tratamiento |
|----------------|---------|---|-------------|
| A | 12.2633 | 3 | c2 |
| B | 10.0933 | 3 | c4 |
| C | 8.6867 | 3 | t8 |
| C | | | |
| C | 8.4667 | 3 | t2 |
| C | | | |
| D C | 7.4133 | 3 | t3 |
| D | | | |
| D | 6.2033 | 3 | c5 |
| E | 4.5033 | 3 | t4 |
| F | 0.0000 | 3 | t1 |
| F | | | |
| F | 0.0000 | 3 | c3 |
| F | | | |
| F | 0.0000 | 3 | t5 |
| F | | | |
| F | 0.0000 | 3 | t6 |
| F | | | |
| F | 0.0000 | 3 | t7 |
| F | | | |
| F | 0.0000 | 3 | c1 |

Fuente: Programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.1