

**EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA FOTOCATALISIS HETEROGENEA
CON TiO_2 PARA LA INACTIVACION DE *Escherichia coli***

**NAYDU SHIRLEY ROJAS HIGUERA
ANDREA MELISSA SANCHEZ GARIBELLO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL – MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA**

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
CIENCIAS BASICAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL – MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA

EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA FOTOCATALISIS HETEROGENEA
CON TiO_2 PARA LA INACTIVACION DE *Escherichia coli*

NAYDU SHIRLEY ROJAS HIGUERA
ANDREA MELISSA SANCHEZ GARIBELLO

AURA MARINA PEDROZA RODRIGUEZ, Ph.D.
DIRECTOR

ANA KARINA CARRASCAL CAMACHO, Ph.D.
CO-DIRECTOR

JUAN CARLOS SALCEDO, Ph.D.
ASESOR 1

ADRIANA MATIZ, MsC.
ASESOR 2

**EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA FOTOCATALISIS HETEROGENEA
CON TiO_2 PARA LA INACTIVACION DE *Escherichia coli***

**NAYDU SHIRLEY ROJAS HIGUERA
ANDREA MELISSA SANCHEZ GARIBELLO**

Ingrid Schuler, Ph. D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Janeth Arias Palacios, M Sc-M. Ed
Directora de Carreras de Microbiología

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio 1946

**EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA FOTOCATALISIS HETEROGENEA
CON TiO_2 PARA LA INACTIVACION DE *Escherichia coli***

**NAYDU SHIRLEY ROJAS HIGUERA
ANDREA MELISSA SANCHEZ GARIBELLO**

**AURA MARINA PEDROZA R.
Bacterióloga. MsC. Ph.D
Director**

**ANA KARINA CARRASCAL C.
Bacterióloga MsC.
Codirector**

JUAN CARLOS SALCEDO, Ph.D.

ASESOR 1

ADRIANA MATIZ, MsC.

ASESOR 2

Resumen

Se ha encontrado que el tratamiento de aguas residuales a nivel biológico no es lo suficientemente efectivo para la eliminación de microorganismos patógenos, el tratamiento complementario con fotocátalisis heterogénea con dióxido de titanio (TiO_2) se plantea como una opción para la desinfección del agua y su uso para riego agrícola. Se realizó un tratamiento fotocatalítico en muestras del afluente de la planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de Subachoque. Se evaluó el efecto de diferentes parámetros como la temperatura de sinterizado (50, 350, 450, 550 y 650 °C) sobre el fotocatalizador (TiO_2), material del reactor (cuarzo-vidrio pyrex) y fuente de radiación (luz UV 254 nm – luz blanca 350 - 650 nm) para determinar las mejores condiciones para la inactivación de *E.coli* (10^{10} UFC/ml) como microorganismo indicador en agua residual estéril. Posteriormente se realizaron curvas de inactivación utilizando un volumen efectivo de trabajo de 100ml, a 100 rpm durante 12 horas para determinar el tiempo requerido para lograr el 100% de inactivación utilizando agua residual y agua residual estéril. Obteniendo así que laminas con (TiO_2) sinterizadas a 450°C, cuarzo como material del reactor y luz ultravioleta como fuente de radiación lograron la completa inactivación de *E. coli* con una concentración inicial de 10^3 UFC/ml en 15 minutos para el agua residual y 60 minutos para el agua residual estéril, en contraste se llevo a cabo el proceso de fotólisis bajo las mismas condiciones de trabajo en el cual se obtuvo una inactivación total de *E. coli* a los 90 minutos del proceso en agua residual y 360 minutos en agua residual estéril y un control de absorción bajo las mismas condiciones que los ensayos anteriores, sin ninguna fuente de radiación obteniendo así el aumento de la población en un 30% en agua residual y del 86% en agua residual estéril. Adicionalmente se evaluó la inactivación de coliformes y heterótrofos, poblaciones encontradas en el agua residual, bajo estos parámetros obteniendo una inactivación completa a 30 y 60 minutos respectivamente mediante fotocátalisis heterogénea con TiO_2 y 720 minutos para la inactivación completa de coliformes y heterótrofos por fotólisis. Para evaluar la calidad del agua tratada con fotocátalisis heterogénea con TiO_2 se regó *Lactuca sativa* var *Batavia* durante 30 días en condiciones de fotoperiodo, comparando este con el tratamiento biológico, el tratamiento químico por cloración del agua residual (hipoclorito de sodio 200ppm) y un control con agua estéril, obteniendo una concentración de 0 UFC/mL de *E. coli* en las plantas regadas, mientras que en el tratamiento con agua clorada y con agua proveniente del tratamiento biológico se recuperaron células de *E.coli*, a diferencia de la población de coliformes totales que incrementaron su concentración a lo largo de los 30 días de ensayo en los tratamientos con agua clorada y agua tratada biológicamente, estableciendo que la fotocátalisis heterogénea con TiO_2 como tratamiento complementario al tratamiento biológico es la alternativa más adecuada.

1. Introducción

Un número creciente de países alrededor del mundo tienen problemas de distribución y abastecimiento de agua lo cual implica una disminución del recurso para uso humano y agrícola. Muchas fuentes de agua no solo están contaminadas por productos químicos peligrosos, sino también por microorganismos patógenos y, por tanto, deben ser tratadas antes de su uso **(1, 2)**. La aplicación de agua residual tratada para riego de plantas y cultivos se convirtió en una práctica común en todo el mundo, siendo parte de la solución a la escasez del recurso hídrico debido a los grandes volúmenes que se producen mensualmente y porque algunas de ellas son ricas en materia orgánica y nutrientes benéficos para los cultivos **(3)**.

Es así como la principal fuente hídrica de consumo directo y uso agrícola del departamento de Cundinamarca es el río Bogotá. No obstante, este se ve impactado por las descargas de aguas residuales (domiciliarias e industriales) pertenecientes a los municipios aledaños a este, las cuales son recepcionadas en todo el recorrido desde su mismo nacimiento en el municipio de Vaillapinzón, hasta su desembocadura en el río Magdalena, entre los municipios de Girardot y Ricaurte. Por otro lado, municipios como Anolaima, Cachipay, Cogua, El Rosal, Facatativá, Guasca, Madrid, Nemocón, Sibaté y Subachoque, que aunque no son aledaños, realizan vertimiento puntual a algunos ríos que posteriormente se convierten en tributarios del río Bogotá, agudizando la problemática ambiental.

Para el mejoramiento de la calidad del agua en la cuenca alta del río Bogotá se reporta la existencia de 28 plantas de tratamiento de aguas residuales, una de ellas es la planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de Subachoque, es de clase IV, se considera que genera agua apta para uso agrícola y pecuario. No obstante, el tratamiento biológico implementado no es suficiente para eliminar la contaminación biológica. A pesar de su operativa simplicidad, los mecanismos de eliminación de patógenos en las PTAR no está bien establecido y sigue habiendo un riesgo de contaminación de los cultivos y los suelos regados con los efluentes tratados **(4)**. Se ha reportado que pueden encontrarse concentraciones de coliformes totales de 10^3 hasta 10^5 UFC/mL (Acuerdo 43/06 CAR). Estos niveles están por encima de los límites máximos permisibles estipulados por el decreto 1594/84 que determina que las concentraciones de coliformes totales y fecales no deben superar los 5000 NMP/100 mL y 1000 NMP/mL si el agua se emplea para el riego de hortalizas de tallo corto.

Debido a que esta agua es utilizada para el riego de alimentos de consumo directo como hortalizas, representa un riesgo para la salud debido a que puede contener bacterias patógenas como *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* y *Escherichia coli* patógena entre otras **(5)**. *E. coli* no patógena puede ser utilizada como el principal indicador, de la presencia de patógenos bacterianos pues su sensibilidad a los tratamientos convencionales es similar.

El uso de agua de riego contaminada es el principal factor que contribuye a la contaminación de hortalizas por microorganismos causantes de enfermedades en humanos. La lechuga es uno de los principales vectores en la transmisión de enfermedades producidas por microorganismos patógenos como los mencionados anteriormente que poseen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempos

en hortalizas frescas. Algunos de estos microorganismos son también capaces de sobrevivir a procesos de desinfección, e incluso de multiplicarse en el producto durante el almacenamiento **(5)**.

Por esto se llevan a cabo diferentes métodos de desinfección del agua; los métodos tradicionales de desinfección son eficaces contra la mayoría de microorganismos patógenos, pero pueden ser demasiado costosos de implementar en regiones en desarrollo y presentar consecuencias desfavorables por su uso **(2)**. Los agentes de desinfección de uso común tanto en agua de consumo como en agua residual son el cloro y sus compuestos relacionados, tales como el hipoclorito de sodio y de calcio y dióxido de cloro. Sin embargo, en la década de 1970 se encontró que el cloro reacciona con la materia orgánica presente en el agua residual produciendo varios subproductos indeseables como trihalometanos y ácidos haloacéticos de gran atención debido a que se ha encontrado un efecto carcinógeno y/o mutagénico por estos subproductos, además de generar un efecto fitotóxico en las plantas **(1,2,3)**.

Por este motivo se han explorado alternativas que permitan obtener un agua de mejor calidad sin representar un mayor costo para este proceso y riesgo para la salud, una opción sería la utilización de procesos de oxidación avanzada (POAs). Los POAs pueden ser definidos como métodos de oxidación en fase acuosa basados principalmente en la intermediación de radicales hidroxilo OH^* , el radical hidroxilo es una especie oxidante altamente reactivo, potente y no selectivo con un potencial de oxidación de 2,80V. El cual es capaz de oxidar una amplia gama de compuestos orgánicos, incluyendo las moléculas de las paredes celulares y los componentes intracelulares de los microorganismos llevándolos a productos como CO_2 , H_2O y iones inorgánicos **(6)**.

En cuanto a la desinfección de aguas residuales, la fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio (TiO_2) es una tecnología "limpia" y de bajo costo que puede ofrecer ventajas adicionales en una amplia gama de aplicaciones **(7)**. Además ha recibido considerable atención en los últimos años enfatizando en la inactivación de bacterias y en menor medida en la de virus y protozoarios **(6)**. Permitiendo la inactivación de microorganismos patógenos, generando daños oxidativos a nivel de pared y peroxidación de fosfolípidos en membrana a si como de componentes intracelulares causando lesiones en el DNA. Empleando esta tecnología se han encontrado reportes de una disminución de hasta el 91 - 99% de coliformes luego de 60 minutos de irradiación **(8, 9, 10, 11)**.

Mediante esta investigación se busco evaluar la inactivación de *E.coli* a través de la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 empleando agua pre-tratada por sistema biológico a escala de laboratorio.

2. Materiales y métodos

2.2.1 Microorganismo a evaluar

El microorganismo a evaluar como control fue: *Escherichia coli*, ATCC 8739. La bacteria pertenece al cepario de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. La conservación del microorganismo se realizó en glicerol al 30 % (v/v) a -70°C (12). Para determinar la cinética de crecimiento de *E. coli* se realizó una fermentación discontinua en erlenmeyer de 2000mL empleando caldo BHI, con V.E.T de 900 mL y un inóculo del 10 % v/v, la cinética se llevo a cabo por 26 hrs, a 37°C y 150 rpm.

2.2.2 Muestreos y caracterización del agua pre tratada por sistema de lagunaje aeróbico

La muestra de agua se obtuvo de la planta de tratamiento de agua residual del municipio de Subachoque ubicado 35 Km al occidente de la sabana de Bogotá, que cuenta con una temperatura promedio de 13°C una precipitación promedio anual de 890 mms y se encuentra a una altura que oscila entre los 2600 mts sobre el nivel del mar (13).

Respecto a la caracterización inicial se realizaron las pruebas de DBO_5 , DQO (Método 5210B.) (14), sólidos suspendidos totales (Método 2540 D.) (14) sólidos disueltos totales (Método 2540 C.) (14), sólidos sedimentables y sólidos totales, unidades de color, presencia de metales pesados como plomo, cadmio, níquel y cromo (Método 3120B.) (14); materia orgánica, fósforo (Método 4500-P B y E.) (14) y nitrógeno total (14). Los análisis se realizaron en el laboratorio Antek S.A.

Adicionalmente, se realizó un análisis microbiológico utilizando agar Chromocult para detectar presencia de *E. coli* y coliformes (Método 9223) (14), y agar Plate Count para bacterias heterótrofas totales (Método 9215B) (14).

2.2.3 Elaboración de películas de TiO_2 y tratamiento térmico

Como sustrato se emplearon láminas de cuarzo (SiO_2) de (20 x 26 mm) las cuales se lavaron y desengrasaron siguiendo la secuencia agua-etanol-acetona-agua 15 minutos cada una (28). La superficie hidrofóbica del cuarzo se modificó sumergiendo los sustratos en una solución de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ 3:1 por 20 minutos (15), posteriormente se lavaron con agua desionizada y se secaron a temperatura ambiente.

Las películas se crecieron empleando un método de inmersión simple bajo condiciones de acidez, el cual consistió en preparar una solución de TiO_2 USP al 1% p/v en agua destilada y 500 μL de HNO_3 para obtener una pH de 1.3. Los sustratos fueron inmersos en 10 mL de solución de TiO_2 y se dejaron sedimentar por 4 horas a 50°C ; el protocolo se repitió por segunda vez para generar una doble capa de TiO_2 . Se prepararon cinco lotes, los cuales fueron sometidos a temperaturas ascendentes de 50, 350, 450, 550 y 650°C por una hora (16)

2.2.4 Caracterización de la películas de TiO₂ y evaluación de la actividad fotocatalítica biocida sobre *E. coli* ATCC 8739

La superficie y morfología de las películas se observó empleando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6300. Adicionalmente, se realizó un análisis de difracción de rayos X por la técnica de ángulo rasante con un ángulo de incidencia de 1.5 grados, empleando un difractómetro de rayos X Siemens D-500.

La cantidad de TiO₂ adherido al sustrato se expreso como µg de TiO₂/mg de cuarzo y se calculo por la diferencia de pesos entre el sustrato antes y después del crecimiento con TiO₂.

La actividad fotocatalítica se determinó usando agua de la PTAR de Subachoque previamente esterilizada por 2 ciclos en autoclave (116.9°C a 15 libras de presión por 15 minutos), a la cual se le reinoculo una suspensión de *E. coli* ATCC 8739 con una concentración de 1×10^{10} UFC/mL; de esta suspensión se coloco una alícuota de 10 mL en cajas de petri sin tapa y una película de TiO₂. La solución se dejo estabilizar por 30 minutos en oscuridad y posteriormente se irradió con dos lámparas de UV de 254 nm por seis horas. Al finalizar el tratamiento fotocatalítico se tomo una submuestra para medir pH y determinar la viabilidad final, realizando diluciones decimales y siembra en superficie de 20 µL de muestra en agar Luria Bertani (17). Las cajas se incubaron por 12 horas a temperatura ambiente y se realizaron los recuentos expresando el promedio como log 10 de UFC/ml con una desviación estándar menor del 20%. Para seleccionar cual de las temperaturas de sinterizado tenía un efecto sobre la inactivación de *E. coli* se tuvo en cuenta la difracción de rayos X, porcentaje de inactivación celular y la adherencia del TiO₂ al sustrato.

2.2.5 Efecto del material del reactor y la fuente de radiación sobre la actividad fotocatalítica biocida

Se realizo por medio de un diseño experimental 2², donde el factor X₁ fue el material de reactor y X₂ la fuente de radiación. Cada factor tuvo dos niveles codificados como +1 y -1. El diseño genero un total de 4 tratamientos. El montaje se realizo en reactores de 200 mL construidos en los materiales a evaluar los cuales fueron vidrio pyrex y cuarzo (Factor X₁), dentro de los cuales se colocaron 4 películas de TiO₂ (20 x 26 mm) sinterizadas a 450 °C por 1 hora. El V.E.T fue de 100 mL y el inoculo ajustado a una concentración inicial de 10¹⁰ UFC/mL. Se utilizaron dos lámparas de UV de 254 nm de 15 watts y dos lámparas de luz blanca (SODIS) de 350 - 650 nm de 17 watts (Factor X₂) colocadas lateralmente a una distancia de 3 cm con respecto al reactor, el cual se mantuvo a 100 rpm a temperatura ambiente por 6 horas. El procedimiento se realizo por triplicado.

Adicionalmente se realizo un barrido UV/VIS con un equipo de espectroscopia óptica para determinar el espectro de emisión de las lámparas utilizadas como fuente de radiación y de absorción del material utilizado como reactor.

El protocolo para valorar inactivación se realizó de la misma forma que en el numeral 2.2.4. La variable de respuesta fue el porcentaje de inactivación de *E. coli*. Cada tratamiento se realizo por triplicado (Tabla 1).

El análisis de datos se realizó usando los programas SAS 9.0 para Windows y Desing Expert 6.0; los resultados fueron tratados con un modelo empírico el cual relaciona las respuestas cuantificadas con los factores evaluados y sus respectivos niveles. Para un diseño de dos factores el modelo de primer orden utilizado fue:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Donde y , corresponde a la variable dependiente; b_0 es el intercepto, b_1 , b_2 , son los coeficientes lineales y X_1 X_2 son los factores ó variables independientes

2.2.6 Curvas de inactivación

Una vez seleccionado el mejor material para el reactor y la mejor fuente de radiación, se realizaron las curvas de inactivación fotocatalítica con sus respectivos controles (Tabla 2.), empleando un reactor de 200 mL operado al 50% de su capacidad, se colocaron 4 películas con $284 \pm 0.05 \mu\text{gTiO}_2/\text{mg SiO}_2$ y se mantuvo una agitación constante de 100 rpm. El proceso se evaluó por 12 horas realizando muestreos cada 15 min durante las primeras 2 horas y posteriormente cada dos horas hasta completar el tiempo de retención. Las variables dependientes fueron pH y log 10 UFC/mL. Cada cinética se realizó por triplicado y los resultados de las figuras corresponden al promedio de los datos con una desviación estándar menor al 30%.

2.2.7 Evaluación de la presencia de *E. coli* en *Lactuca sativa* var. *Batavia*

Se obtuvieron 80 plantas de *Lactuca sativa* var. *Batavia* del Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales (CIAA) con cuatro semanas de desarrollo y 5 hojas verdaderas, se realizó un análisis microbiológico para determinar la carga y presencia de microorganismos en la zona aérea, radicular y suelo en agar Cromocult (Método 9223) **(14)** y Plate Count (Método 9215B) **(14)**.

Se llevaron a cabo cuatro tratamientos con seis repeticiones cada uno, el primer tratamiento consistió en el riego de un grupo de 18 plántulas de *L. sativa* var *Batavia* con agua tratada con fotocatalisis heterogénea con 4 películas de TiO_2 ($284 \pm 0.08 \mu\text{gTiO}_2/\text{mg SiO}_2$) sinterizadas a 450°C por una hora irradiadas con lámparas UV (254 nm) en un reactor de cuarzo bajo las condiciones del numeral 2.2.6 por 30 minutos, el segundo tratamiento se realizó con agua estéril (116.9°C a 15 libras de presión por 15 minutos), el tercero con agua de la PTAR o tratamiento biológico que consiste en un pre-tratamiento (rejillas de cribado), tratamiento primario (desarenadores y trampa de grasas) y lagunas biológicas (aerobia, facultativa primaria y facultativa secundaria) y el cuarto con agua de la PTAR tratada con cloro tratada en reactores de vidrio de 1000ml que contenían 548,13 ml de agua residual de la PTAR y 1,87 ml de hipoclorito de sodio (200 ppm) **(18)**. Las plántulas se trasplantaron en vasos de icopor, se utilizó 30 g de suelo abonado estéril como sustrato, se mantuvieron bajo condiciones de fotoperíodo (12 horas sin luz y 12 horas con lámparas de luz blanca simuladora de radiación solar) El riego se realizó 1 vez al día, adicionando 4 mL a cada uno.

Después de un mes de tratamiento, se recolectaron las hojas de las plantas de cada tratamiento, se pesaron para garantizar la misma cantidad de muestra en cada replica de cada tratamiento, y posteriormente en agua peptonada al 0.1% se realizaron diluciones para llevar a cabo recuento en placa en agar Cromocult y así determinar la concentración de *E. coli* y coliformes en cada uno de los tratamientos. Adicionalmente, se realizó recuento en placa a partir del material de propagación de *L. sativa var Batavia* para determinar la concentración de *E. coli*, así como de las raíces. Se realizó una comparación de medias entre tratamientos a los 30 días de regadío tomando como variable dependiente las unidades formadoras de colonia y se utilizó el programa SAS 9.0 para Windows

3. Resultados y Discusión

3.1 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 8739 en caldo BHI

En la figura 1 se observa la cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 8739, observando que el microorganismo estuvo en fase de adaptación hasta los 45 minutos, posteriormente entro en fase exponencial hasta la hora 6, fase estacionaria hasta la hora 17 y finalmente una disminución en la concentración de células asociada con la fase de muerte. Durante la fase estacionaria se observo una disminución de la concentración de células entre las horas 6 y 10, esta fase en *E. coli* se denomina como una fase de transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria, debida a diferentes factores como la acidificación del medio, disponibilidad de nutrientes, así como otros mecanismos más sofisticados de comunicación intercelular que contribuyen a regular la división celular y por lo tanto la densidad de células en el cultivo **(19)**. En este estudio la adaptación a uno de los sustratos que contiene el medio BHI pudo ser la explicación a este descenso de células, debido a que al encontrar dos sustratos el microorganismos utiliza primero el de más fácil degradación que en este caso sería la glucosa, y posteriormente habría un tiempo de adaptación al siguiente sustrato. Respecto al pH, se observa una leve disminución de este a partir de la fase exponencial que estaría relacionado con la producción de ácidos a partir de la degradación metabólica de la glucosa como fuente de carbono.

Se caracterizo el crecimiento de *E. coli* ATCC 8739 con el fin de conocer el tiempo requerido para que *E. coli* se encuentre en el final de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria, porque es en este rango donde se presenta la mayor cantidad de células viables **(20)** y para determinar el tiempo requerido para obtener la concentración necesaria para los inóculos de las cinéticas de inactivación que se realizaron en agua estéril.

3.2 Caracterización del agua residual

Los lotes de agua residual fueron obtenidos a la entrada y salida del tratamiento biológico (laguna aerobia, laguna facultativa primaria y laguna facultativa secundaria) aplicado en la PTAR, para la realización de un tratamiento complementario por medio de fotocatalisis heterogénea con TiO₂ y demostrar la baja eficiencia del sistema biológico con respecto a la remoción de *E. coli* y coliformes totales. Cada lote se caracterizo química, física y microbiológicamente (Tabla 3).

De acuerdo con los resultados de la caracterización del afluente de la PTAR, se evidencio una disminución en la concentración de materia orgánica (48-75%), DBO₅ (38-62%), DQO (48-75%), sólidos suspendidos totales (31-79%) y sólidos sedimentables (100%), debido a que el tratamiento de aguas residuales en lagunas promueve interacciones naturales, físicas y bioquímicas en los sistemas acuáticos para disminuir, la demanda química de oxígeno (DQO), amoníaco, nitratos, sólidos suspendidos y los fosfatos **(4)**. Estos resultados demuestran que la PTAR no alcanza remociones iguales o superiores al 80%, porcentaje para el cual fue diseñada. **(22)**.

Para la cuenca alta del río Bogotá el valor máximo permitido de DBO₅ es de 50 mg/L, sólidos suspendidos totales 40 mg/L y coliformes totales 20000 NMP/100mL, de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 3) para cada lote evaluado estos parámetros se encuentran por encima de estos valores permitidos, lo anterior podría deberse a la relación DBO₅/DQO del agua de entrada (0.44), la cual indicaría que habría una menor eficiencia del tratamiento por vía biológica que es el que se aplica en la planta de tratamiento y habría que buscar alternativas diferentes.

En cuanto al comportamiento de los metales pesados, se obtuvieron concentraciones por debajo de los límites exigidos en el acuerdo 43 del 2006 de la CAR agua clase IV. Estos valores no son representativos para la calidad del agua y no demostraron un efecto en los procesos de fotocatalisis heterogénea.

Respecto a la eficiencia del tratamiento biológico en la remoción de microorganismos se encontraron altas concentraciones de coliformes (14×10^1 - 10×10^5 UFC/mL), *E. coli* (40×10^2 - 10 UFC/mL) y heterótrofos (21×10^2 - 37×10^{12} UFC/mL) lo cual nos indica que el sistema no asegura la calidad del agua a nivel microbiológico. La eliminación de algunos microorganismos como *E. coli*, coliformes totales y enterococos, en tratamientos biológicos es muy variable debido a que depende de factores muy variables como la temperatura, la tasa de foto-oxidación y el tiempo de retención **(23)**.

La baja eliminación de bacterias puede deberse en parte al tiempo de retención que es relativamente corto y por una mayor resistencia a los mecanismos de foto-oxidación, las bacterias poseen mecanismos de protección y recuperación para superar el estrés oxidativo que involucran proteínas endógenas así como enzimas antioxidantes o enzimas reparadoras del DNA. Se encuentra la presencia de enzimas así como la FE-SOD (SOD: superóxido dismutasa), Mn-SOD y la catalasa que protegen la célula de daños oxidativos mediante reacciones catalíticas que impiden la acumulación de O₂ y H₂O₂, o enzimas exonucleasas y DNA glicosilasa las cuales son capaces de reparar las lesiones del DNA resultante de daños oxidativos **(24 – 27)**.

3.3 Elaboración de películas de TiO₂ y tratamiento térmico

La aplicación de H₂O₂/H₂SO₄ al sustrato permite la modificación de su superficie, el cual se carga negativamente permitiendo que haya una atracción entre la solución

de TiO_2 que está cargada positivamente bajo condiciones de acidez logradas por la adición de HNO_3 debido a su carácter anfotérico **(28)**.

Se obtuvieron concentraciones TiO_2 en un rango de 30.62– 94.41 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg SiO}_2$ inicialmente que se observan en la Tabla 4, la variabilidad de la deposición del semiconductor pudo estar relacionada principalmente con la técnica empleada para el crecimiento de las películas, debido a que en la sedimentación simple no se pueden controlar variables como velocidad de deposición y grosor, otro factor pudo ser los diferentes tratamientos térmicos realizados a las laminas, debido a que se observó que tanto a bajas como a altas temperaturas se registro desprendimiento antes de someter cada película de. Luego de este proceso se encontró que la temperatura a la que menos se evidencio desprendimiento del material posterior al proceso de fotocatalisis fue a 450°C a diferencias de los otros tratamientos. Este comportamiento se atribuye a diferentes factores que involucran la modificación de la superficie del sustrato y el proceso de sinterizado.

3.3.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microestructura obtenida por la deposición del TiO_2 (Fig. 2) evidencio que al aumentar la temperatura, la uniformidad y compactación en la superficie mejoraron sustancialmente, esto es explicado por el favorecimiento de la movilidad de los átomos en la superficie incrementando conformaciones activas energéticamente, incorporando y ajustando sus posiciones en la red del TiO_2 **(29)**, esta uniformidad en la película se observo a 450°C y 350°C . Por el contrario a temperaturas de 50, 550 y 650°C se observo una superficie irregular, posiblemente por el tamaño variable de los granos (Fig. 2. A, D, E) y una fragmentación de las películas. Se encontraron tamaños de partículas con un promedio de 266 nm ($\pm 0,067$) para 50°C , para 350°C 218 nm ($\pm 0,074$), para 450°C 210 nm ($\pm 0,061$), 550°C 0,257 nm ($\pm 0,090$) y para 650°C 284 nm ($\pm 0,089$)

3.3.2 Difracción de Rayos X

Se obtuvieron diferentes patrones de difracción que corresponden al efecto que tiene el haz de rayos X cuando incide sobre la película de titanio, parte de los rayos atraviesan y parte con dispersados por los e^- de los átomos del cristal. Solo electrones salen en fase y sus ondas se refuerzan dan lugar a un haz de rayos X difractados. El conjunto de haces difractados por un cristal constituye su patrón de difracción. Se conoce que el dióxido de titanio tiene cuatro fases: anatasa, rutilo, brokita y sferaquita, las dos primeras son las más frecuentes y tiene orientaciones diferentes que han sido ampliamente caracterizadas **(50)**.

Los resultados del análisis (Figura 3) mostraron que a 50°C no se encontraron picos asociados a procesos de cristalización de la fase rutilo, solamente anatasa con orientaciones 101 y 004, que se encuentran igualmente a 350, 450 y 550°C , lo cual concuerda con lo reportado por Ben *et al*, **(29)** se ha encontrado que a temperaturas por debajo de 500°C se encuentra preferencialmente la fase anatasa, a medida que la temperatura aumenta las intensidad de los picos de anatasa se incrementa lo que implica una mejora de la cristalinidad **(29)**, a partir de los 350°C se encontró la

presencia de la fase rutilo con orientaciones 110 y 101, al igual que a 450, 550 y 650°C, por otro lado a 650°C solamente se encontró la orientación 211 correspondiente a anatasa lo cual, indica que a temperaturas superiores a 650°C la fase anatasa empieza una transformación total a la fase rutilo, como ha sido reportado en la investigación de Mardare (49), por otro lado se encontraron intensidades muy bajas de Silicio predominando las orientaciones 120, 300 y 111 en los 5 tratamientos térmicos.

3.3.3 Espectrometría de dispersión de energía por rayos X (EDX)

Usando la técnica (EDX) para estudiar la estequiometría de las películas de TiO₂ (Figura 4.) se encontró presencia de titanio y oxígeno que son los componentes específicos del dióxido de titanio, por otro lado se detectó silicio el cual hace parte del sustrato sobre el cual se crecen las películas. Se detectaron elementos como Aluminio, Fluor y Carbono los cuales podrían ser contaminantes durante la elaboración de las láminas.

3.4 Evaluación de la Inactivación de *E. coli*

La aplicación del TiO₂ como semiconductor es principalmente determinada por sus propiedades fisicoquímicas, siendo las más importantes la estructura cristalina, el tamaño de partícula, el área específica de superficie, la porosidad, la estabilidad térmica y la adhesión al sustrato (30). Los ensayos se realizaron a diferentes temperaturas de sinterizado para determinar la forma en que esta variable altera dichas propiedades y a su vez estas como afectan el proceso de fotocatalisis en cuanto a su potencia biocida o desinfectante.

Al evaluar el efecto de las películas sinterizadas a diferentes temperaturas sobre la inactivación de una concentración conocida de *E. coli* se presentaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$), que demuestran que a 450° C y 550° C se obtuvieron los porcentajes más altos de inactivación (71 y 68%). Adicionalmente, entre estos dos tratamientos no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.0001$). Por otro lado, La temperatura de sinterizado que menor respuesta tuvo fue 650° C con 32% de inactivación a las 6 horas de evaluación.

Debido a que entre los tratamientos a 450 y 550°C no se encontró una diferencia estadísticamente significativa se tuvo en cuenta la adherencia del TiO₂ al sustrato después del proceso de inactivación, encontrándose que a 550°C se presentó un desprendimiento del 51.3%, a diferencia de 450°C en donde solo el 3.9% del TiO₂ se desprendió (Tabla 4). Por consiguiente, se determinó que el proceso de sinterizado se debe llevar a 450°C debido al % de inactivación sobre *E. coli* y la adherencia del TiO₂ al sustrato (Figura 5.).

Los resultados obtenidos indican que a 450 °C se obtuvo un alto porcentaje de inactivación, como se reporta en diferentes estudios fotocatalíticos debido a que la fase anatasa es más fotoactiva, mientras que la fase rutilo tiene actividad fotocatalítica mas baja, esto debido a que la alta cristalinidad de anatasa le confiere

pocos defectos en cuanto a la recombinación de los electrones y huecos fotogenerados. Así mismo, la fase anatasa es termodinámicamente estable, aunque a altas temperaturas se transforma en rutilo (30) lo cual explica que a 650 °C el porcentaje de inactivación haya sido muy bajo, debido a que la transformación de la fase cristalina produce una disminución considerable en el área específica de superficie de los cristales de TiO₂ (30).

Sin embargo, dentro de los tratamientos térmicos realizados no se busca que solo que se obtenga un tipo de fase cristalina. Los resultados en otros ensayos indican que la coexistencia de partículas de TiO₂ con diferentes estructuras cristalinas en agregación dan lugar al aumento de su rendimiento cuántico y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno, y por ende una mejor actividad biocida fotocatalítica. Se sugiere que ambas clases de TiO₂ con sus partículas en diferentes fases cristalinas (anatasa: (011), (110); rutilo: (001), (011)) tienen respectivamente funciones oxidativas y reductoras, y que las partículas tipo rutilo son menos efectivas para la reducción de las moléculas de O₂ y más activas para oxidar moléculas de H₂O, a diferencia de la fase anatasa (30). De acuerdo a la difracción de rayos X, se observó la presencia de las fases anatasa y rutilo cuando se utilizaron temperaturas de sinterizado de 350, 450 y 550°C y en general el porcentaje de inactivación fue mejor a diferencia de 50°C donde solo se encontró anatasa y a 650°C donde solo se encontró rutilo, debido a que, cuando se encuentran las dos fases las partículas de TiO₂ tienen diferentes tasas de oxidación de moléculas de H₂O debido al donador de electrones (tasa de transferencia de electrones de H₂O al hueco foto-generado en el TiO₂ en la superficie) y reducción del oxígeno molecular como aceptor de electrones (tasa de transferencia de electrones de la superficie del TiO₂ al molecular O₂ molecular) en este sistema, y que el rendimiento cuántico para la generación de ROS (especies reactivas del oxígeno) de cada tipo se registrará por la reacción limitada (anatasa: oxidación limitada; rutilo: reducción limitada) para mantener la electro-neutralidad cuando solo exista cualquiera de las dos fases (anatasa o rutilo) (30).

3.5 Diseño factorial 2²

De acuerdo con los resultados de la prueba ANOVA la interacción del factor X₁ y X₂ no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de inactivación de *E. coli* (p=0.27). Sin embargo, el factor X₁ (material del reactor) en su nivel alto (cuarzo) sí tuvo un efecto significativo sobre la variable dependiente (p=0.0288). Adicionalmente, el factor X₂ (fuente de radiación) en su nivel alto (Luz UV 254 nm) también tuvo un efecto altamente significativo sobre el porcentaje de inactivación (p<0.0001). A partir de los resultados la ecuación que describe el modelo fue: (Figura 6.)

$$\text{Inactivación}(\%) = +48 + 5.5x_1 - 29x_2 - 2.4x_1x_2 \quad (2)$$

Respecto a los µg de TiO₂/ mg de sustrato se encontraron valores de 28.33 para el tratamiento de vidrio pyrex-luz UV, 28,94 para cuarzo-UV, 29.40 para vidrio pyrex-luz blanca y para cuarzo-luz blanca 27.99, resultados que no demostraron diferencias significativas entre tratamientos (p>0.0001) por lo tanto cualquier tipo de material y

fuentes de radiación podrían ser utilizados, determinando que los mejores niveles son luz ultravioleta y vidrio de cuarzo.

En los tratamientos se encontraron porcentajes de inactivación de 86% y 70% para los tratamientos luz UV/ cuarzo y UV/vidrio pyrex, a diferencia de los tratamientos con luz blanca/cuarzo y luz blanca/vidrio pyrex en donde se encontraron valores de 22% y 15% respectivamente.

La razón por la cual se obtuvo la mejor respuesta con luz UV 254 nm y cuarzo se relacionan con las características físicas y químicas de los factores. La lámpara de UV es policromática, como se obtuvo en el barrido UV/VIS (Figura 7a) presenta un pico de máxima emisión a 254 nm y una serie de picos cercanos al rango visible, de acuerdo con esto el pico de emisión a 254 nm sería el responsable de participar activamente en la inactivación de *E. coli* ya que su energía es 4.88 eV valor que supera la energía de la banda prohibida del titanio (3.2 eV en la fase cristalina anatasa) (31) determinando que los fotones promuevan la formación de los pares electro hueco y así la generación de especies reactivas del oxígeno. Por el contrario la lámpara de luz blanca tiene un rango de emisión entre 350 y 650 nm (Fig.5b) dentro del rango visible, con un máximo de emisión a 437 nm equivalente a 2,83 eV, energía más baja que la correspondiente a la banda prohibida del TiO_2 , impidiendo de esta manera que los electrones pasen a la banda de conducción y se produzcan los pares electrón-hueco y se generen las reacciones de oxidación-reducción (Figura 7b.)

Respecto al material del reactor, se sabe que el cuarzo posee una buena transmisión óptica de los rayos ultravioleta (32) debido a que permite una influencia directa de la radiación UV sobre el catalizador y producir así las reacciones de generación de los pares electrón-hueco, de acuerdo al barrido de absorción UV/VIS se pudo observar que este material transmite longitudes de onda entre 240-450 nm (Figura 7c.) lo cual permite que la longitud de onda emitida por la lámpara de luz UV pueda ser transmitida al interior del reactor para que la energía pueda ser absorbida por el semiconductor. En contraste el vidrio pyrex absorbe longitudes de onda por debajo de 300 nm (Figura 7c.), debido a la transferencia de cargas y las bandas de absorción s-p por las trazas de impureza de iones metálicos así como Fe^{3+} / Fe^{2+} , Pb^{2+} (51) por lo tanto impide el paso de la radiación características de la lámpara de UV, la cual genera la mayor fotoactivación del material.

3.6 Cinéticas de inactivación

3.6.1 Inactivación fotocatalítica de *E. coli* en agua residual y agua residual estéril

Para determinar el comportamiento de *E. coli* en presencia de diferentes poblaciones microbianas (agua residual pre tratada por sistema biológico) durante el proceso fotocatalítico se realizaron dos cinéticas de letalidad y un control de absorción (Figura 8). Se observó que el proceso fotocatalítico inactivó las células de *E. coli* en un 100% a los 15 minutos concordando con estudios previos (8, 11).

Por otro lado, cuando el agua residual fue esterilizada y re inoculada con *E. coli* para evaluar el comportamiento del microorganismo indicador en ausencia de otras poblaciones, fue necesario 1 hora para obtener una inactivación del 100% **(32)**.

En la inactivación por fotocátalisis se ha encontrado que durante los primeros 10 a 15 minutos se produce un período de inducción, donde las especies reactivas del oxígeno comienzan a atacar la membrana, pero no lo suficiente para causar daños graves, posteriormente la membrana bacteriana es poco a poco oxidada, aunque en este proceso el microorganismo intenta resistir el ataque oxidativo con la producción de enzimas que contrarresten la presencia de peróxido y otras sustancias, durante este proceso se da la formación de α y β aldehídos insaturados durante el rompimiento de hidropéroxidos o endopéroxidos y la aparición de puentes de C-O durante la formación de grupos carboxy, también se presentan cambios importantes en el perfil de las bandas PO_2 y formación de bandas de amida I que varían en función de la radiación **(52)**, y finalmente los ataques repetidos de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la membrana de *E. coli* pueden resultar en una perforación que acelera el proceso de inactivación bacteriana **(33)**. Este comportamiento concuerda con lo obtenido en el tratamiento con fotocátalisis heterogénea realizado tanto en agua residual estéril como en agua residual tratada por sistema biológico, la diferencia en cuanto al tiempo de inactivación, 60 y 15 minutos respectivamente, podría deberse a la formación de subproductos, tales como ácidos, y por la presencia de otras poblaciones en el agua, las cuales compiten por nutrientes con *E. coli* **(34, 35)**

.Por otra parte, el proceso de fotocátalisis demostró ser más efectivo que el proceso de fotólisis debido a que en el primero se producen especies reactivas de oxígeno como radical hidroxilo (OH^*), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-) y radical hidropéroxido (HO_2^*) que son los responsables de provocar peroxidación de lípidos, proteínas y polisacáridos de la membrana bacteriana produciendo un daño irreversible en la célula y oxidando compuestos intracelulares como el ADN y RNA impidiendo procesos como respiración, metabolismo y reproducción **(39 - 41)** mientras que en el proceso de fotólisis se producen algunos radicales que se generan durante el proceso fotocatalítico como pero en menor rendimiento y poder oxidante.

Así mismo, factores como la alta concentración de materia orgánica, nitrógeno, y fósforo en el agua residual, podrían ser responsables de la reducción de la inactivación en el proceso de fotocátalisis, como sugieren estudios **(36, 37)** los compuestos orgánicos compiten con las bacterias por las especies reactivas del oxígeno, y algunos aniones también podrían inhibir el proceso de inactivación fotocatalítica debido a que se absorben al catalizador al igual que ciertos iones inorgánicos, debido a que la concentración de materia orgánica, nitrógeno, y fósforo.

En cuanto al tratamiento con radiación UV se obtuvieron porcentajes de inactivación de *E. coli* del 100% en agua esterilizada a las 8 horas de irradiación y a la hora y 30 minutos en agua sin esterilizar, debido a que el proceso de fotólisis promueve la generación de especies oxidativas como el radical hidroxilo (OH), radical hidropéroxido (HO_2) y el radical anión superóxido (O_2^-), que provocan un daño oxidativo a nivel de la membrana bacteriana y en el DNA alterando las bases nitrogenadas generando dímeros y trímeros, sin embargo la diferencia entre los dos

tratamientos con respecto al tiempo de inactivación se puede explicar porque al igual que en fotocatalisis en el agua residual estéril no se encontraban otras poblaciones que pudieran competir con *E. coli*, y por otro lado se produjeron mecanismos de defensa inducidos por la luz UV en la célula que se activan bajo condiciones de estrés que incluyen choque térmico, oxidación, hiperosmolaridad, acidificación y escasez de nutrientes los cuales disminuyen el efecto parcialmente durante el primer paso del fototratamiento **(38)**.

El comportamiento del pH durante los tratamientos de fotocatalisis y fotolisis en los dos tipos de agua mostró un leve aumento que se mantuvo entre un rango de 7 a 8 lo cual puede estar asociado con los cambios de la carga de la superficie del fotocatalizador, hidrofobicidad, carga neta del contaminante, los cambios en sus modos de adsorción, y la cantidad producida de HO^* . Esto puede conducir a una modificación de la velocidad global. La interacción de los donantes y aceptores de electrones con los semiconductores de óxido metálico se determina, en parte, por la química de la superficie **(42)**. Debido a que la carga superficial de las células de *E. coli* es negativa, y las partículas de TiO_2 tienen un punto isoeléctrico alrededor de 6.3, se espera que a pH alcalino haya una repulsión electrostática entre la superficie del TiO_2 y la bacteria. Sin embargo se ha encontrado que el pH no es un factor fundamental en la inactivación de *E. coli*, presentándose el mismo efecto biocida en pH de 5 a 8 por igual **(43)**.

De acuerdo con el control de absorción se observó que durante los primeros 30 minutos en agua residual se presentó una disminución parcial de las células, posteriormente a este tiempo se encontró un aumento y estabilidad de la concentración de *E. coli*. El control en oscuridad se comporta como una cinética de crecimiento en agua residual, debido a que por un lado no hay fuente de radiación, ya sea luz blanca o luz UV, que pueda causar daños en la célula, la absorción de las células en la superficie de la película de TiO_2 es despreciable en este caso, donde ya se demostró que no es significativa.

3.6.2. Inactivación de coliformes totales y heterótrofos en agua residual

Debido a que en el agua residual se encuentran diferentes tipos de poblaciones microbianas se obtuvieron diferentes tiempos de inactivación fotocatalítica para cada grupo, en la figura 8c. se observa que la inactivación del 100% de la población de coliformes se llevó a cabo a los 30 minutos, en otras investigaciones se observa que luego de 30 y 60 min **(11)** se obtuvo un porcentaje de inactivación de 96 y 99% respectivamente mientras que los heterótrofos necesitaron 60 minutos para su inactivación total.

Durante el proceso fotolítico se encontró una disminución del 15 % de la población de coliformes después de 30 minutos de irradiación con luz UV, muy similar a otros trabajos **(11)** en el cual se observó una inactivación del 27%. La inactivación de la población total de coliformes por fotolisis se llevó a cabo en 720 minutos, al igual que para bacterias heterótrofa, ya que aunque la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas es relativamente más compleja, que las bacterias Gram negativas, las bacterias Gram negativas responden mejor para la inactivación fotocatalítica **(44)**, la destrucción de la pared celular no es necesaria para la inactivación, además dentro de la población de heterótrofos se pueden encontrar

bacterias que presentan cápsula, y esta es viscosa y actúa como una capa protectora para la pared celular, y microorganismo productores de esporas resistentes a diferentes procesos de desinfección como heterótrofos aeróbicos (*Bacillus* y *Sporosarcina* spp) (45).

3.7 Evaluación de la presencia de *E. coli* en *Lactuca sativa* var. *Batavia*

De acuerdo con el análisis estadístico se presentaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) (Tabla 5).

Después de 30 días de regadío, no se encontró la presencia de este microorganismo en las plantas que fueron regadas con agua tratada por fotocatalisis heterogénea, lo cual indica que esta tecnología es una buena alternativa para la eliminación total de este microorganismo indicador. Por otro lado, en las plantas regadas con agua tratada con hipoclorito se lograron recuperar células de *E. coli* en la zona aérea, suelo y zona radicular con recuentos de 3×10^1 UFC/ml, 2×10^1 UFC/ml, y 2×10^1 UFC/ml respectivamente. En el tratamiento biológico se encontraron recuentos de *E. coli* de 13 UFC/ml en hojas, 39 UFC/ml en suelo y 5 UFC/ml en raíz.

En cuanto al comportamiento de los coliformes totales en los mismos tratamientos nuevamente se observó que la fotocatalisis heterogénea fue significativamente mejor que la desinfección química con cloro y el tratamiento biológico ($P < 0.0001$). Sin embargo en las plantas regadas con agua tratada por fotocatalisis después de 30 días de regadío se recuperaron colonias en los tres sitios analizados, lo cual está relacionado con la carga inicial de *Lactuca sativa*, ya que al iniciar el ensayo de regadío las hojas, suelo y raíz tenían una población de 28×10^3 , 21×10^4 y 15×10^5 UFC/ml respectivamente, las cuales aumentaron durante el experimento de 30 días pero no hacen parte de una población sobreviviente del tratamiento fotocatalítico.

Por otro lado al analizar los resultados de la desinfección química se demostró que al finalizar los 30 días de evaluación los recuentos fueron de 54, 88 y 63 UFC/ml, valores más elevados que los obtenidos en las plantas regadas con agua tratada por fotocatalisis, demostrando nuevamente que la desinfección química con hipoclorito no es un método 100% eficiente para el pos tratamiento del agua, ya que la población residual junto con la que venía en la planta generó un incremento al final de la prueba.

La cloración como tratamiento complementario no sería una buena alternativa debido a que se demostró la presencia de *E. coli* luego de su uso posiblemente debido a que en el lote tres de agua residual se encontraron altas cargas de materia orgánica y otros compuestos orgánicos como inorgánicos que pueden disminuir el efecto de la cloración; de acuerdo a las condiciones en las que sale el agua de la PTAR, otra razón por la cual el cloro es menos efectivo en comparación con la fotocatalisis es por las características de los productos formados que se dan a través de las reacciones en la solución, ya que los radicales hidroxilos formados por el proceso de fotoexcitación de TiO_2 tiene un potencial redox más alto que la de los productos de la cloración.

Otro factor que influye en la cloración es el pH, ya que su actividad está limitada a este, a valores ácido de pH el cloro tiene a presentar mayor actividad antimicrobiana mientras que a pH alcalinos la mayor actividad del cloro se centra en la oxidación de

sustancia químicas, debido a que el agua residual de la PTAR presenta un pH relativamente neutro este podría ser un factor para la poca actividad del cloro **(46)**. Por otro lado en el proceso de cloración se pueden producir subproductos carcinogénicos como los trihalometanos (THM) **(47)**.

No obstante el tratamiento biológico por si solo definitivamente no es una tecnología apropiada para la remoción de coliformes totales ya que al finalizar los 30 días de ensayo las poblaciones estaban en 13×10^3 , 59×10^4 y 54×10^3 UFC/ml en hojas, suelo y raíces respectivamente, siendo los valores más altos del ensayo. Esta mayor concentración de coliformes en el ensayo con plantas regadas con agua residual concuerda con investigaciones realizada en municipios aledaños a Bogotá donde *L. sativa* var *Batavia* es regada con este mismo tipo de agua residual donde se encontró un rango de 1×10^1 – 1×10^4 UFC/mL coliformes totales **(48)**.

Es importante determinar la presencia de microorganismos en alimentos de producción agrícola, debido a que estos se consumen sin haber recibido un tratamiento de conservación previo y este fenómeno se ocasiona por mala prácticas agrícolas, por procesos inadecuados de manipulación de herramientas y por riego de estas con agua residuales de baja calidad para este uso.

4. Conclusiones

Las mejores condiciones de operación para el proceso de fotocatalisis heterogénea, es el crecimiento de películas de TiO_2 con un procesos de sinterizado a 450°C , una fuente de radiación de Luz UV (254 nm) y un reactor construido en cuarzo logrando así un 100% de inactivación de *E. coli*, coliformes y microorganismos heterótrofos presentes en el agua residual que es utilizada para riego agrícola de hortalizas como lechuga,.

El proceso de fotocatalisis heterogénea con películas de TiO_2 elaboradas por sedimentación simple bajo condiciones de acidez, es superior que la desinfección química y tratamiento biológico para la inactivación de *Escherichia coli* y coliformes totales, aplicándolo como pos tratamiento al sistema de lagunaje logrando una inactivación total en 15 y 30 minutos de exposición al proceso respectivamente.

Agradecimientos

A la doctora Aura Marina Pedroza por su motivación, colaboración y enseñanza en el desarrollo y acompañamiento de esta investigación.

Este trabajo de grado pertenece al proyecto No 3404. financiado por la Oficina de fomento a la investigación de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

Los autores agradecen al Departamento de Física del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México D.F. México.

Referencias

- (1) Angelakis, A., Marecos, M., Bontoux, L. y Asano, T. The status of wastewater reuse practice in the mediterranean basin: need for guidelines. *Water Research* 1999; 38, 2939-2947.
- (2) Gelover, L.A. Gomez, K. Reyes, M.T. Leal. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research* 2006; 40, 3274–3280.
- (3) Lubelloa, C., Gorla, R., Niceseb, F., y Ferrini, F. Municipal-treated wastewater reuse for plant nurseries irrigation. *Water Research* 2004; 38, 2939–2947.
- (4) Maynard, H., Ouki, S. y Williams, C. Tertiary lagoons: a review of removal mechanisms and performance. *Water Research* 1999; 33 (18): 3782-3788.
- (5) Chaves, G., y Medina, I. Diseño un clorinador electrico para la producción de agua electrolizada oxidadora y su utilización de destrucción de microorganismos presentE en lechuga (*Lactuca sativa*). Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia, 2003, 107 p.
- (6) Lydakis, N., Riga, D., Katsivel, E., Mantzavinos, D., y Xekoukoulotakis, N. Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO₂ photocatalysis. *Desalination* 2010; 250, 351-355
- (7) Mills, A. y Le Hunte, S.J. An overview of semiconductor photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology* 1997; 108, 1-35.
- (8) Alroushan, D., Dunlop, P., McMurray, T. y Byrne, A. Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle TiO₂ film. *Water Research* 2009; 43, 47-54.
- (9) Caballero, L., Whitehead, K.A., Allen, N.S. y Verran, J. Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO₂ using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2009; 202, 92–98.
- (10) Rincon, A. y Pulgarin, C. Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO₂ concentration. *Applied Catalysis B: Environmental* 2003; 44, 263–284.
- (11) Rizzo, L. Inactivation and injury of total coliform bacteria after primary disinfection of drinking water by TiO₂ photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 165, 48–51.
- (12) Pérez CC. Validación de la técnica de petrifilm para la detección de *Listeria* spp. en carcasas de pollo. Trabajo de grado de maestría. Facultad de Ciencias. Pontificia universidad javeriana. 2006: 129 p.

- (13) Alcaldía Municipal de Subachoque (2008:Subachoque, Cundinamarca). Sistema Integrado de información municipio de Subachoque [en línea]: Noviembre,2008.Subachoque,Cundinamarca:<<http://www.subachoque.gov.co/index.php?sec=2&sub=1>> [Consultada: 16 ago. 2009].
- (14) American Public Health Association (APHA). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 21th edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Washington, D.C., United States. 2005; 1500 p.
- (15) Fujikawa, R., Baryshev, A.V., Nishimura, K., Uchida, H. y Inoue, M. Optical study on opaline thin films grown by vertical deposition. *J Porous Mater* 2006; 13, 287–290.
- (16) Parrado, A., Rivera, D., Martinez, M., Carrascal, A., Pedroza A. Elaboración de películas de TiO₂ por sedimentación para el pos-tratamiento de un efluente anaeróbico generado en un relleno sanitario. *Revista superficie y vacío* 2009.
- (17) Liang, H. y Yang, T. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO₂ activated with ultraviolet light. *Process Biochemistry* 2003; 39, 475-481
- (18) Goularte, L., Martins, C., Morales, I., Destro, M., Francos, B., Vizeu, D., Hutzler, y Landgraf. Combination of minimal processing and irradiation to improve the microbiological safety of lettuce (*Lactuca sativa*, L.). *Radiation Physics and Chemistry* 2004; 71, 55–159.
- (19) Carbonel, X., Corchero, J., Cubarsi, R., Vila, P., y Villaverde, A. Control of *Escherichia coli* growth rate through cell density. *Microbiological Research* 2002;157 (4): 257-265.
- (20) Kirsop, B. y Snell, J. 1984. Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods. Academic press. United States. Orlando Florida. 1984. Pag., 130.
- (21) Maynard, H.E., Ouki, S.K. y Williams, S.C., Tertiary lagoons: a review of removal mechanisms performance. *Water Research* 1999; 33; 1–13.
- (22) Conpes 3320. Estrategia para el manejo ambiental del río Bogotá. 2004.
- (23) Salter, H., Boyles, L., Ouki, S., Quarmby, J. y Williams. Tracer study and profiling of a tertiary lagoon in the United Kingdom: II. *Water Research* 1999; 33 (18): 3782-3788.
- (24) Guillard, C., Bui, T., Felix, C., Moules, V., Lina, B., y Lejeune, P. Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis. *Comptes Rendus Chime* 2008; 11, 107-113.

- (25) Koivunen, J., Siitonen, A., y Heinonen, H. Elimination of enteric bacteria in biological–chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Research* 2003; 37, 690–698.
- (26) Kouraa, A., Fethi, F., Fahde, A., Lahlou, A. y Ouazzani, N. Reuse of urban wastewater treated by a combined stabilisation pond system in Benslimane (Morocco). *Urban Water* 2002; 4, 373–378.
- (27) Maiga, Y., Denyigba, K., Wethe, J. y Sidiki, O. Sunlight inactivation of *Escherichia coli* in waste stabilization microcosms in a sahelian region (Ouagadougou, Burkina Faso). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2009; 94, 113–119.
- (28) Arango, A.L. y Rivera D.V. Evaluación de fotocátalisis homogénea y heterogénea con TiO_2 como pos-tratamiento de un efluente anaeróbico. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia, 2008, 141 p.
- (29) Ben, S., Guedri, L., Baud, G., Jacquet, M. y Ghedira. Influence of the temperature on the properties of sputtered titanium oxide films. *Materials Chemistry and Physics* 2003; 77, 903–911.
- (30) Takashi, S. y Masiahto, T. Enhancement of phage inactivation using photocatalytic titanium dioxide particles with different crystalline structures. *Biochemical Engineering Journal* 2006; 28, 303–308.
- (31) Zaleska, A., Janusz, W., Sobczak B., Grabowska, E. y Jan, H. Preparation and photocatalytic activity of boron-modified TiO_2 under UV and visible light. *Applied Catalysis B: Environmental* 2008; 78, 92–100.
- (32) Candal RJ, Rodríguez J, Colón G, Gelover S, Santos EV, Jimenez A. Blesa MA. Materiales para fotocátalisis y electrofotocátalisis. Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea. Editorial Ciemat. Madrid. 2004: 189 – 210.
- (33) Benabbou, A., Derriche, Z., Felix C., Lejeune P., Guillard, C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*, Effect of concentration of TiO_2 and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation, *Applied Catalysis B: Environmental* 2007; 76, 257–263.
- (34) Gomes, A., Santos, J., Vilar, V., Boaventura, A. Inactivation of Bacteria *E. coli* and photodegradation of humic acids using natural sunlight. *Applied Catalysis B: Environmental* 2009; 88, 283–291.
- (35) Marugan, J., Van Grieken, R., Sordo, C. y Cruz, C. Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Applied Catalysis B: Environmental* 2008; 82, 27–36.

- (36) Silva, C., Wang, W., Selvan, P., Dapurkar, S. Y Faria, J. Structured TiO₂ based catalysts for clean water technologies. *Studies in Surface Science and Catalysis* 2006; 162, 151-158.
- (37) Robertson, J., Robertson, P.K.J., Lawton, L.A. A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005; 175,51–56.
- (38) Rincon, A., Pulgarin, C 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. *Applied Catalysis B: Environmental* 2004; 49, 99–112.
- (39) Huang, Z., Maness, P., Blake, D.M., Wolfrum, E.J., Smolinski, S.L., Jacoby, W.A. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2000; 130 (2-3): 163–170.
- (40) Sunada, K., Watanabe, T., Hashimoto, K. Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003; 156 (1-3): 227–233.
- (41) Wainwright, M. Methylene blue derivatives – suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; 16 (4): 381–394.
- (42) Carp, O., Huisman, C., Reller, A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in Solid State Chemistry* 2004; 32, 33–17.
- (43) Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research* 2004; 38, 1069–1077.
- (44) Pal, A., Pehkonen S., Yu E., Ray M. Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007; 186, 335–341
- (45) Bandala, E., Corona, B., Guisar, R, Uscanga, Melesio. Aplicación de procesos avanzados de oxidación en la desactivación secuencial de microorganismos resistentes en agua. *Ciencia Ahora* 2007; 20, 52-63.
- (46) Mara, D. Handbook of water and wastewater microbiology. Academic. London, England. 2003. Pag. 819.
- (47) Benabbou, A.K., Derriche, Z., Feliz, C., Lejeune, P. y Guillard, C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental* 2007; 76 (3-4): 257-263.

(48) Luna J., Daga J. y Martínez P. Determinación microbiología de *Listeria* sp. en lechuga y espinaca. Memorias red-alfa lagrotech, comunidad europea. 2008

(49) Mardare, D., Rusi, G. The influence of heat treatment on the optical properties of titanium oxide thin films. *Materials Letters* 2002; 56, 210–214.

(50) Ho. C., Lee, S. y Boo, J. Deposition of TiO₂ thin films using RF magnetron sputtering method and study of their surface characteristics. *Thin Solid Films* 2005; 475, 183-188.

(51) F.H. ElBatal, M.S. Selim, S.Y. Marzouk, M.A. Azooz. UV-vis absorption of the transition metal-doped SiO₂ – B₂O₃-Na₂O glasses. *Physica B* 398 (2007) 126-134

(52) Nadtochenkoa VA, Nadtochenkoa AG, Rincon B Stanca SE, Kiwi J. Dynamics of *E. coli* membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005; 169:131–137

Lista de figuras

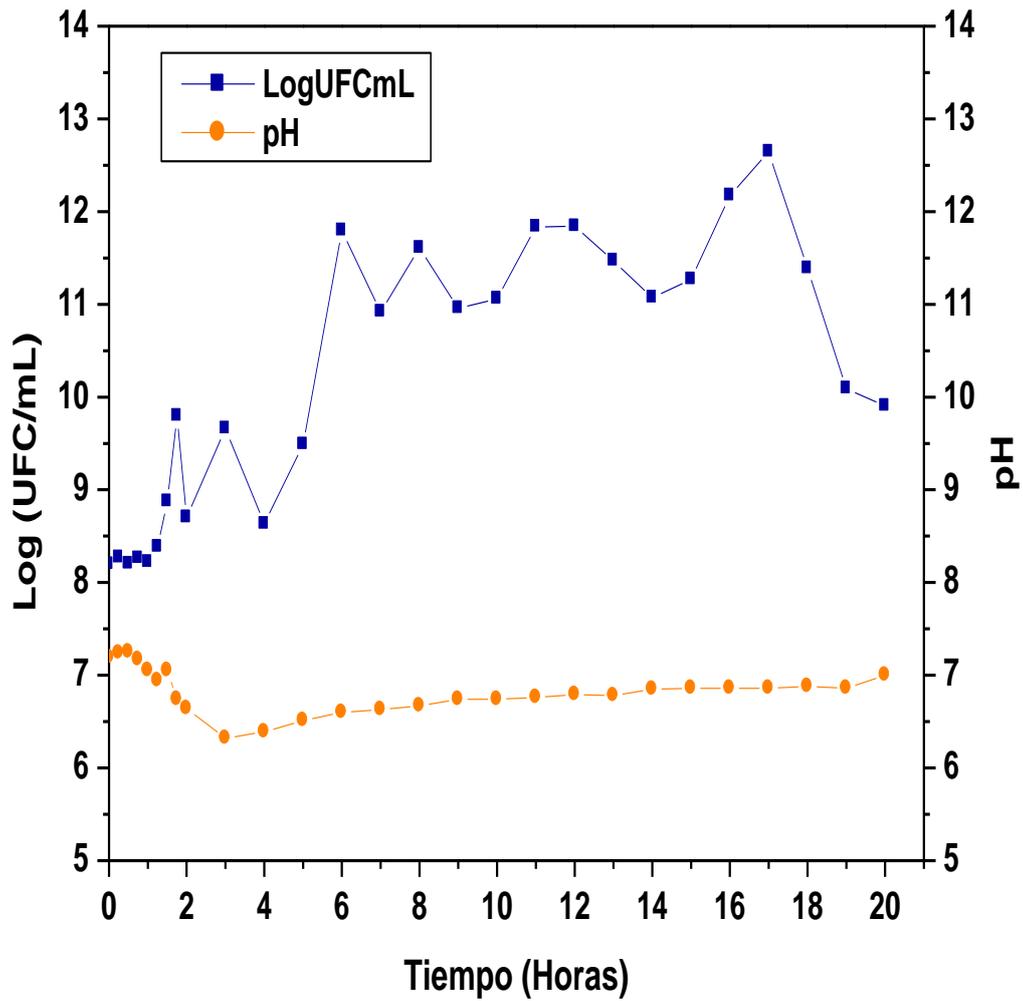


Figura 1. Cinética de caracterización del crecimiento de *Escherichia coli* a 37 °C, 150 rpm. por 20 horas.

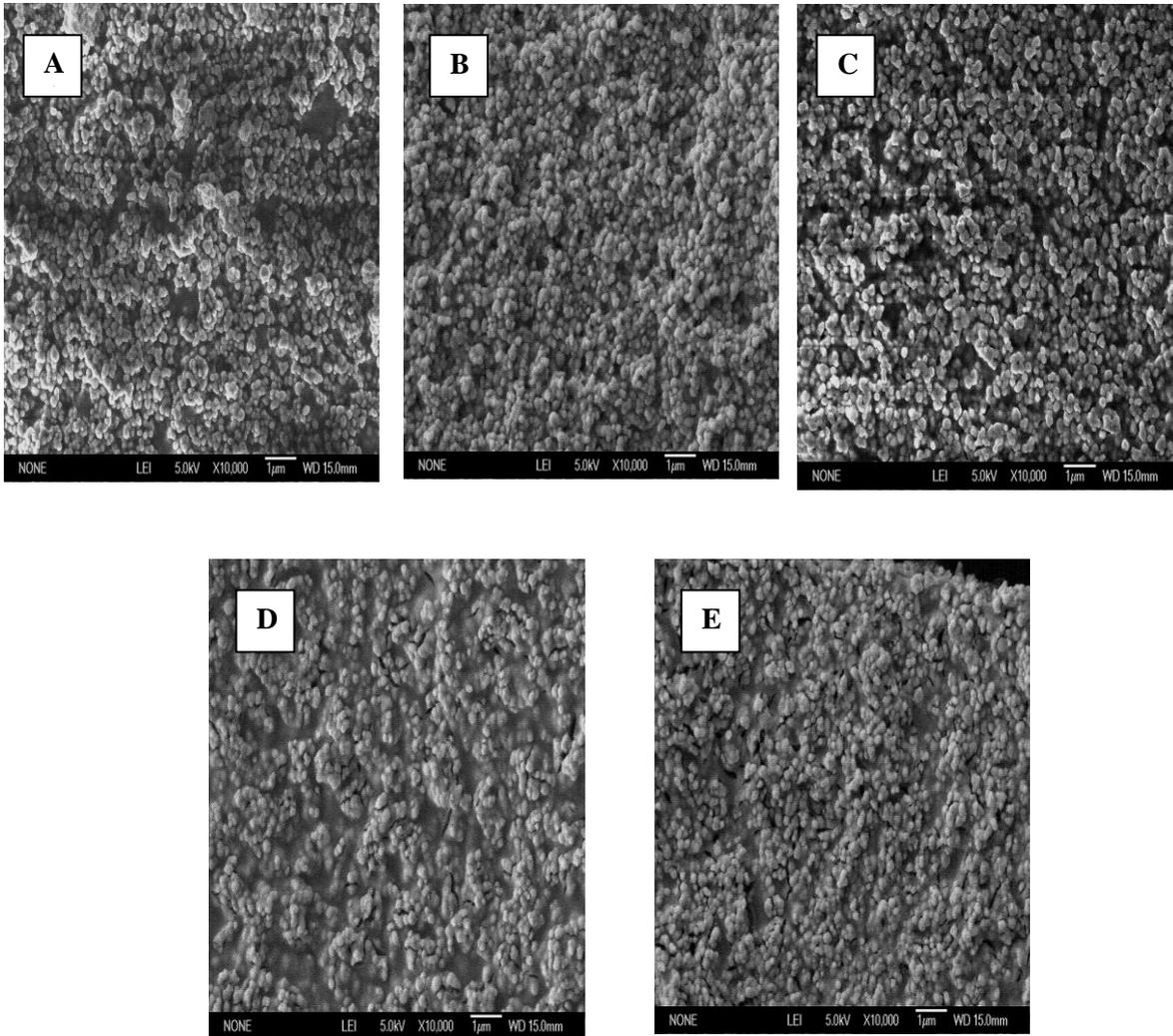


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido a 10.000 X para las películas sometidas a diferentes tratamientos térmicos. (A) 50° C, (B) 350° C, (C) 450° C, (D) 550° C, (E) 650° C.

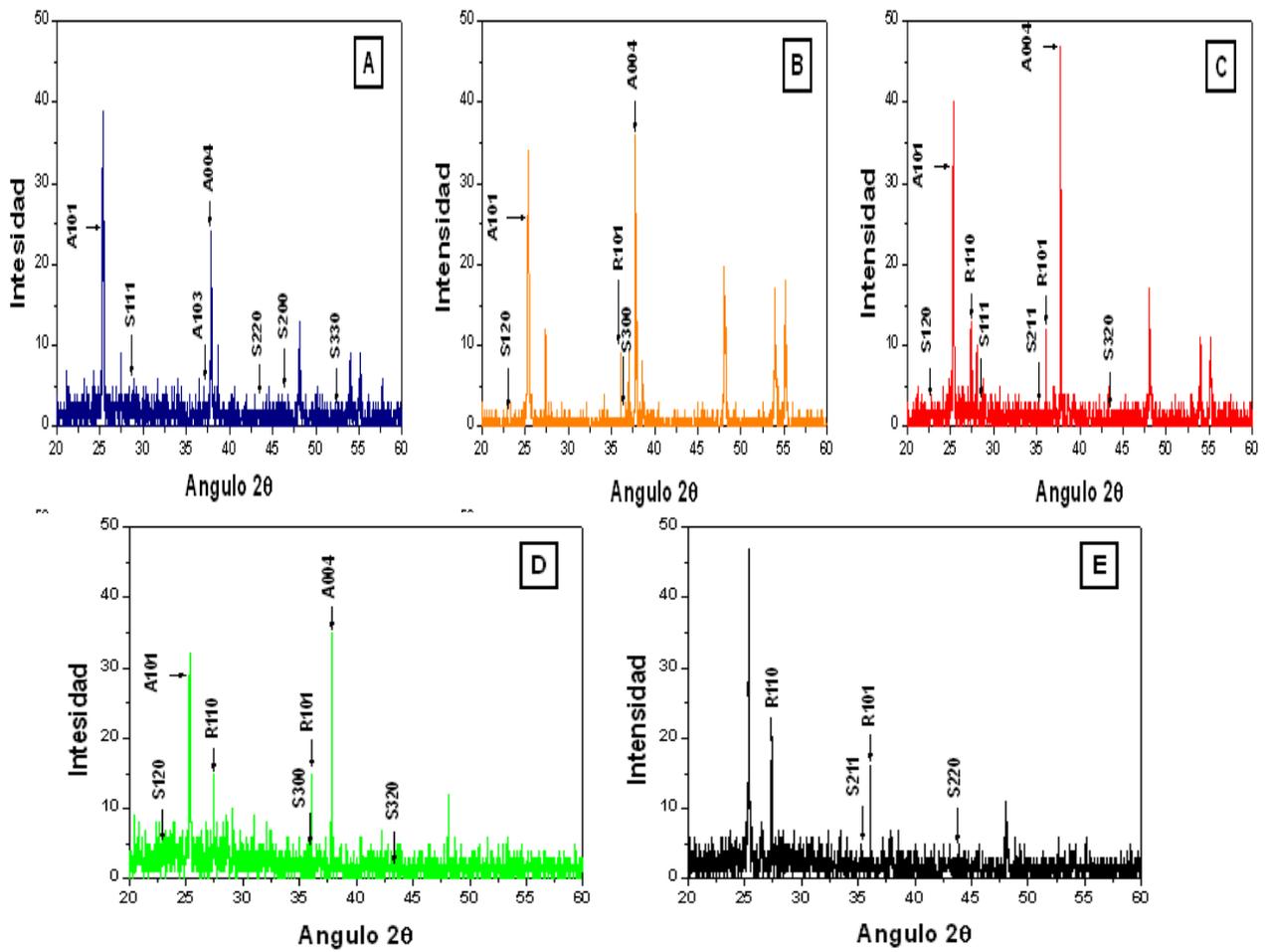


Figura 3. Difracción de rayos X para los diferentes tratamientos térmicos X por la técnica de ángulo rasante con un ángulo de incidencia de 1.5 grados, empleando un difractómetro de rayos X Siemens D-500

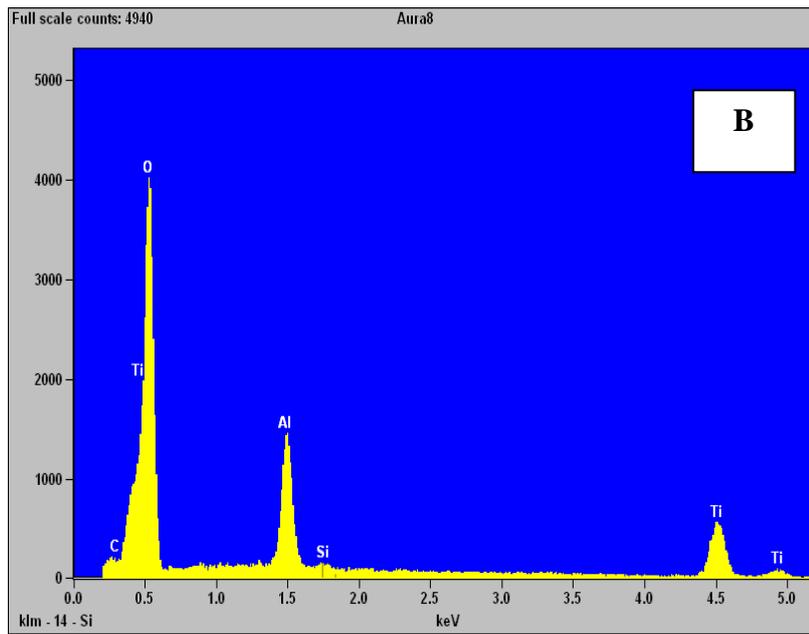
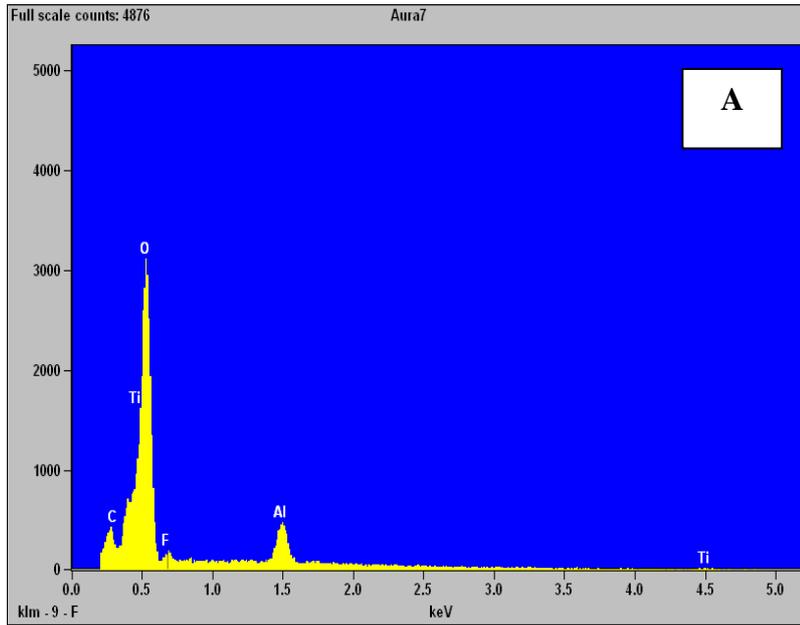


Figura 4. Espectrometría de dispersión de energía por rayos X (EDX). (A) Película de TiO_2 a 50 °C, (B) Película de TiO_2 450 °C

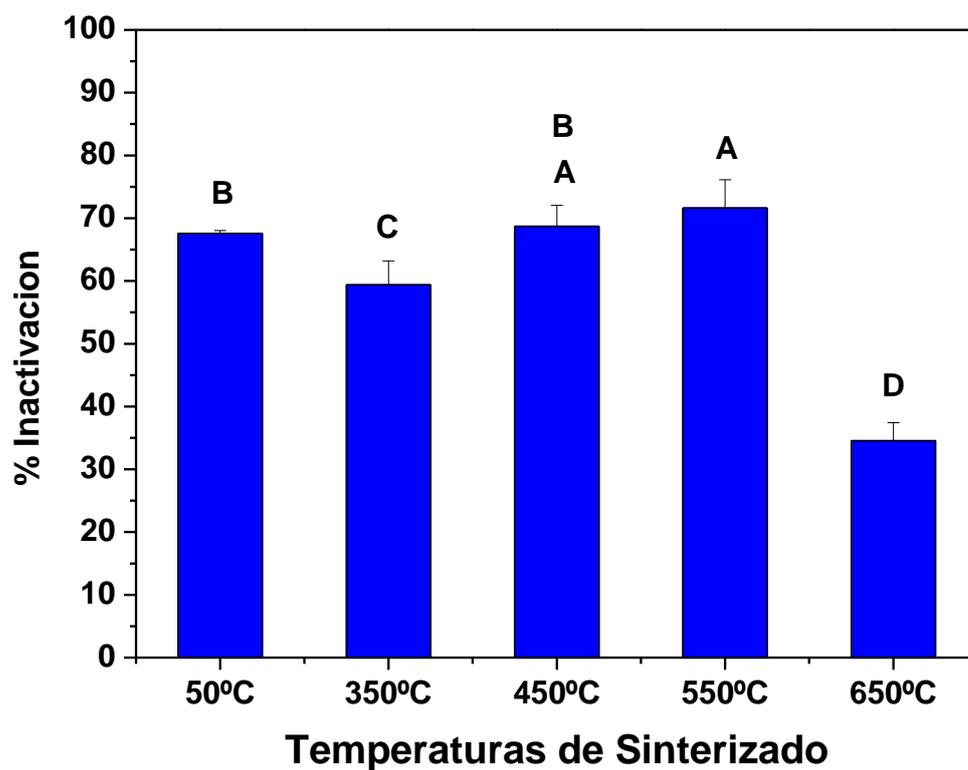


Figura 5. Porcentaje de inactivación de *E. coli* por fotocatalisis heterogénea a diferentes temperaturas de sinterizado ($p < 0.0001$).

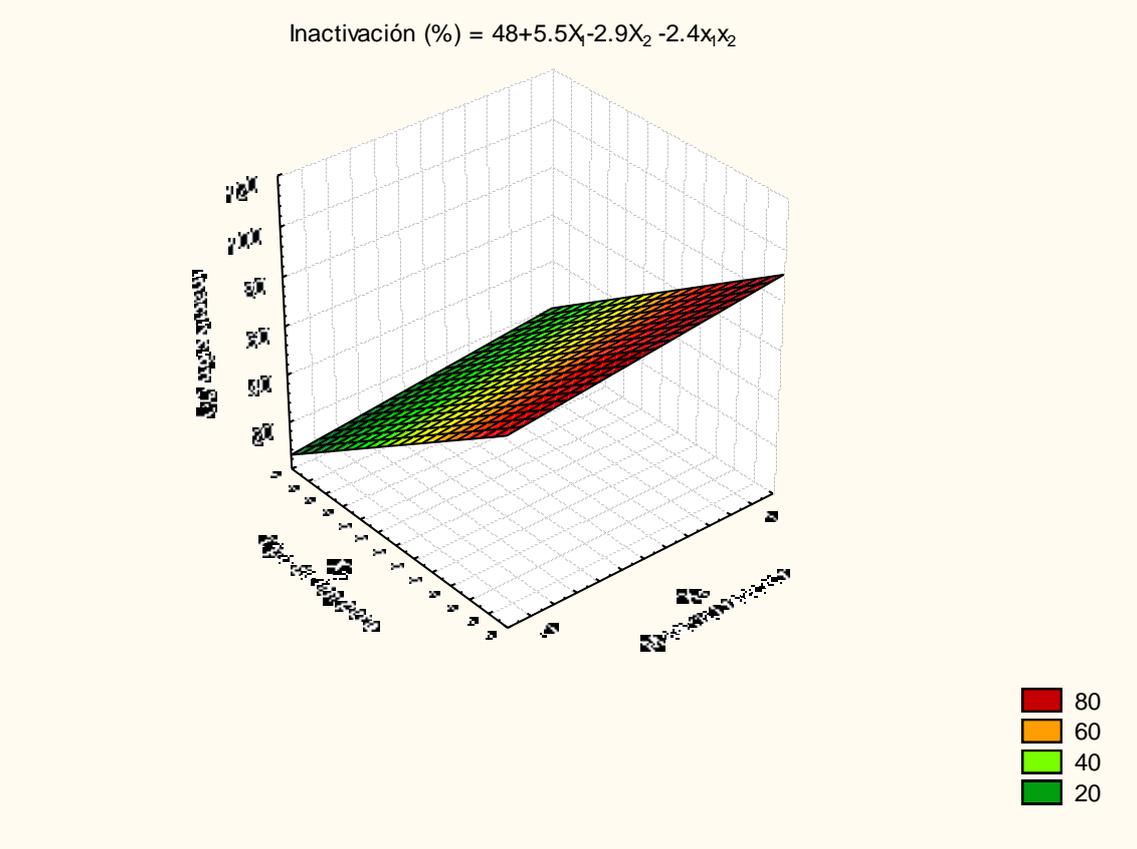


Figura 6. Grafica en 3D para el diseño factorial 2^2

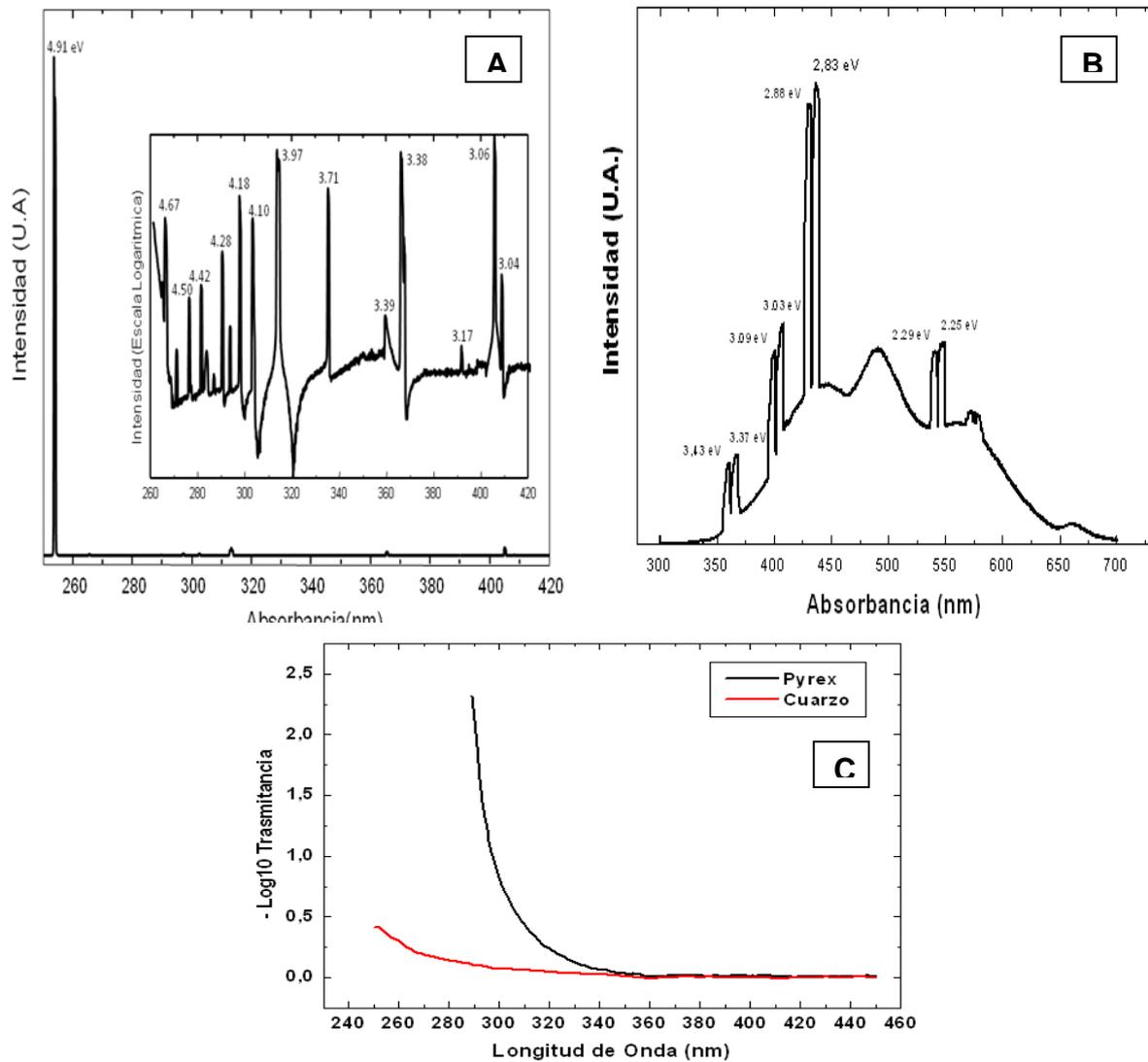


Figura 7. (A). Espectro de emisión de la lámpara de luz UV. (B). Espectro de emisión de lámpara de luz blanca. (C). Espectro de absorción del vidrio pyrex y cuarzo.

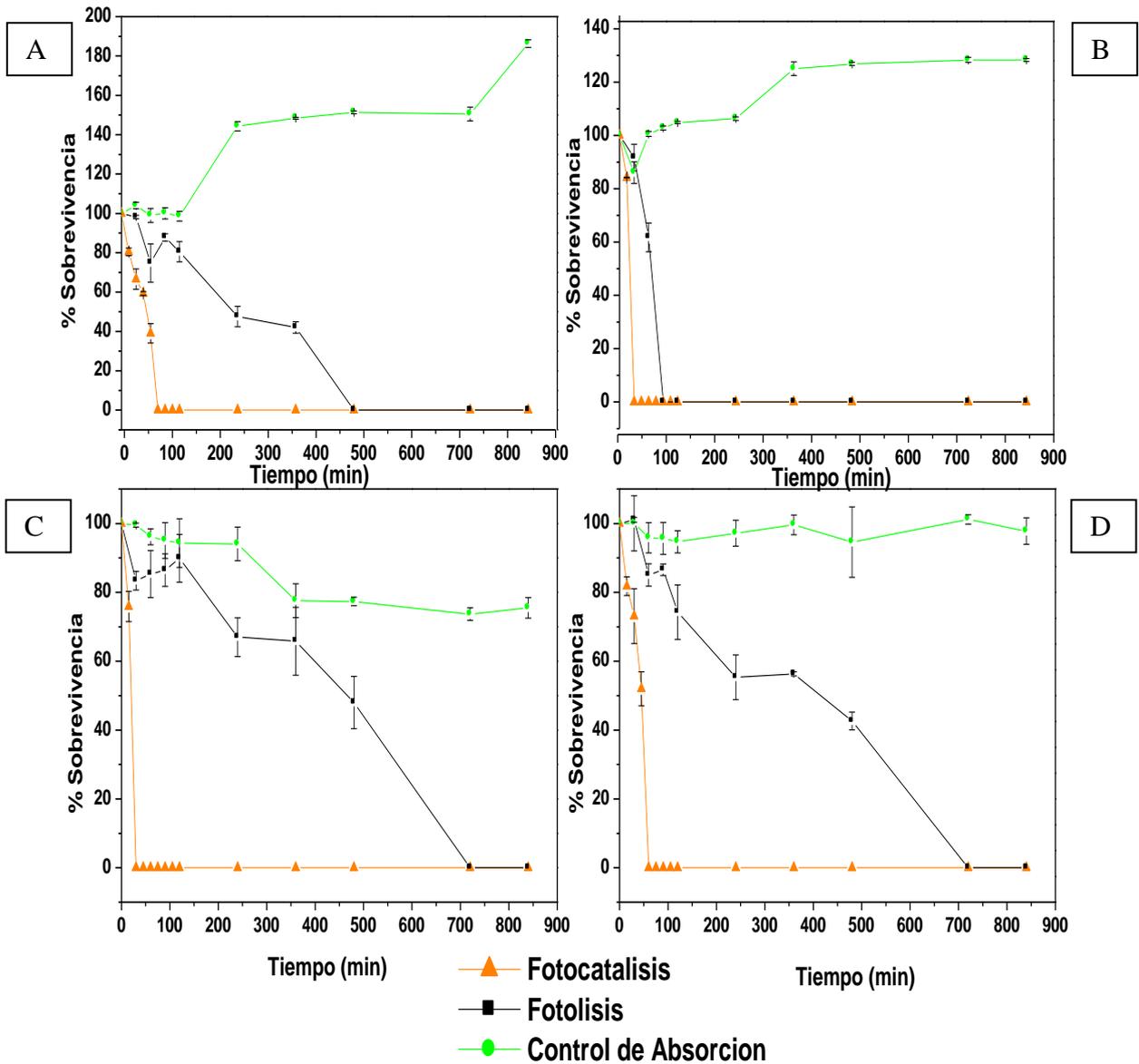


Figura. 8 Cinéticas de Inactivación por fotocatalísis heterogénea, fotólisis y control de absorción. a T° ambiente, 100 rpm y 12 hrs (A). Cinética de *E. coli* en agua residual estéril. (B). Cinética de *E. coli* en agua residual. (C). Cinética de Coliformes en agua residual. (D). Cinética de Heterótrofos en agua residual.

Lista de tablas

Tabla 1. Matriz Factorial

<i>Tratamientos</i>	<i>Factor X₁</i> <i>Material del</i> <i>Reactor</i>	<i>Factor X₂</i> <i>Tipo de lámpara</i>
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
Factor X ₁	Nivel bajo (-1) Vidrio Pyrex Nivel alto (+1) Vidrio Cuarzo	
Factor X ₂	Nivel bajo (-1) Lámpara de Luz UV Nivel alto (+1) Lámpara de Luz blanca	

Tabla 2. Tratamientos a evaluar en las curvas de letalidad

Tratamientos	Características	Recuentos Microbiológicos
Fotocatálisis con agua estéril.	Agua esterilizada reinoculada con <i>E. coli</i> en 10^2 UFC/mL.	Recuento de <i>E.coli</i> en Agar LB.
Fotocatálisis con agua no estéril.	Agua con toda la carga microbiana.	Recuento de <i>E.coli</i> en Agar Cromocult y recuento de heterótrofos totales en Agar Plate Count.
Fotolisis con agua estéril.	Agua esterilizada reinoculada con <i>E. coli</i> en 10^2 UFC/mL.	Recuento en <i>E.coli</i> en Agar LB.
Fotolisis con agua no estéril.	Agua con toda la carga microbiana.	Recuento de <i>E.coli</i> en Agar Cromocult y recuento de heterótrofos totales Agar Plate Count.
Control 1 Adsorción al TiO_2 en oscuridad.	Agua esterilizada reinoculada con <i>E. coli</i> en 10^2 UFC/mL.	Recuento en <i>E.coli</i> en Agar LB.
Control 2 Adsorción al TiO_2 en oscuridad	Agua con toda la carga.	Recuento de <i>E.coli</i> en Agar Cromocult y recuento de heterótrofos totales Agar Plate Count.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de agua residual

Parámetro	Unidades	Muestreo Entrada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
Materia Orgánica	mg/L	221	55	100	114
Fósforo Total	mg/L P	4.08	0,859	1.13	3.06
Nitrógeno Total	mg/L N	30	45	37	43
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	162	94	34	111
Sólidos Disueltos Totales	mg/L	298	309	306	338
Sólidos Totales	mg/L	433	261.5	343	396
Sólidos Sedimentables Totales	cm/L/h	1.2	0	0	0
DBO₅	mg/L O ₂	263	99	195	162
DQO	mg/L O ₂	589	146	268	304
Plomo	mg/L	<0,049	<0,049	<0,049	<0,049
Cadmio	mg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Níquel	mg/L	<0,042	<0,042	<0,042	<0,042
Cromo Total	mg/L	<0,043	<0,043	<0,043	<0,043
Unidades de Color		283.7	253.7	272.72	267.8
Ph		7.6	7,5	7,6	7.4
<i>Escherichia coli</i>	UFC/mL	60x10 ² ±0.05	4x10 ³ ±0.02	40x10 ² ±0	10±0
Coliformes totales	UFC/mL	11x10 ⁴ ±0.02	10x10 ⁵ ±0.04	30x10 ³ ±0.06	14x10 ¹ ±0.06
Heterótrofos	UFC/mL	74x10 ⁴ ±0.01	37x10 ¹² ±0.04	20x10 ⁶ ±0.02	21x10 ² ±0.02

Tabla 4. Adherencia del TiO₂ al sustrato.

Temperatura °C	µg TiO₂ inicial/mg SiO₂	µg TiO₂ final/mg SiO₂	% TiO₂ desprendido
50	94,41 ± 0.011	4,516 ± 0.004	95.2
350	39,76 ± 0.020	29,88 ± 0.029	75.1
450	30,62 ± 0.023	30,49 ± 0,030	3.9
550	80,32 ± 0.045	39,08 ± 0.039	51.3
650	73,41 ± 0.017	15,34 ± 0.015	94.1

Tabla 5. Análisis de variancia (ANOVA) respecto a las UFC/mL de *E. coli* en *Lactuca sativa* var. *Batavia*

Códigos	Tratamiento	Recuento en Hojas (UFC/mL)	Recuento en Suelo (UFC/mL)	Recuento en Raíz (UFC/m)
<i>Escherichia coli</i>				
1	TiO ₂ /UV	0 (a)	0 (a)	0 (a)
2	Desinfección química hipoclorito	30±0,278 (b) (b)	26±0,127 (c)	20±0,172 (a)
3	Tratamiento biológico	13±0,095 (c) (b)	39± 0.363 (c)	50±0.358 (a)

Coliformes totales

Códigos	Tratamiento	Recuento en Hojas (UFC/mL)	Recuento en Suelo (UFC/mL)	Recuento en Raíz (UFC/mL)
1	TiO ₂ /UV	62±0.033 (a)	87±0.378 (a)	41±0.400 (a)
2	Desinfección química hipoclorito	54±0.38 (b) (a)	88± 0.310 (c) (A)	63±0.095 (a) (a)
3	Tratamiento biológico	13x10 ⁵ ±0.788 (c) (a)	59x10 ⁴ ±0.741 (c) (b)	54x10 ³ ±0.638 (a) (b)