

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ELIMINACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS
EN AGUA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA CON TiO_2
CO-DOPADO CON Ag/Cu Y FOTO-FENTON HETEROGÉNEO SOLAR**

Por

M.C. DIEGO ALEJANDRO PINO SANDOVAL

Asesor

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
orientación en QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL**

Monterrey, Nuevo León, octubre 2021

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ELIMINACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS
EN AGUA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA CON TiO_2
CO-DOPADO CON Ag/Cu Y FOTO-FENTON HETEROGÉNEO SOLAR

Aprobación de Tesis:

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Presidente

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Secretario

Dra. Minerva Villanueva Rodríguez
Primer vocal

Dr. Miguel Ángel Reyes González
Segundo vocal

Dr. Karim Acuña Askar
Tercer vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de estudios de posgrado

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ELIMINACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS
EN AGUA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA CON TiO_2
CO-DOPADO CON Ag/Cu Y FOTO-FENTON HETEROGÉNEO SOLAR

Revisión de Tesis:

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Directora de Tesis

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Co-Directora de Tesis

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Comité Tutorial

Dra. Minerva Villanueva Rodríguez
Comité Tutorial

Dr. Miguel Ángel Reyes González
Comité Tutorial

RESUMEN

M.C Diego Alejandro Pino Sandoval

Fecha de Graduación: Octubre 2021

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ELIMINACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS EN AGUA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA CON TiO_2 CO-DOPADO CON Ag/Cu Y FOTO-FENTON HETEROGÉNEO SOLAR

Número de páginas: 112

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Química Analítica Ambiental.

Área de estudio: Química Analítica Ambiental

Propósito y método de estudio:

El propósito de este estudio fue comparar dos procesos fotocatalíticos para la inactivación de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* en agua destilada y agua de un efluente secundario de una PTAR utilizando la radiación solar simulada como fuente de activación. Para ello, en el caso de la fotocatalisis heterogénea, se sintetizaron catalizadores co-dopados Ag-Cu/ TiO_2 por el método sol-gel y fueron caracterizados por diferentes técnicas (DRX, espectroscopia Raman, fisorción de N_2 , DRS, EAA, SEM y XPS); su actividad fotocatalítica en la eliminación de ambas bacterias de estudio se evaluó mediante un diseño de experimentos central compuesto centrado en las caras 2^3 , logrando con la mejor condición una inactivación completa de los microorganismos en pocos minutos de tratamiento (10 a 30 min) en ambas matrices (agua destilada y efluente secundario de una planta tratadora de agua residual). Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios complementarios para observar la estabilidad y reusabilidad del material, y el posible mecanismo de inactivación de las bacterias. Por otra parte, se evaluó el proceso foto-Fenton heterogéneo utilizando Fe_2O_3 a bajas concentraciones

mediante un diseño de experimentos central compuesto centrado en las caras 2² en la inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium*, logrando la completa inactivación de las bacterias en ambas matrices en tiempos más prolongados (120 a 150 min) que al aplicar la fotocatalisis heterogénea. Por último, se evaluó el efecto de los procesos fotocatalíticos sobre la estructura y morfología de las células bacterianas mediante imágenes de SEM, observando que ambos tratamientos producen un gran daño a las bacterias.

Contribuciones y Conclusiones:

Hasta el momento, el material Ag-Cu/TiO₂ no había sido explorado para la desinfección de agua bajo luz solar simulada, utilizando el fotocatalizador en dispersión. Por lo cual, este proyecto contribuyó en el ámbito de la Química Analítica y del Medio Ambiente al desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de agua contaminada por microorganismos. Adicionalmente, este proceso fue comparado con otro proceso fotocatalítico prometedor como es el foto-Fenton heterogéneo utilizando óxidos de hierro. En esta investigación se realizó la síntesis, caracterización y evaluación fotocatalítica del catalizador Ag-Cu/TiO₂ en la inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium*. Se determinó que el catalizador Ag-Cu/TiO₂ (1.2:1.2 % m/m) logró una rápida y eficaz eliminación de bacterias gram-negativas en agua destilada y el efluente secundario de una planta tratadora de agua residual, siendo más efectivo que el proceso foto-Fenton heterogéneo con maghemita y hematita. Por lo tanto, con el catalizador Ag-Cu/TiO₂ preparado en este trabajo se podrían implementar tratamientos que sean rápidos y eficaces para la eliminación completa de bacterias en agua, surgiendo este material como un fotocatalizador que exhibe potencial para futuras aplicaciones a mayor escala en la desinfección de agua residual utilizando la luz solar como recurso energético renovable.

FIRMA DEL ALUMNO: _____

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS: _____

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Marianela Sandoval y Edinson Pino y mi hermana Natalia Pino que a pesar de la distancia me han brindado su apoyo incondicional, motivación y enseñanza que me han permitido alcanzar las metas que me he propuesto.

A mis asesoras la Dr. Aracely y la Dr. María Elena, por su apoyo, paciencia, consejo y motivación en la realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental, por brindarme su ayuda y por hacer de esta experiencia más gratificante y amena, y al Dr. Jorge, la Dra Laura, Dra. Minerva, Dr. Edgar y la Dra. Lulú por su apoyo y colaboración en el proyecto y en mi formación.

A los miembros del comité tutorial por su ayuda y conocimiento aportado al trabajo realizado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Fundación UANL y en especial a la Facultad de Ciencias Químicas por permitirme realizar mis estudios de posgrado y por las becas otorgadas.

Finalmente, agradezco al programa del Gobierno de México de becas nacionales CONACYT por el apoyo económico brindado a lo largo de la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	10
1.1.1. Determinación de agentes patógenos en agua residual de plantas tratadoras.....	10
1.1.2. Eliminación de agentes patógenos mediante catalizadores de TiO ₂ dopados con metales	11
1.1.3. Eliminación de agentes patógenos y contaminantes emergentes mediante catalizadores de TiO ₂ co-dopados con plata y cobre	13
1.1.4. Eliminación de agentes patógenos mediante foto-Fenton utilizando óxidos minerales de hierro	15
1.1.5. Análisis crítico de la literatura	17
2. APORTACIÓN CIENTÍFICA.....	19
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19
4.1. OBJETIVO GENERAL	19
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. METODOLOGÍA	21
5.1. MUESTREO DE PTAR Y DETECCIÓN DE <i>E. coli</i> Y <i>Salmonella</i> spp EN DIFERENTES ETAPAS DEL TRATAMIENTO.	21
5.1.1. Reactivos.....	21
5.1.2. Materiales y equipos.....	21
5.1.3. Procedimiento.....	22
5.2. SÍNTESIS DE LOS CATALIZADORES.....	24
5.2.1. Reactivos.....	24
5.2.2. Materiales y equipos.....	24
5.2.3. Síntesis sol-gel de Ag-Cu/TiO ₂	24

5.3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	26
5.3.1.	Difracción de rayos X (DRX).....	26
5.3.2.	Espectroscopía Raman	27
5.3.3.	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).....	28
5.3.4.	Fisorción de nitrógeno (análisis de área superficial y porosidad)....	29
5.3.5.	Espectroscopía UV-Vis con reflectancia difusa (DRS).	30
5.3.6.	Espectroscopía de absorción atómica (EAA)	31
5.3.7.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	32
5.3.8.	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	34
5.4.	INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> Y <i>S. typhimurium</i> MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA UTILIZANDO CATALIZADORES DE Ag-Cu/TiO ₂	35
5.4.1.	Reactivos.....	35
5.4.2.	Materiales y equipos.....	35
5.4.3.	Evaluación de la actividad fotocatalítica de los catalizadores Ag-Cu/TiO ₂ en la eliminación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	36
5.5.	INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> Y <i>S. typhimurium</i> MEDIANTE EL PROCESO FOTO-FENTON UTILIZANDO ÓXIDO DE HIERRO (III) (λ -Fe ₂ O ₃ y α -Fe ₂ O ₃)..	38
5.5.1.	Reactivos.....	38
5.5.2.	Materiales y equipos.....	38
5.5.3.	Evaluación del proceso foto-Fenton en la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	39
5.6.	CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS MEDIANTE LOS PROCESOS ESTUDIADOS	40
5.7.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PROCESOS SOBRE LAS ESTRUCTURAS BACTERIANAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEM.	40
5.8.	DISPOSICIÓN DE RESIDUOS	41
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
6.1.	MUESTREO DE LA PLANTA TRATADORA DE AGUA RESIDUAL.....	43

6.1.1.	Caracterización fisicoquímica de las muestras recolectadas en la PTAR	44
6.1.2.	Detección de <i>E. coli</i> en diferentes etapas del tratamiento de la PTAR..	46
6.1.3.	Detección de <i>Salmonella</i> spp en diferentes etapas del tratamiento. .	51
6.2.	CARACTERIZACIÓN DE LOS CATALIZADORES SINTETIZADOS	56
6.2.1.	Difracción de rayos X (DRX).....	56
6.2.2.	Espectroscopia Raman.....	59
6.2.3.	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). ...	60
6.2.4.	Fisorción de nitrógeno (método BET)	61
6.2.5.	Espectroscopia UV-Vis con reflectancia difusa.	64
6.2.6.	Espectroscopia de absorción atómica (EAA).....	66
6.2.7.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	67
6.2.8.	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)	68
6.3.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DE LOS CATALIZADORES Ag-Cu/TiO ₂ EN LA ELIMINACIÓN DE <i>E. coli</i> Y <i>S. typhimurium</i>	70
6.3.1.	Análisis estadístico de los experimentos de fotocátalisis heterogénea usando los catalizadores Ag-Cu/TiO ₂	70
6.3.2.	Actividad fotocatalítica	74
6.3.3.	Estudio de especies reactivas	79
6.3.4.	Estabilidad y reusabilidad del catalizador	80
6.3.5.	Mecanismo propuesto de inactivación fotocatalítica de los microorganismos por el catalizador Ag-Cu/TiO ₂ bajo radiación solar.....	83
6.3.6.	Pruebas de recrecimiento bacteriano después del tratamiento fotocatalítico	84

6.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL PROCESO FOTO-FENTON HETEROGÉNEO USANDO ÓXIDO DE HIERRO (III) EN LA ELIMINACIÓN DE <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	85
6.4.1. Análisis estadístico de los experimentos de foto-Fenton heterogéneo usando óxido de hierro (III) fase maghemita.	85
6.4.2. Actividad fotocatalítica del proceso foto-Fenton Heterogéneo y pruebas control	88
6.4.3. Pruebas de recrecimiento bacteriano después del tratamiento foto-Fenton heterogéneo.....	91
6.5. COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL PROCESO FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA Y EL FOTO-FENTON HETEROGÉNEO EN LA INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> Y <i>S. typhimurium</i> EN UN EFLUENTE SECUNDARIO DE UNA PTAR	92
6.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PROCESOS SOBRE LAS ESTRUCTURAS BACTERIANAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEM.	94
7. CONCLUSIONES	97
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación del proceso fotocatalítico en una partícula de fotocatalizador TiO ₂ en suspensión.....	4
Figura 2. Representación gráfica resumida del proceso sol-gel para síntesis de óxidos metálicos.....	7
Figura 3. Clasificación de a) isothermas de fisisorción y b) lazos de histéresis. (Tomado del reporte técnico de la IUPAC ⁶²).....	30
Figura 4. Localización de la PTAR mostrada.....	43
Figura 5. Procedimiento para la detección de <i>E. coli</i> en agua procedente de la PTAR	46
Figura 6. Procedimiento para la detección de <i>Salmonella</i> spp en agua procedente de la PTAR.....	52
Figura 7. Difractogramas de los fotocatalizadores TiO ₂ , Ag-TiO ₂ 1.2, Cu-TiO ₂ 1.2 y Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2 y TiO ₂ sintetizados por el método sol-gel.....	57
Figura 8. Espectros Raman de los fotocatalizadores TiO ₂ , Ag-TiO ₂ 1.2, Cu-TiO ₂ 1.2 y Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2 sintetizados por el método sol-gel.....	60
Figura 9. Espectro infrarrojo de los fotocatalizadores a) TiO ₂ , b) Cu-TiO ₂ 1.2 %, c) Ag-TiO ₂ 1.2 % y d) Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2% m/m.....	61
Figura 10. Isothermas de adsorción-desorción de N ₂ de los catalizadores: a) TiO ₂ , b) Cu-TiO ₂ 1.2 %, c) Ag-TiO ₂ 1.2 % y d) Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2% m/m.....	62
Figura 11. Distribución de tamaño de poro de los materiales TiO ₂ , Ag-TiO ₂ 1.2, Cu-TiO ₂ 1.2 y Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2	64
Figura 12. Representación gráfica de la ecuación de Kubelka-Munk para el cálculo de E _g de los catalizadores TiO ₂ , Ag-TiO ₂ 1.2, Cu-TiO ₂ 1.2 y Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2.	65

Figura 13. Correlación entre porcentaje de incorporación de a) Cu y b) de Ag versus Eg.....	66
Figura 14. Imágenes del SEM de los catalizadores: a) TiO ₂ , b) Ag-TiO ₂ 1.2, c) Cu-TiO ₂ 1.2 y d) Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2.....	68
Figura 15. Espectro XPS del catalizador Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2 (A) y espectro XPS de Alta-Resolución de Ti 2p (B), O 1s (C), Ag 3d (D) y Cu 2p (E).....	69
Figura 16. Inactivación fotocatalítica de <i>E. coli</i> bajo luz solar simulada usando diferentes cargas de catalizadores de acuerdo con el diseño de experimentos: a) 0.1 g/L, b) 0.3 g/L y c) 0.5 g/L.....	71
Figura 17. Inactivación fotocatalítica de <i>S. typhimurium</i> bajo luz solar simulada usando diferentes cargas de catalizadores de acuerdo con el diseño de experimentos: a) 0.1 g/L, b) 0.3 g/L y c) 0.5 g/L.....	72
Figura 18. Placas tomadas en diferentes tiempos de tratamiento usando el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2 (<i>E. coli</i> produce colonias de color azul oscuro (violetas) y <i>S. typhimurium</i> genera colonias blancas).....	75
Figura 19. Perfiles de desinfección para a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. typhimurium</i> mediante SODIS y fotocátalisis heterogénea utilizando 0.5 g/L de cada catalizador.....	76
Figura 20. Inactivación fotocatalítica de a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. typhimurium</i> usando el catalizador Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2% p/p en presencia y ausencia de diferentes secuestradores de especies reactivas.	79
Figura 21. Reutilización del catalizador Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2% p/p después de diferentes ciclos consecutivos de uso en la inactivación fotocatalítica de <i>E. Coli</i> .	81
Figura 22. Plata lixiviada desde el catalizador co-dopado a la disolución.	82
Figura 23. Inactivación de a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. typhimurium</i> usando 0.85 mg/L de plata en disolución en presencia y ausencia de radiación solar simulada.	83
Figura 24. Mecanismo propuesto de inactivación fotocatalítica de bacterias gramnegativas utilizando el catalizador Ag-Cu/TiO ₂ bajo radiación solar.	84

Figura 25. Difractogramas de los óxidos de hierro (III) utilizado para las pruebas de foto-Fenton. a) Fase maghemita, b) fase hematita.....	85
Figura 26. Inactivación de a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. typhimurium</i> mediante el proceso foto-Fenton solar heterogéneo con maghemita, bajo diferentes cantidades de hierro y H ₂ O ₂ adicionado.....	86
Figura 27. Inactivación de a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. typhimurium</i> mediante foto-Fenton heterogéneo con maghemita y hematita y sus respectivas pruebas control.	90
Figura 28. Inactivación de a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. typhimurium</i> en un efluente secundario de una PTAR usando los procesos fotocatalisis heterogénea y foto-Fenton heterogéneo.	92
Figura 29. Imágenes de SEM de células de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> antes del tratamiento fotocatalítico a) control y después de ser inactivadas por foto-Fenton heterogéneo con hematita b) 1 h y c) 2h y por fotocatalisis heterogénea con el catalizador Ag-Cu/TiO ₂ d) 5 min y e-f) 15 min.....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre determinación de agentes patógenos en agua residual de PTAR.....	10
Tabla 2. Estudios sobre la eliminación de agentes patógenos en agua por medio de fotocátalisis heterogénea utilizando TiO ₂ dopados con metales	12
Tabla 3. Lista de materiales y equipos usados en la caracterización del agua residual en diferentes etapas del tratamiento en la PTAR.	22
Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la determinación de iones por cromatografía de intercambio iónico.	23
Tabla 5. Lista de materiales y equipos usados en la síntesis de los catalizadores	24
Tabla 6. Lista de materiales y equipo usados para la eliminación de los microorganismos mediante fotocátalisis heterogénea.....	35
Tabla 7. Diseño de experimentos central compuesto 2 ³ para la eliminación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> empleando el catalizador co-dopado Ag/Cu-TiO ₂	38
Tabla 8. Diseño de experimentos central compuesto 2 ² para la eliminación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> empleando foto-Fenton heterogéneo con maghemita.	39
Tabla 9. Caracterización de la muestra de agua recolectada en agosto de 2018	44
Tabla 10. Caracterización de las muestras de agua residual recolectadas en febrero de 2019 y marzo de 2021	45
Tabla 11. Resultados de pruebas bioquímicas <i>E. coli</i> , para tres colonias típicas aisladas del efluente secundario de la PTAR recolectado en febrero de 2019	49
Tabla 12. Resultados de las pruebas selectivas para la detección de <i>Salmonella</i>	54
Tabla 13. Resultados de las pruebas bioquímicas para la detección de <i>Salmonella</i>	56

Tabla 14. Tamaño de cristalito promedio y parámetros de red de los catalizadores sintetizados	58
Tabla 15. Área superficial y tamaño de poro promedio de los catalizadores sintetizados	63
Tabla 16. Valores de energía de banda prohibida E_g y longitud de onda de absorción calculadas por la función de Kubelka-Munk de los catalizadores	65
Tabla 17. Determinación de la incorporación de Ag y Cu por EAA de los catalizadores sintetizados por el método sol-gel	67
Tabla 18 Constantes de velocidad de inactivación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> por desinfección fotocatalítica solar.....	73
Tabla 19. Análisis de varianza para dos respuestas (inactivación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> por fotocatalisis heterogénea solar).....	74
Tabla 20. k_{app} de la eliminación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> por SODIS, con los catalizadores Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:2.1% p/p y Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2% p/p en oscuridad y por F. H. con los catalizadores dopados individualmente	77
Tabla 21. Constantes de velocidad de inactivación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> por foto-Fenton solar heterogéneo.	87
Tabla 22. Análisis de varianza para dos respuestas (inactivación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> por foto-Fenton solar heterogéneo)	87
Tabla 23. Constantes cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> por fotocatalisis heterogénea y foto-Fenton solar heterogéneo en diferentes matrices.	93

ABREVIATURAS

Å	Ångström
BC	Banda de conducción
BV	Banda de valencia
CI	Carbón inorgánico
COD	Carbón orgánico disuelto
COT	Carbón orgánico total
cm	Centímetro
Cl ⁻	Cloruro
R	Coefficientes de correlación de Pearson
cps	Cuentas por segundo
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
CO ₂	Dióxido de carbono
NHE	Electrodo estándar de hidrógeno
BSE	Electrones retrodispersados
SE	Electrones secundarios
eV	Electronvoltio
E _g	Energía de banda prohibida
ROS	Especies reactivas de oxígeno
F.H	Fotocatálisis heterogénea
F.F.H	Foto-Fenton heterogéneo
g	Gramo
h	Hora
IR	Infrarrojo
Fe ²⁺	Ion ferroso
kJ	Kilojulio
L	Litro
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo

μL	Microlitros
μm	Micrómetro
μS	Microsiemens
mA	Miliamperios
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetros
min	Minutos
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NMX	Norma Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
NMP	Número más probable
PTAR	Plantas de tratamiento de aguas residuales
pH	Potencial de hidrógeno
PAO	Procesos avanzados de oxidación
$\cdot\text{OOH}$	Radical hidroperoxilo
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
$\text{O}_2\cdot^-$	Radical superóxido
UV	Ultravioleta
UFC	Unidad formadora de colonia
UFP	Unidad formadora de placa
W	Vatio
VIS	Visible

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha crecido la preocupación mundial por la reducción de agua dulce disponible para el consumo humano, uso industrial y agrícola, por causa del aumento desmesurado de la población, el desarrollo económico y su mal manejo, por lo tanto, la gestión del agua ha sido catalogada como una de las tareas imprescindibles para los seres humanos¹. Específicamente, la disponibilidad de agua potable es uno de los temas de mayor interés debido a que es indispensable para la subsistencia y para obtener una buena calidad de vida. Aproximadamente cerca de 2,100 millones de personas carecen de agua potable en el hogar, además de que se estima que para el 2025, la mitad de la población mundial vivirá en zonas con escasez de agua². La carencia de agua potable implica grandes riesgos para las personas y animales, puesto que existen diferentes microorganismos patógenos que pueden subsistir y reproducirse en ella.

Los agentes patógenos que pueden ser transmitidos a través del agua de consumo humano contaminada son diversos en cuanto a sus características, comportamiento y resistencia. Entre los principales microorganismos patógenos presentes en el agua se encuentran las bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*), *Campylobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Shigella*, *Vibrio*, *Francisella*, micobacteria (no tuberculosa); los virus entre los que destacan Enterovirus, Virus de la Hepatitis, Rotavirus, Virus Norwalk, Adenovirus, Astrovirus, Norovirus; y protozoos como *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Entamoeba*, *Naegleria*. Estos agentes patógenos pueden provocar enfermedades infecciosas, causando efectos agudos y crónicos sobre la salud³. El agua contaminada puede transmitir enfermedades como la diarrea, el cólera, la disentería, la fiebre tifoidea y la poliomielitis, entre otras. Se calcula que la contaminación del agua potable provoca más de 502,000 muertes por diarrea al año a nivel mundial².

Entre los microorganismos patógenos presentes en agua se encuentran las bacterias gram-negativas *E. coli* y *Salmonella* spp que frecuentemente son detectadas tanto en influentes como en efluentes de las plantas tratadoras de agua residual (PTAR) ⁴⁻⁶.

La bacteria *Escherichia coli* pertenece al grupo de los coliformes totales que pueden fermentar lactosa a 44-45 °C y son conocidos como coliformes termotolerantes. Puede

distinguirse de otros coliformes termotolerantes por su capacidad para producir indol a partir de triptófano o por la producción de la enzima β -glucuronidasa. Esta bacteria está presente en grandes concentraciones en las heces humanas y animales, y raramente se encuentra en ausencia de contaminación fecal, por lo que se considera como el indicador de contaminación fecal más adecuado. Además, también se utiliza como indicador de desinfección⁷.

Por otra parte, *Salmonella* spp pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gran-negativos móviles que no fermentan la lactosa, la mayoría de estas bacterias producen sulfuro de hidrógeno o gas por fermentación de carbohidratos. La *Salmonella* spp puede producir efectos adversos en la salud humana, siendo la salmonelosis la enfermedad producida por la ingesta de agua o alimentos contaminados con esta bacteria, los síntomas o manifestaciones clínicas son: gastroenteritis, bacteriemia o septicemia y fiebre tifoidea o paratifoidea. La *Salmonella* spp puede generar consecuencias graves para la salud pública, por lo cual es importante controlar su presencia y eliminación en agua de consumo proveniente de agua subterránea y superficial, así como en agua residual para su posterior reúso.

Las técnicas de eliminación de microorganismos que se utilizan actualmente son tratamientos fisicoquímicos como cloración, ozonización o radiación UV. Sin embargo, se han encontrado importantes inconvenientes en su uso, como son los subproductos tóxicos generados durante la cloración (organohalogenados), el alto costo de la ozonización y radiación UV, además de la limitada acción de la radiación UV debido a la turbidez del agua en algunos casos^{8,9}.

Adicionalmente, debido a la gran demanda para suministrar una fracción del agua utilizada por el sector industrial y agrícola que no necesita cumplir con la misma calidad que el agua potable, se han implementado procesos para la reutilización de agua; estos han tomado gran importancia en los últimos años en varias regiones del mundo, incluido México. Generalmente se utilizan tratamientos biológicos convencionales (lodos activados) para recuperar el agua residual que posteriormente será reutilizada, sin embargo, se ha encontrado en varios estudios que en el agua tratada aún persisten algunos agentes patógenos que pueden afectar su calidad tales como: *E. coli*^{10,11},

coliformes totales¹¹, *C. perfringens*^{10,11}, *Salmonella*¹⁰, *Enterococcus*⁶, colifagos somáticos⁶, *Enterovirus*⁶, *Cryptosporidium*⁶, *Giardia*¹² y huevos de helminto¹¹.

Por lo anterior, se ha impulsado el desarrollo de tecnologías alternas a los procesos convencionales para cumplir con los estándares de calidad de agua para su reutilización y potabilización, debido a la ineficiencia o inconvenientes que generan los tratamientos actuales. Entre las diferentes alternativas para tratamiento de agua, los procesos avanzados de oxidación (PAO) han mostrado ser métodos de desinfección eficientes y ambientalmente amigables. En este contexto la fotocatalisis heterogénea y el proceso foto-Fenton han surgido como técnicas prometedoras para la eliminación de microorganismos en diversas matrices acuosas, incluyendo varios tipos de bacterias, hongos, virus y protozoos^{8,9,13-16}.

La fotocatalisis heterogénea inicia por la activación con luz de un semiconductor, siendo el dióxido de titanio (TiO₂) el de mayor uso en la actualidad. El TiO₂ tiene diversas ventajas tales como nula toxicidad, alta estabilidad química y bajo costo¹⁷. Sin embargo, puede generar diferentes resultados en el proceso dependiendo de las propiedades ópticas y texturales producidas por el método de síntesis, por la incorporación de impurezas metálicas o no metálicas, etc.

Cuando la superficie del TiO₂ es irradiada con fotones (provenientes de una fuente artificial o solar) de energía igual o mayor que la de su banda prohibida (E_g), los electrones de la banda de valencia (BV) del semiconductor son promovidos a la banda de conducción (BC) vacía (e_{BC}^-), generando huecos cargados positivamente (h_{BV}^+). Con los electrones fotogenerados se reduce el oxígeno disuelto formando radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroperoxilo ($\cdot OOH$) y entre sus subsecuentes reacciones de reducción, puede eventualmente generarse peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo ($\cdot OH$). Los huecos producidos en la BV oxidan el agua para formar radicales $\cdot OH$ (la representación gráfica del proceso fotocatalítico se encuentra esquematizada en la Figura 1)¹⁸. Estas especies formadas son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales son responsables de las propiedades desinfectantes de este proceso fotocatalítico debido a que pueden atacar e inactivar microorganismos en agua^{13,19}. En el caso de las bacterias, las ROS se unen a la pared

celular bacteriana, induciendo daño celular a través de diversos procesos como una rápida fuga de iones potasio, peroxidación de los lípidos de la membrana y daño al ácido nucleico de la misma¹⁹.

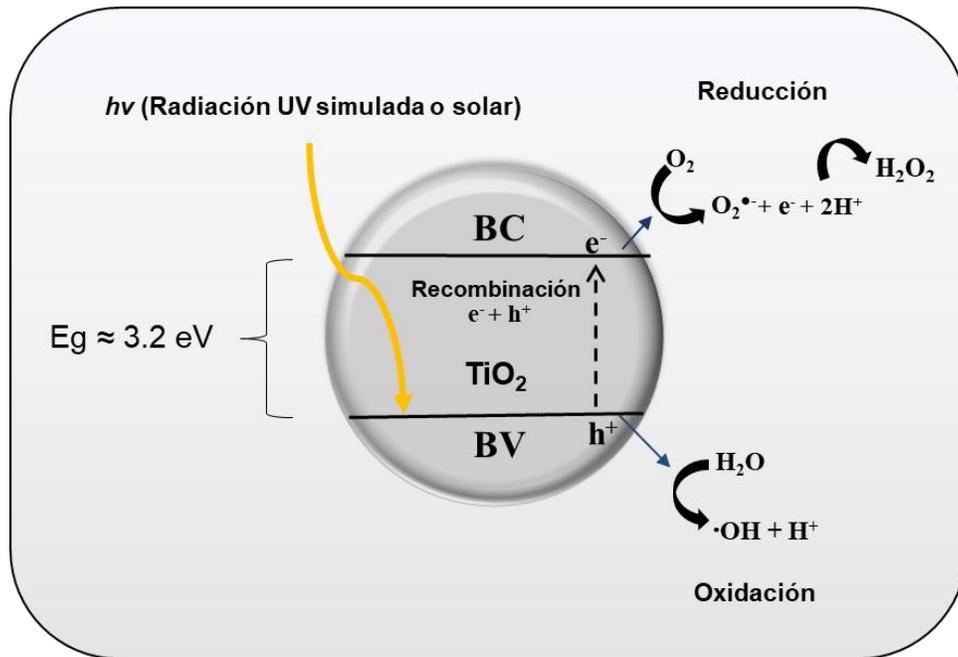


Figura 1. Representación del proceso fotocatalítico en una partícula de fotocatalizador TiO_2 en suspensión.

El TiO_2 posee algunas desventajas en su uso como es la recombinación del par electrón-hueco (e^-/h^+), reduciendo la eficiencia del proceso de fotocatalisis, además de que posee una E_g amplia (3.2 eV o $\lambda < 387 \text{ nm}$) por lo cual requiere para su excitación radiación ultravioleta. Sin embargo, en la radiación solar solamente se encuentra un 5% en el dominio UV, por lo cual se han planteado diferentes estrategias para mejorar la eficiencia fotocatalítica en la región visible y reducir la recombinación del par electrón-hueco (e^-/h^+). Una de estas estrategias es la incorporación en la estructura del TiO_2 de metales de transición como cobre, cobalto, manganeso y plata, entre otros. Estos metales amplían el espectro de absorción del semiconductor hacia la región de luz visible, a medida que se van formando nuevos niveles de energía entre la banda de valencia y la de conducción⁸. En este contexto, el cobre y la plata han sido satisfactoriamente incorporados en el TiO_2 individualmente, mejorando la eficiencia del proceso de

eliminación de diferentes agentes patógenos²⁰⁻²⁶. En la mayoría de los casos se reporta que la causa principal de eliminación se debe a los radicales hidroxilo, sin embargo, también se conoce que ambos metales (Cu y Ag) exhiben una alta actividad antibacteriana para un rango amplio de bacterias lo cual puede aumentar la eficiencia del proceso; además, estos metales no presentan toxicidad a bajas concentraciones para los seres humanos²². Los límites permisibles en agua de consumo humano son 1.0 a 2.0 mg/L para el cobre según las normas oficiales mexicanas NOM-127-SSA1-1994 y NOM-201-SSA1-2015. Los límites permisibles de plata en agua de consumo humano en México no se encuentran legislados, sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y la WHO (Organización Mundial de la Salud) recomiendan que no supere los 0.1 mg/L^{7,27}.

Estudios recientes han reportado la síntesis de TiO₂ co-dopados con Ag y Cu para la eliminación de colorantes como el naranja de metilo y ácido salicílico en agua^{28,29}. En estos estudios se observó una mejora en la actividad fotocatalítica de los materiales co-dopados comparados con los materiales dopados individualmente o con TiO₂ sin dopar, mostrando una sinergia cuando la plata y cobre son usados como dopantes simultáneamente. Sin embargo, pocos estudios han reportado la evaluación fotocatalítica del catalizador Ag-Cu/TiO₂ para la inactivación de microorganismos patógenos.

En este sentido, Rao y *col.*, en 2016 reportaron que nanofibras de Ag-Cu/TiO₂ permitieron la completa inactivación de virus y bacterias en 30 min, sin embargo utilizaron radiación UV de muy alta energía ($\lambda = 254$ nm) proveniente de lámparas³⁰. Por otra parte, Martínez-Montelongo y *col.*, en 2020 estudiaron la inactivación de bacterias gram-negativas y gram-positivas en aire usando el catalizador Ag@TiO₂-Cu²⁺/perlita, logrando casi la total eliminación (99%) para concentraciones muy bajas de bacterias (10² UFC/mL) en tiempos muy prolongados de tratamiento (5 h), irradiando con luz UV-Vis proveniente de lámparas LED³¹. Sin embargo, el catalizador Ag-Cu/TiO₂ estudiado en esta investigación no había sido reportado suspendido en agua para la desinfección de microorganismos ni usando radiación solar.

Por otra parte, el método de síntesis define en gran medida las propiedades de los materiales y la incorporación de agentes dopantes en el semiconductor. En este contexto,

el método sol-gel es un proceso de síntesis en el cual, partiendo de precursores moleculares como sales inorgánicas o alcóxidos metálicos, se obtiene un esqueleto del óxido mediante reacciones de hidrólisis y polimerización a baja temperatura, lo cual permite la síntesis de fases metaestables del óxido e incluso de sólidos mixtos orgánico-inorgánicos³². Entre las principales ventajas de este proceso se encuentran: alta homogeneidad de los geles y materiales obtenidos, bajas temperaturas de operación, posibilidad de obtención de sólidos cristalinos y no cristalinos, debido a que se pueden regular varios parámetros como pH, temperatura, tipo de precursores, concentración de reactivos, tiempo y temperatura de envejecimiento, aditivos, cantidad de agua utilizada, etc. Además, otra gran ventaja que tiene este proceso es que durante alguna etapa de la síntesis es posible incorporar diferentes tipos de dopantes (metálicos o no metálicos). La incorporación de un dopante activo en el sol durante la etapa de gelificación permite que las especies a incorporar tengan una mejor interacción con el soporte de tal manera que se puedan mejorar las propiedades fotocatalíticas del material ¹⁷.

El proceso sol-gel inicia con la preparación de una disolución homogénea del alcóxido disuelto en un disolvente orgánico (generalmente alcoholes), donde posteriormente se inicia la hidrólisis del precursor por adición de agua (acidificada o alcalina) la cual conduce a la formación de enlaces M-OH. Paralelamente comienza el proceso de condensación, el cual conduce a la generación de moléculas de agua o de alcohol, mediante procesos de olación (formación de puentes de OH) u oxolación (formación de puentes de oxígeno) formando enlaces M-O-M, y así iniciando el proceso de polimerización que lleva a la formación del sol. El sol es una suspensión estable de partículas coloidales en un líquido, las partículas pueden ser amorfas o cristalinas y pueden tener estructuras densas, porosas o poliméricas. Subsecuentemente, al ser adicionada más agua se siguen dando las reacciones de hidrólisis y condensación las cuales conducen al crecimiento de clústeres, que eventualmente colisionan y se enlazan dando la formación del gel. El gel es una red sólida porosa, que forma un esqueleto tridimensional que rodea y soporta una fase líquida (gel húmedo). En la mayoría de los sistemas sol-gel para la síntesis de materiales de óxido la gelificación se debe a la formación de enlaces covalentes entre las partículas de sol. Adicionalmente, se debe realizar un envejecimiento del gel, en el cual ocurren procesos de cambio en la estructura y propiedades del gel, siendo principalmente

reacciones adicionales de hidrólisis, condensación y polimerización. Posteriormente el gel envejecido se seca a condiciones ambientales para producir un xerogel o a condiciones supercríticas para producir un aerogel. Finalmente, este gel se le da un tratamiento térmico adecuado para conseguir el óxido metálico deseado^{17,32,33}. La representación gráfica de este proceso y las reacciones que suceden en el mismo se encuentran descritas en la Figura 2.

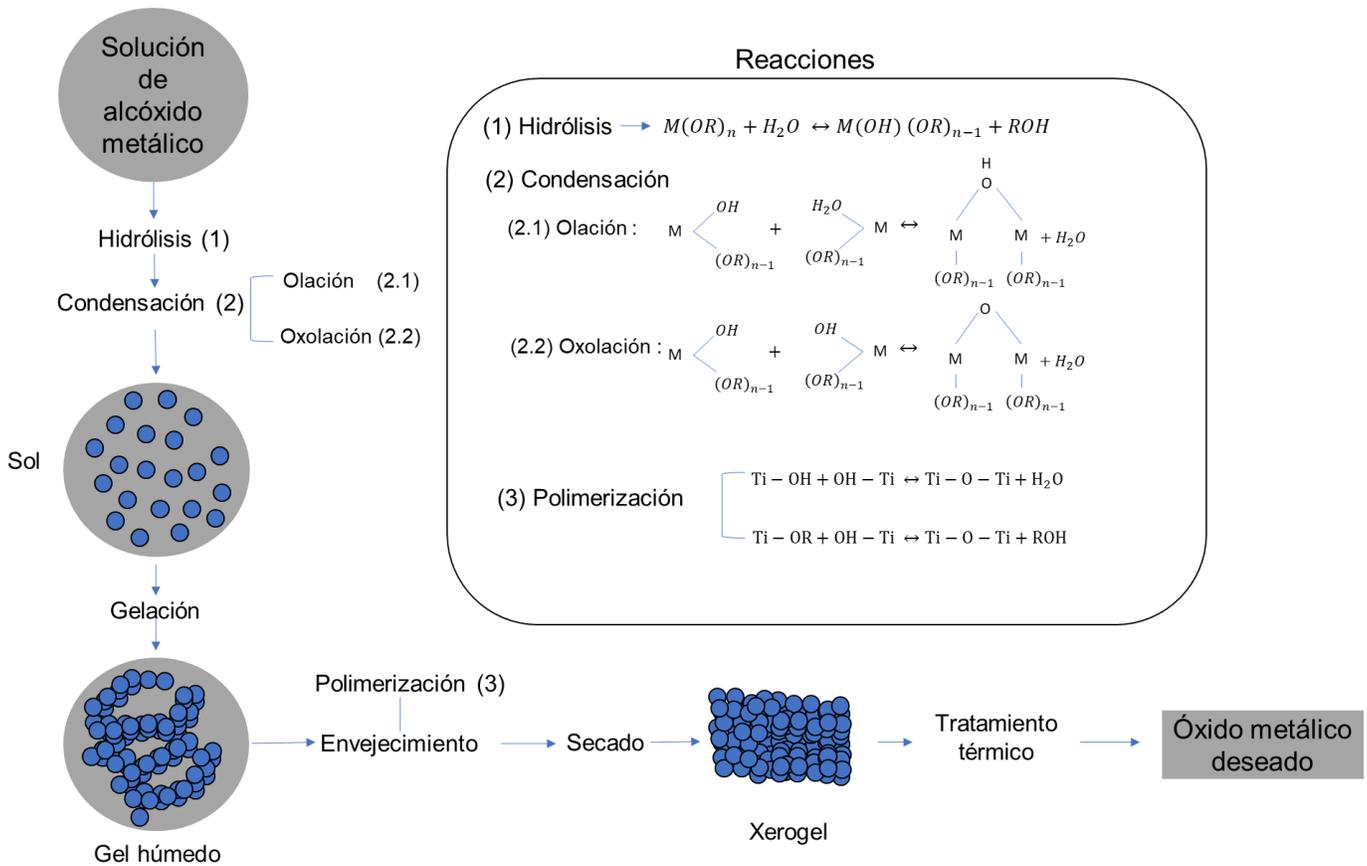
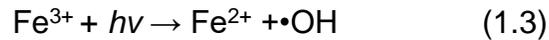
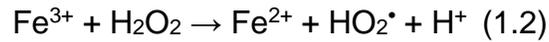
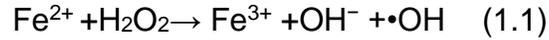


Figura 2. Representación gráfica resumida del proceso sol-gel para síntesis de óxidos metálicos.

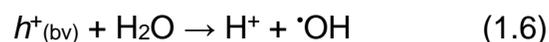
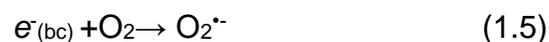
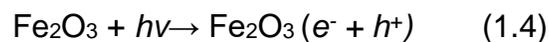
Adicionalmente, otro de los procesos avanzados de oxidación que ha mostrado buenos resultados en la descontaminación y eliminación de agentes patógenos en agua es el foto-Fenton. En este proceso, el peróxido de hidrógeno reacciona con especies de hierro (Fe^{2+} o Fe^{3+}) generando ROS tales como radicales hidroxilo e hidroperóxidos mediante reacciones conocidas como Fenton (ecuación 1.1 y 1.2); donde el hierro actúa como catalizador, el cual es oxidado. Adicionalmente, la radiación solar ayuda a regenerar el

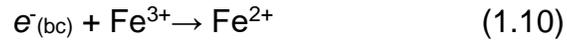
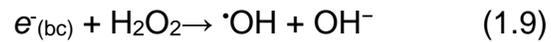
Fe²⁺ por la reducción de complejos de Fe³⁺ formados en el proceso, que conducen a la producción adicional de radicales •OH (ecuación 1.3) ³⁴.



El proceso foto-Fenton presenta ventajas como la facilidad de inactivar microorganismos con estructuras simples, complejas o resistentes, además de ser un proceso sencillo, de bajo costo y amigable con el medio ambiente³⁵. Sin embargo, se ve limitado a ciertos rangos de pH (2.5-3.0)³⁶, debido a que el pH controla la solubilidad de las especies de hierro y puede interferir indirectamente en la producción de •OH ³⁷, y en consecuencia, afectar la eliminación de los microorganismos presentes en la disolución. Por esto, es necesario determinar para cada caso, las condiciones del proceso, tales como dosis y fuente de Fe y H₂O₂, temperatura de operación, fuente de radiación y concentración de materia orgánica, que permitan mejorar su desempeño a pH neutro. Cuando se trabaja a pH cercanos al neutro, el proceso Fenton deja de actuar como catálisis homogénea y se lleva a cabo bajo condiciones heterogéneas, debido a que el hierro se encuentra en suspensión.

Una estrategia que se ha implementado para mejorar el rendimiento del proceso foto-Fenton a este rango de pH (6-7) es el uso de óxidos minerales de hierro como goethita (α-FeOOH), hematita (α-Fe₂O₃), maghemita (γ-Fe₂O₃), wüstita (FeO) y magnetita (Fe₃O₄), que además de ser compuestos no tóxicos, pueden presentar propiedades fotocatalíticas (ecuaciones 1.4-1.10), por el hierro contenido, lo que contribuiría positivamente en la eficiencia de los procesos de descontaminación y eliminación¹⁴.





Por lo anterior, en el presente estudio, se incorporaron diferentes porcentajes de plata y cobre en el TiO_2 ($Ag-Cu/TiO_2$) mediante el método sol-gel para evaluar la cantidad de incorporación que permite un mejor efecto en la inactivación de bacterias gram-negativas comúnmente encontradas en agua residual (*E. coli* y *S. typhimurium*) cuando el catalizador es irradiado con luz solar.

El proceso de fotocatalisis heterogénea fue comparado con el desempeño fotocatalítico del tratamiento foto-Fenton solar a pH neutro con hematita ($\alpha-Fe_2O_3$) y maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) en la eliminación de ambas bacterias en diferentes matrices acuosas. Adicionalmente, todos los catalizadores utilizados en ambos procesos fueron caracterizados por diferentes técnicas como DRX, espectroscopia Raman, fisisorción de N_2 , DRS, EAA, SEM y XPS.

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Determinación de agentes patógenos en agua residual de plantas tratadoras.

La presencia de diferentes agentes patógenos ha sido reportada en aguas residuales antes y después de su tratamiento en diferentes PTAR. En la Tabla 1 se muestran algunos estudios donde se detectaron diversos microorganismos patógenos a largo del proceso de tratamiento.

Tabla 1. Estudios sobre determinación de agentes patógenos en agua residual de PTAR

Autores	Lugar	Microorganismos estudiados	Concentración inicial	Tipo de tratamiento	Concentración Final
Lin Y Wen y col. (2016) ⁴	PTAR para su reuso (industrial y agrícola), China	<i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> spp	10 ³ UFC/mL	Secundario (biológico y sedimentación)	10 ² UFC/mL
			10 ² UFC/mL	Terciario (ultrafiltración, ozonización y cloración, UV)	10 ¹ UFC/mL
Priscila Ribeiro y Luiz Daniel (2016) ³⁸	PTAR, Brasil	<i>Giardia</i> spp cysts y <i>Cryptosporidium</i> spp Oocysts	1.89 x 10 ⁴ quistes/L <i>giardia</i> spp	Secundario (biológico y fisicoquímico (coagulación, floculación y flotación))	2.35 x 10 ² quistes/L <i>giardia</i> spp
			1.35 x 10 ² quistes/L Cryptosporidium spp		0.59 x 10 ¹ quistes/L <i>Cryptosporidium</i> spp.
Caroline Ajonina y col. (2015) ¹¹	PTAR, Alemania	Coliformes fecales, <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	2.5 a 8.1 x 10 ³ UFC/mL (<i>E. coli</i> y coliformes fecales) 5 a 9 x 10 ² NMP/100 mL (<i>C. perfringens</i>)	Secundario (biológico y sedimentación)	10 ² a 10 ¹ UFC/mL (<i>E. coli</i> y coliformes fecales) 10 ² NMP/100 mL (<i>C. perfringens</i>)
Caroline Ajonina y col. (2013) ¹²	PTAR, Alemania	<i>Giardia</i> CYSTS	50-7548 quistes/L	Secundario	30- 3250 quistes/L
Nathalie Wéry y col. (2008) ¹⁰	PTAR, Francia	<i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> y <i>Clostridium perfringens</i>	1.8 x 10 ⁷ - 8.7 x 10 ⁶ Copias del gen/mL (<i>E. coli</i>) 8.5 x 10 ² - 4.8 x 10 ² Copias del gen/mL (<i>Salmonella</i> spp) 4.5 x 10 ³ - 2.8 x 10 ² Copias del gen/mL (<i>C. perfringens</i>)	Secundario (biológico y fisicoquímico)	1.6 x 10 ³ - 4.3 x 10 ³ Copias del gen/mL (<i>E. coli</i>) 3.3x 10 ¹ - 0 Copias del gen/mL (<i>Salmonella</i> spp) 2.7 - 5.1 x 10 ¹ Copias del gen/mL (<i>C. perfringens</i>)

Entre los hallazgos más importantes realizados por los investigadores citados en la Tabla 1 está el de Lin Y Wen y col., quienes en 2016 encontraron que en los sistemas de distribución de las PTAR investigadas la concentración de las bacterias volvió a aumentar hasta un rango de 10^1 a 10^2 UFC/mL, mostrando que las bacterias solamente entran en un estado viable pero no cultivable (VBNC, por sus siglas en inglés), las cuales son propensas a reactivarse y reproducirse en ausencia de cloro residual. Finalmente, observaron que *Salmonella* fue más resistente a la desinfección por cloración que *E. coli*.⁴

Por otra parte, los estudios realizados por otros investigadores descritos en la Tabla 1, muestran que los tratamientos biológicos y fisicoquímicos no son efectivos en la eliminación de diferentes agentes patógenos, encontrándose aun en el efluente de las PTAR cantidades importantes de microorganismos. Otro hallazgo reportado fue que el tratamiento biológico presenta mejores resultados en la eliminación de microorganismos comparado con los tratamientos fisicoquímicos.

Existen otros estudios en los cuales se reporta la misma tendencia de las investigaciones anteriores. Kitajima y col. en 2014 encontraron la presencia de tres protozoos (*Cryptosporidium*, *Giardia* y *Cyclospora*) en diferentes etapas de tratamiento de una PTAR, observando concentraciones considerables de estos microorganismos en la salida de tratamientos secundarios (biológicos) y hasta en agua residual tratada a la salida de tratamientos terciarios (químicos)³⁹. Del mismo modo Costán-Longares y col. detectaron la presencia de indicadores microbianos (coliformes totales, *Escherichia coli*, enterococos, esporas de *Clostridium* sulfito reductor, colifagos somáticos, entre otros) y dos patógenos (enterovirus y *Cryptosporidium*) en el influente y efluente de una PTAR en España⁶.

1.1.2. Eliminación de agentes patógenos mediante catalizadores de TiO₂ dopados con metales

La eliminación de diferentes microorganismos patógenos se ha llevado a cabo mediante fotocátalisis heterogénea usando diversos catalizadores de dióxido de titanio dopados con metales, los cuales han mostrado resultados satisfactorios en la desinfección de agua. La Tabla 2 muestra una selección de estudios pertinentes.

Tabla 2. Estudios sobre la eliminación de agentes patógenos en agua por medio de fotocatalisis heterogénea utilizando TiO₂ dopados con metales

Autores	Tipo de síntesis del material (precursores)	Tipo de catalizador (cantidad usada)	Microorganismo	Conc inicial (UFC/mL)	Tipo de radiación	Tiempo de tratamiento	Eliminación (%)
Liu B. y col. (2020) ⁴⁰	Co-precipitación (TiO ₂ P25 y Cu(NO ₃) ₂)	TiO ₂ /Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃ 1.8 mol% (1 g/L)	<i>E. coli</i> y <i>Fusarium graminearum</i>	10 ⁷ -10 ⁴	Solar simulada (300 W lámpara de xenón)	80 min	100
Lara-Rico y col. (2019) ⁴¹	Co-precipitación y molienda mecánica	α-FeOOH-TiO ₂ 1:3 (0.3 g/L)	<i>E. coli</i>	10 ⁶ -10 ⁷	UVA (λ _{max} =365 nm) y luz Visible (1.8 W lámpara led, λ=420 a 620 nm)	4 h	100 con UVA 99.9 con Luz visible
Sreeja S. y col. (2016) ²³	Hidrólisis de TTEAIP y posterior reducción de metales en DMF	Ag@TiO ₂ (0.4 g/L)	<i>E. coli</i>	10 ⁸	UV (2 x 18W)	1 h	100
Majeda Khraish eh y col. (2015) ⁴²	Impregnación húmeda (CuCl ₂)	Cu-TiO ₂ 10%mol (1 g/L)	<i>E. coli</i>	10 ⁶	UVA (λ _{max} =365 nm)	1 h	100
Yi Li y col. (2015) ²⁵	Solvotermal e impregnación húmeda (AgNO ₃)	Ag-TiO ₂ 1.23% m/m (0.2 g/L)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ⁸	UV (λ _{max} =254 nm)	2 h	99.99
Xiao G. y col. (2015) ⁴³	Impresión adsorbente (AgNO ₃)	Ag-chitosan-TiO ₂ 1.67% m/m (0.3 g/L)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>	10 ⁷ -10 ⁵	Luz visible (20W lámpara fluorescente)	2 h	99
Hemraj Yadav y col. (2014) ⁴⁴	Sol-gel (CuSO ₄)	Cu-TiO ₂ 3% mol (0.2g/L)	<i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁸	Luz visible (8 x 8W lámparas fluorescentes)	2 h (<i>S. aureus</i>) 4 h (<i>E. coli</i>)	100 100
Danae Venieri y col. (2014) ⁸	Co-precipitación	Mn/Co-TiO ₂ 0.04% m/m, Co-TiO ₂ 1% m/m de Co y Mn-TiO ₂ 0.1% m/m (0.25g/L)	<i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	10 ⁶	Solar simulada (150W lámpara de xenón)	10 min	100
Mike Fisher y col. (2013) ⁴⁵	Sol-gel, deposición (Cu(NO ₃) ₂ y urea)	Cu-TiO ₂ depositado en botella de plástico	<i>E. coli</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>	10 ⁶	Luz solar natural (450-500 W/m ²) con filtro UV	1 h	100

Entre los resultados más relevantes se encontró que los microorganismos se eliminan completamente en tiempos de tratamiento que varían entre 10 min y 4 h, siendo más efectivos los tratamientos cuando se utiliza luz solar natural o simulada que cuando se utilizan lámparas UV o luz visible. Además, se encontró que algunos materiales tuvieron

un efecto bactericida en ausencia de luz como el Ag-TiO₂ dopado con 1.23 % m/m a una cantidad de catalizador de 0.2 g/L. Esta actividad fue atribuida a la combinación de las especies de Ag presentes²⁵. Sin embargo, en otros casos, algunos catalizadores como el Cu-TiO₂ 3% mol con una carga de catalizador de 0.2 g/L, en ausencia de luz mostró una nula actividad bactericida⁴⁴. También se encontró en algunos estudios que los catalizadores con iones metálicos incorporados lograron mejorar la actividad fotocatalítica en un factor de 2 a 3 veces con respecto al catalizador TiO₂ sin modificar, obteniendo una completa eliminación de las bacterias en 10 min de tratamiento, usando luz solar simulada y una cantidad de catalizador de 0.25 g/L ⁸.

Por último, diversos estudios han demostrado la eficiencia de los catalizadores de TiO₂ dopados con metales individualmente en especial Ag y Cu para la eliminación de agentes patógenos en agua usando cantidades de catalizador en un rango de 0.02 a 2 g/L, los cuales han sido principalmente sintetizados por el método sol-gel, impregnación húmeda, core-shell, entre otros; con porcentajes de incorporación de metal desde 0.1 hasta 9% m/m^{21,24,26,45-51}.

1.1.3. Eliminación de agentes patógenos y contaminantes emergentes mediante catalizadores de TiO₂ co-dopados con plata y cobre

El proceso de fotocatalisis heterogénea usando los catalizadores de TiO₂ co-dopado con plata y cobre, ha tomado interés en la última década, sin embargo, son pocos los estudios que se han llevado a cabo para la eliminación de contaminantes emergentes y agentes patógenos utilizando este tipo de materiales. A continuación, se presentan algunos estudios en donde se evidencia la eficiencia de estos materiales co-dopados para la descontaminación de agua.

El uso del catalizador Ag-Cu/TiO₂ en la eliminación de contaminantes orgánicos principalmente se ha centrado en la eliminación de ácido salicílico y colorantes. En este contexto, Bhardwaj y col. en 2018 sintetizaron los materiales Ag-Cu/TiO₂ y los catalizadores dopados individualmente, por el método de fotodeposición en porcentajes de incorporación entre 1 y 3% m/m. Estos materiales fueron evaluados en la degradación

de azul de metileno y ácido salicílico bajo radiación UV y visible, el material Ag-Cu/TiO₂ 1.0:2.0 % m/m mostró la mejor actividad fotocatalítica, siendo de 2 a 4 veces más rápido en la eliminación de ambos compuestos comparado con los materiales base o dopados individualmente, este comportamiento fue atribuido a un efecto sinérgico, mayor presencia de sitios activos en la superficie y además una mayor activación en la región visible ²⁸.

Jalali y col. en 2017 mediante el método sol-gel sintetizaron nanopartículas de TiO₂ y posteriormente mediante el método de impregnación húmeda fueron co-dopadas con nanopartículas de Ag y Cu entre 0.07 y 1.50 % mol. El desempeño fotocatalítico de estos catalizadores fue evaluado en la degradación de naranja de metilo. El catalizador Ag-Cu/TiO₂ 1.30:0.03 % mol presentó los mejores resultados de degradación, atribuyendo este resultado a la reducción de su E_g (de 3.14 a 2.87 eV), siendo activo el material a longitud de ondas mayores. Además, presentó una menor recombinación del par electrón-hueco comparado con los otros catalizadores estudiados. Por último encontraron que el catalizador co-dopado fue dos veces más eficiente que el material sin dopar⁵².

La misma tendencia de los estudios anteriores se observó en el estudio de Monga y col. en 2017, en el cual se degradó ácido salicílico bajo radiación visible y encontraron que la velocidad de degradación del contaminante fue dos veces más rápida cuando se usó el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ que el material sin dopar.

Por otra parte, pocos estudios muestran el desempeño fotocatalítico de este catalizador en la eliminación de agentes patógenos como el de Martínez-Montelongo y col. que en 2020 sintetizaron el catalizador Ag@TiO₂-Cu²⁺/perlita por el método sol-gel seguido del método de impregnación húmeda. Este material fue utilizado para la inactivación de bacterias gram-negativas (*E. coli* y *Y. enterocolitica*) y gram-positivas (*S. aureus*) en aire de interiores (clínica dental) utilizando como fuente de radiación lámparas LEDs que emiten luz UV- Visible. Lograron una inactivación del 99% (reducción de 2-log) de todas las bacterias en 5 h de tratamiento, siendo más efectivo que el tratamiento llevado a cabo con los catalizadores TiO₂ P25 y TiO₂-Cu²⁺. La mejor actividad del material Ag@TiO₂-Cu²⁺/perlita fue atribuida a la disminución de la recombinación del par electrón-hueco que permitió el aumento en la producción de ROS³¹.

También, Rao y col., en 2016 reportaron la síntesis de nanofibras de Ag-Cu/TiO₂. La síntesis se llevó a cabo en dos pasos, se sintetizaron las nanofibras de TiO₂ a través de un proceso hidrotérmal y posteriormente la plata fue fotodepositada y el cobre añadido mediante un proceso de absorción. La membrana de nanofibras de Ag-Cu/TiO₂ permitió la completa inactivación del virus bacteriófago MS2 (reducción de 4.02 log) y de *E. coli* (reducción de 7.68 log) en 30 min, sin embargo, utilizaron radiación UV de alta energía ($\lambda = 254$ nm) proveniente de lámparas. Adicionalmente, encontraron que el material codopado presentó mejor eficiencia en la desinfección de ambos microorganismos que los materiales Ag-TiO₂, Cu-TiO₂ y TiO₂, tanto en ausencia como en presencia de radiación. Este comportamiento fue atribuido al efecto bactericida de los iones plata y cobre liberados en el agua y la sinergia entre los iones metálicos incorporados en las nanofibras de TiO₂, lo que provocó una mejora en la actividad fotocatalítica de la membrana³⁰.

Otros estudios como los de Angelov y col. y Stoyanova y col. ambos en 2016, se han centrado en explorar la actividad bactericida de películas delgadas de TiO₂ dopado con Ag y Cu depositadas sobre sustratos de vidrio para su uso como recubrimientos antibacterianos, logrando la inactivación completa de bacterias gram-negativas y gram-positivas en periodos entre 4 y 10 h de tratamiento^{53,54}.

Sin embargo, la actividad del catalizador Ag-Cu/TiO₂ estudiado en esta investigación no había sido investigada en suspensión en agua para la desinfección de microorganismos usando radiación solar.

1.1.4. Eliminación de agentes patógenos mediante foto-Fenton utilizando óxidos minerales de hierro

El proceso foto-Fenton heterogéneo ha mostrado gran eficacia en la desinfección de agua, en donde los estudios recientes se han centrado en trabajar en condiciones de pH cercano al neutro (6.0 a 7.5) con bajas dosis de hierro proveniente de óxidos minerales (wüstita, maghemita, magnetita hematita y goethita).

En este contexto, Stefanos Giannakis y col. en 2017, investigaron el proceso foto-Fenton heterogéneo a pH 6 y 7 utilizando los óxidos de hierro wüstita, maghemita y magnetita

adicionando H_2O_2 a bajas concentraciones bajo radiación solar para la desinfección del colifago MS2 a una cantidad de 10^6 UFP/mL en agua residual simulada. Encontraron que los óxidos de hierro en ausencia de H_2O_2 poseen una capacidad limitada para inactivar el virus, debido a que actúan sólo como fotocatalizadores. Sin embargo, cuando se adicionó el H_2O_2 mejoró en gran medida el proceso, debido a las reacciones foto-Fenton que se llevan a cabo en la superficie de los óxidos utilizados, siendo el pH un factor importante debido a que en este rango se encuentra el punto isoeléctrico de estos materiales. El mejor resultado de eliminación se logró a pH 7 utilizando 1 mg/L de maghemita y nano- maghemita obteniendo una completa desinfección en 20 y 15 min respectivamente, con una proporción óxido de hierro: H_2O_2 de 1:5¹⁴.

C. Ruales-Lonfat y col. en 2015, estudiaron la actividad fotocatalítica de cuatro diferentes óxidos minerales de hierro (hematita, goethita, wüstita y magnetita) para la eliminación de *E. coli* a una cantidad inicial de 10^5 UFC/mL a pH neutro en ausencia o presencia de H_2O_2 . Se encontró que los procesos de fotocatalisis heterogénea y/o foto-Fenton utilizando hematita, goethita y wüstita con bajas concentraciones de reactivos (0.6 mg/L de Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2) bajo luz solar fueron útiles como métodos de desinfección de *E. coli* en agua. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando los óxidos de hierro hematita, goethita y wüstita, con los cuales se alcanzó una completa eliminación en 90 min de tratamiento. Por otra parte, la hematita y goethita mostraron una buena actividad antibacteriana bajo radiación solar en ausencia de H_2O_2 logrando una eliminación completa de *E. coli* en 120 min. Además, se observó que, a excepción de la magnetita que necesita H_2O_2 como aceptor de electrones, todos los demás óxidos de hierro fueron fotoactivos bajo radiación solar aún en ausencia de H_2O_2 ; por último, estudiaron la reactivación de las bacterias después del tratamiento el cual fue nulo⁵⁵.

Otros estudios han utilizado el proceso foto-Fenton para la eliminación de agentes patógenos en agua mediante óxidos minerales de hierro (wüstita, maghemita, magnetita, hematita y goethita) a pH cercano al neutro, sin embargo, los únicos agentes patógenos que han sido objeto de estudio son los dos reportados previamente, la bacteria *E. coli* y el virus Colifago MS2⁵⁶⁻⁵⁸.

1.1.5. Análisis crítico de la literatura

De acuerdo con los estudios que han sido reportados hasta el momento, se observa una problemática existente de contaminación del agua por agentes patógenos, en donde los tratamientos secundarios (principalmente tratamientos biológicos) de las PTAR no son efectivos para la eliminación de estos microorganismos debido a que no han sido diseñados para este propósito. Además, se ha reportado en algunos estudios la presencia de concentraciones aún considerables de agentes patógenos después de tratamientos terciarios (químicos) y en las redes de distribución del agua tratada; siendo algunos de los microorganismos más comúnmente encontrados las bacterias gram-negativas *Escherichia coli* y *Salmonella* spp, donde los límites permisibles para estas bacterias es no detectable para ambas en agua para uso y consumo humano (NOM-127-SSA1-1994) y de 2.4 NMP/mL para coliformes fecales en agua residual tratada para su reúso, la *Salmonella* spp para este fin no está regulada. Por lo anterior es importante buscar alternativas a los procesos convencionales de desinfección para la completa eliminación de estos microorganismos en agua antes de su disposición o reúso.

Como ya se mencionó anteriormente, entre las alternativas más importantes se encuentran los procesos avanzados de oxidación, principalmente la fotocátalisis heterogénea y el proceso foto-Fenton. En el proceso de fotocátalisis heterogénea se han reportado diversos catalizadores los cuales han mostrado buenos resultados en la eliminación de diferentes agentes patógenos, entre estos materiales se encuentran los catalizadores de TiO_2 dopados con metales, principalmente los modificados individualmente con Ag o Cu. Sin embargo, el uso de catalizadores de TiO_2 co-dopados con Ag y Cu, ha sido poco reportado y sólo se ha estudiado en la degradación de algunos compuestos orgánicos y muy pocos son los trabajos en donde usan este material con fines de desinfección. Por tanto, hasta nuestro conocimiento, este material Ag-Cu/ TiO_2 no había sido explorado para la desinfección de agua bajo luz solar simulada, utilizando el fotocatalizador en dispersión en el agua a tratar.

Además, cuando se han utilizado estos metales como dopantes individualmente o co-dopados, generalmente se han usado como fuentes de radiación lámparas UV y visibles, encontrándose pocos reportes donde trabajen bajo radiación solar. Por lo anterior, en

esta investigación se propone realizar la síntesis del material co-dopado Ag-Cu/TiO₂ por el método sol gel para la eliminación de dos agentes patógenos *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* utilizando radiación solar simulada.

Por otra parte, el proceso foto-Fenton heterogéneo utilizando óxidos minerales de hierro, peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones y pH cercano al neutro (6.5 a 7.5), también ha mostrado buena eficacia en la eliminación de agentes patógenos, obteniendo los mejores resultados cuando se usan óxidos de hierro (III) tales como maghemita y hematita bajo radiación solar. Sin embargo, son pocos los estudios realizados con óxidos de hierro para eliminación de microorganismos.

Así mismo, cabe resaltar que el uso de estos procesos anteriormente mencionados no ha sido evaluado en la inactivación de microorganismos en efluentes o matrices reales, por lo cual, en este estudio se evaluarán los dos procesos en una matriz de un efluente secundario de una planta tratadora de agua residual.

Adicionalmente, es importante realizar un estudio comparativo entre los procesos de fotocátalisis heterogéneo y foto-Fenton para evaluar su efectividad en la eliminación de los mismos microorganismos y considerar el más adecuado en términos de efectividad y tiempo de tratamiento, ya que el proceso por fotocátalisis heterogénea requiere solamente el uso del catalizador y luz, mientras que el proceso foto-Fenton implica la adición de un agente químico como el peróxido de hidrógeno.

Por lo tanto, se plantea en este proyecto, realizar el estudio de la inactivación simultánea de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, por fotocátalisis heterogénea con el catalizador propuesto y comparar su eficiencia con la obtenida por el proceso foto-Fenton heterogéneo con el fin de proponer una metodología eficiente para desinfección de agua residual.

2. APORTACIÓN CIENTÍFICA

Desarrollo de metodologías alternas a los tratamientos convencionales para la eliminación de agentes patógenos en agua residual, basadas en procesos fotocatalíticos heterogéneos como la fotocatalisis con el catalizador Ag-Cu/TiO₂ y el proceso foto-Fenton con óxido de hierro (III) a pH cercano al neutro.

3. HIPÓTESIS

La fotocatalisis heterogénea usando TiO₂ modificado con Ag y Cu y el tratamiento foto-Fenton heterogéneo con maghemita y hematita (Fe₂O₃) inactivan completamente las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, utilizando radiación solar simulada a través de diferentes mecanismos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inactivación de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* en agua mediante los procesos de fotocatalisis heterogénea usando catalizadores de TiO₂ dopados con Ag, Cu y Ag-Cu y el foto-Fenton heterogéneo para determinar cuál proceso es más efectivo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar un muestreo en una planta tratadora de agua residual (PTAR) para detectar la presencia de *E. coli* y *Salmonella* spp en diferentes etapas del tratamiento.
- Sintetizar los catalizadores de dióxido de titanio modificados con diferentes cantidades de plata y cobre mediante el método sol-gel.
- Caracterizar los materiales mediante difracción de rayos X (XRD), espectroscopia Raman, espectroscopia infrarroja, microscopía electrónica de barrido (SEM),

fisisorción de N₂ (método BET), espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), espectroscopia UV-Vis con reflectancia difusa y espectroscopia de absorción atómica.

- Evaluar la actividad fotocatalítica de los catalizadores, implementando un diseño de experimentos central compuesto centrado en las caras, variando la cantidad de catalizador, porcentaje de incorporación de Ag y Cu, obteniendo como respuesta la inactivación de los microorganismos de estudio en función de la disminución de UFC/mL.
- Evaluar el proceso foto-Fenton heterogéneo a pH neutro utilizando bajas concentraciones de óxido de hierro (III) (Fe₂O₃) y peróxido de hidrógeno en la inactivación de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, variando cantidad de catalizador y H₂O₂.
- Comparar la eficacia de ambos procesos en la inactivación de los microorganismos modelo en el efluente del tratamiento secundario de una PTAR.
- Evaluar el efecto de los procesos sobre la estructura bacteriana mediante las técnicas de SEM.

5. METODOLOGÍA

En este apartado se describen los materiales, reactivos, equipos y procedimientos que fueron empleados para la realización de este proyecto.

5.1. MUESTREO DE PTAR Y DETECCIÓN DE *E. coli* Y *Salmonella* spp EN DIFERENTES ETAPAS DEL TRATAMIENTO.

5.1.1. Reactivos

Estándar de conductividad (1412 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Sigma-Aldrich), buffers de pH (4, 7 y 10, Sigma Aldrich), caldo lactosado (Acumedia), caldo BRILA (verde brillante-Bilis-Lactosa) (BD Bioxon), caldo nutritivo (BD Bioxon), caldo EC (*Escherichia coli*) (BD Bioxon), caldo de enriquecimiento tetrionato (Merck), agar rojo violeta bilis (BD Bioxon) caldo de enriquecimiento selenito-cistina (BD), agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato) (BD Bioxon), agar SS (BD Bioxon), agar bismuto-sulfito (BD), agar Chromocult® Coliform (Merck), agar TSI (BD), medio LIA (BD), carbonato de calcio (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich).

5.1.2. Materiales y equipos

Se utilizó material de vidrio; asa de siembra, tubos Hach, tubos Eppendorf, pipetas estériles, puntas de micropipeta y cajas Petri, además de los materiales y equipos listados en la Tabla 3, los cuales se encuentran en el Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental (LAFEAM) de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas UANL.

También fueron utilizados equipos como autoclaves Marca All American modelo 75X y 25X-1, campana de flujo laminar Prendo modelo CFL 102 NW e incubadora Jeio Tech modelo IL-11, los cuales se encuentran ubicados en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Tabla 3. Lista de materiales y equipos usados en la caracterización del agua residual en diferentes etapas del tratamiento en la PTAR.

Equipos y/o materiales	Marca	Modelo
Cromatógrafo de Intercambio Iónico	Thermo Scientific	Dionex ICS-1100
Columna de intercambio aniónico	Thermo Scientific	Dionex IoPac AS23 (4 x 250 mm)
Balanza analítica	Ohaus® Pioneer™	PA224C
Analizador de COT	Shimadzu	TOC-VCSH
Plancha de calentamiento y agitación	Fisher Scientific	Isotemp
	IKA	C-MAG HS10
Bomba de vacío	Fischer Technical Company	High vacuum pump lav 3
Potenciómetro Portátil	Thermo Scientific	Orion Star A329
Celda de grafito para conductividad	Thermo Scientific	Orion 013010MD
Electrodo para pH	Thermo Scientific	9157BNMD
pH metro	Thermo Scientific	Orion Star A111
Congelador	Whirlpool	Wc10001q
Material de vidrio	Pyrex	NA
Micropipeta (100 a 1000 µL)	Smart	SVA-600
Filtros	Phenomenex Whatman	Celulosa regenerada (0.45 µm) 110 nm

5.1.3. Procedimiento

La planta tratadora de agua residual de la cual se obtuvieron las muestras se encuentra ubicada en el área metropolitana de Monterrey y su principal actividad es tratar agua industrial y doméstica para su reúso, por lo cual los efluentes de esta PTAR van directamente a empresas que la usan para riego o enfriamiento. Esta planta cuenta con varias etapas de tratamiento, en líneas generales se encuentran el tratamiento primario que consiste en una separación física de material suspendido y la sedimentación de sólidos por medio de un clarificador primario, posteriormente, se encuentra un tratamiento secundario el cual consiste en un tratamiento biológico seguido de una sedimentación de sólidos por medio de un clarificador secundario y por último posee un tratamiento terciario el cual es por medio de cloración.

El muestreo de agua residual en diferentes etapas de tratamiento de una PTAR (salida del clarificador primario, salida del clarificador secundario y posterior a cloración) se realizó según las normas NMX-AA-003-1980 y NOM-014-SSA1-1993. Se utilizaron recipientes previamente esterilizados, recolectando la muestra directamente en cada punto para evitar contaminación, se obtuvieron muestras puntuales y fueron almacenadas a 4°C por un tiempo no mayor a 24 h. Esto con el fin de detectar la presencia

de *E. coli* y *Salmonella* en las diferentes etapas del proceso y evaluar la eficiencia de la PTAR en la eliminación de estos microorganismos.

Los periodos de muestreo fueron tres en total, siendo el primero en agosto de 2018, el segundo en febrero de 2019 y el tercero en marzo de 2020. Para llevar a cabo la detección de los microorganismos de estudio se utilizaron las muestras recolectadas en el 2018 y 2019, por otro lado, la muestra tomada del clarificador secundario en marzo de 2020 fue esterilizada y posteriormente utilizada para realizar los experimentos de desinfección bajo las mejores condiciones encontradas de ambos procesos en el efluente real.

La detección de *E. coli* y *Salmonella* se llevó a cabo basado en las normas oficiales mexicanas NOM-113-SSA1-1994, NOM-114-SSA1-1994 y NOM-210-SSA1-2014 y en las normas internacionales Standard Method “9221 Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group”⁵⁹ e ISO 19250:2010 “Detection of *Salmonella* spp”. En éstas cada procedimiento comprende tanto pruebas presuntivas como confirmatorias para las bacterias de estudio. Las colonias de las bacterias que resultaron características para *E. coli* y *Salmonella* fueron sometidas a pruebas bioquímicas para lograr su identificación.

Posteriormente, se realizó la caracterización de las muestras que fueron recolectadas en los diferentes puntos de muestreo y se midieron sus principales parámetros fisicoquímicos como temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto, carbón orgánico total (COT), carbón inorgánico (CI) y contenido de algunos iones (F^- , Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}).

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la determinación de iones por cromatografía de intercambio iónico.

Columna	Dionex IoPac AS23 (4 x 250 mm)
Eluente	4.5 mM Na_2CO_3 / 0.8 mM $NaHCO_3$
Caudal (mL/min)	1.0
Corriente aplicada (mA)	25
Temperatura (°C)	30
Supresor	Dionex ASRS 300 4 mm
Detector	Conductividad

Los parámetros de temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad fueron medidos con un potenciómetro portátil Thermo Orion Star A329. Para la determinación de COT y Cl se utilizó el analizador de Carbón Orgánico total TOC Shimadzu VCSH y los iones presentes se determinaron con el equipo DIONEX ICS-1100 Thermo Scientific, las condiciones cromatográficas utilizadas se presentan en la Tabla 4.

5.2. SÍNTESIS DE LOS CATALIZADORES

5.2.1. Reactivos

Tetrabutóxido de titanio (>97.0%, Sigma-Aldrich), butanol (grado reactivo ACS ≥99.4%, Sigma-Aldrich), nitrato de plata (grado reactivo ACS ≥99.0%, Sigma-Aldrich), acetato de cobre (grado reactivo ACS ≥98.0%, Sigma-Aldrich), ácido acético (grado reactivo ACS ≥99.7%, DEQ), agua bidestilada.

5.2.2. Materiales y equipos

Se utilizó material de vidrio como matraces bola, probetas, pipetas, buretas, cajas Petri, papel filtro y además los equipos enlistados en la Tabla 5.

Tabla 5. Lista de materiales y equipos usados en la síntesis de los catalizadores

Equipos y/o materiales	Marca	Modelo
Balanza analítica	Ohaus® Pioneer™	PA224C
Matraz bola tres bocas	Pyrex	NA
Plancha de calentamiento y agitación	Fisher Scientific	Isotemp
Estufa	Lab Oven Quality Lab	30 GC
Mufla	Barnstead Thermolyne	47900
pH metro	Thermo Scientific	Orion Star A111

5.2.3. Síntesis sol-gel de Ag-Cu/TiO₂

En las últimas décadas numerosos métodos de síntesis y dopaje de semiconductores han sido reportados, entre los más estudiados se encuentran el proceso sol-gel, técnicas hidrotermales y solvotermales, reacciones directas de oxidación, métodos por

microondas, electrodeposición, sonoquímicos, entre otros. Debido a la variedad de procesos y metodologías para obtener semiconductores, es importante elegir el método de síntesis y dopaje más adecuado; puesto que han sido reportados que este influye directamente en las propiedades fisicoquímicas y en la actividad fotocatalítica de los semiconductores sintetizados¹⁷.

En este trabajo se utilizó el proceso sol-gel, el cual es un método ampliamente estudiado y utilizado para la síntesis de materiales fotocatalíticos. La síntesis de dióxido de titanio (TiO₂) dopado con cobre (Cu) y plata (Ag) se llevó a cabo con una relación molar de tetrabutóxido de titanio: butanol (1:20) y tetrabutóxido de titanio: agua (1:13). A continuación, se describe detalladamente el procedimiento utilizado.

1. Para la preparación del catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ se mezclaron 15 mL de tetrabutóxido de titanio (Ti(OBu)₄) y 40 mL de butanol (BuOH) bajo agitación constante por 30 min (disolución A).
2. Posteriormente a la disolución A se le ajustó el pH a 3 agregando ácido acético glacial y se mantuvo en agitación constante por 30 min.
3. En otro matraz se preparó una disolución de 10 mL de agua con nitrato de plata (AgNO₃) y acetato de cobre (Cu(AcOt)₂) en cantidades apropiadas para obtener las incorporaciones deseadas de cada metal dentro de la estructura del TiO₂ (0.3, 1.2 y 2.1 %p/p de cada uno), y se formó la solución B, esta solución se mantuvo bajo agitación hasta la completa disolución de las sales.
4. Se agregó gota a gota butanol y la solución B en la disolución A, esto bajo agitación constante hasta la formación del gel, en este momento se detuvo la agitación.
5. El gel fue envejecido por un periodo de 24 h a temperatura ambiente.
6. Se retiró el exceso de solvente al gel y se secó en una estufa a 80 °C por 24 h.
7. Por último, el polvo obtenido fue pulverizado en un mortero y se sometió a calcinación en una mufla utilizando una rampa de temperatura de 5 °C por min, manteniendo 450 °C durante 2 h.

Para efectos comparativos fueron sintetizados los materiales de referencia TiO₂, Ag-TiO₂ 1.2% m/m y Cu-TiO₂ 1.2% m/m mediante la misma metodología excluyendo la adición de los precursores de los iones metálicos, según fuera el caso. Para una fácil identificación,

los materiales co-dopados fueron nombrados Ag-Cu/TiO₂ con la relación del contenido de los metales a la derecha de la fórmula, expresada como %m/m.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

En esta sección se describe brevemente los fundamentos de cada técnica de caracterización utilizada para el análisis de los catalizadores sintetizados.

5.3.1. Difracción de rayos X (DRX)

Propiedades intrínsecas como la composición y la estructura cristalina de los materiales influyen en gran medida en la actividad fotocatalítica de los mismos. En este contexto, la difracción de rayos X es una técnica no destructiva que permite identificar la fase cristalina del catalizador. Las estructuras cristalinas poseen planos, producidos por ordenamientos repetitivos de átomos, que son capaces de difractar los rayos X. Las ondas dispersas en los átomos en diferentes posiciones llegan a un detector con un cambio de fase relativo, produciendo patrones de interferencia constructivos y destructivos dependiendo del ángulo de incidencia del haz de rayos X y las posiciones atómicas relativas. El fundamento de esta técnica fue explicado por Bragg, mediante la ecuación que lleva su mismo nombre (ecuación 5.1).

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen}\theta \quad (5.1)$$

Donde n corresponde al orden de la difracción y tiene que ser un número entero, λ es la longitud de onda del fotón incidente, d es la distancia interplanar y θ es el ángulo de difracción (ángulo de Bragg).

Todos los sólidos cristalinos tienen patrones de difracción bien definidos. Por esto, las distancias entre los diferentes planos que definen la red cristalina determinan el valor del ángulo de Bragg, cuya posición se considera como “huella digital” del sólido estudiado. Por lo anterior, los patrones de difracción suministran información exacta sobre la estructura cristalina de un material.

De los patrones de difracción obtenidos también se puede estimar el tamaño de cristal promedio empleando la ecuación de Scherrer (ecuación 5.2).

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (5.2)$$

Donde K es un valor que depende de la forma del cristal (0.89-0.90), D es el tamaño de cristal promedio y β es el ancho del pico a la altura máxima media.^{17,60}

En este trabajo la fase cristalina de los sólidos calcinados fue determinada mediante un difractómetro Bruker AXS modelo D2 Phaser. Se usó como fuente de radiación un ánodo de Cu ($\text{Cu } \alpha \lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) en un rango de 2θ de 5° a 90° , con un tamaño de paso de 0.05°s^{-1} .

5.3.2. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman está basada en la medición de las vibraciones moleculares que pueden ser usadas para obtener información química y estructural de los materiales. En la espectroscopia Raman, la muestra es excitada por una radiación monocromática visible o infrarroja emitida por un láser, y se registra la radiación dispersada en un ángulo de 90° . Sin embargo, la mayoría de la luz dispersada es de la misma frecuencia que la fuente de excitación, debido a que la energía liberada es igual a la absorbida, la cual es conocida como dispersión elástica o Rayleigh. No obstante, una pequeña fracción de la luz dispersada presenta el fenómeno de dispersión inelástica o Raman, la cual ocurre cuando una molécula acaba en un nivel energético más elevado o más bajo que el inicial. En el primer caso la energía liberada es menor a la absorbida, lo cual genera una disminución en la frecuencia de la radiación y es llamada dispersión Raman Stokes. Por otra parte, cuando una molécula acaba en un nivel energético menor, donde la energía liberada es mayor a la absorbida, aumenta la frecuencia de la radiación y se le conoce como dispersión Raman anti-Stoke^{60,61}.

Al graficar la intensidad Raman contra el número de onda, se obtiene el espectro Raman de la muestra, donde los picos se posicionarán en frecuencias que corresponden a los niveles de energía de las diferentes vibraciones del grupo funcional. Esto permite la

identificación de un compuesto, así como las fases presentes en el mismo por medio del número, intensidad y posición de las bandas presentes en el espectro, debido a que son únicas para cada compuesto¹⁷.

Los espectros Raman fueron registrados usando un microscopio Raman Thermo Scientific modelo DXR equipado con un láser de diodo con longitud de onda de 780 nm como fuente de radiación. El espectro fue registrado entre 24 a 1000 cm^{-1} , con una resolución estimada de 1.5 a 2.8 cm^{-1} .

5.3.3. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica no destructiva que permite identificar grupos funcionales a través de la determinación de la frecuencia a la cual vibran los enlaces de los grupos funcionales, generando bandas de absorción en el rango de la región del infrarrojo. Un espectro infrarrojo se obtiene comúnmente haciendo pasar la radiación infrarroja a través de la muestra y registrando la energía a la que absorbe la radiación. La absorción de la señal IR incidente se debe a la diferencia entre el estado fundamental y el estado excitado o vibracional de las moléculas.

Los espectros de transmisión o reflexión (modo de reflectancia total atenuada (ATR) o reflectancia difusa) muestran los modos vibracionales específicos y característicos de cada estructura molecular los cuales dependen de la fuerza de enlace, la estructura y las masas de los átomos. Finalmente, en un espectro infrarrojo se distinguen dos regiones las cuales permiten identificar un compuesto, la primera es la región de grupos funcionales (4000-1400 cm^{-1}) y la región de la huella dactilar (1400 a 600 cm^{-1})^{17,61}.

En este trabajo la espectroscopia FT-IR con reflectancia difusa fue utilizada para identificar las bandas correspondientes a los enlaces metal-oxígeno, presentes en los catalizadores.

Los espectros infrarrojos, en esta investigación se obtuvieron mediante un espectrómetro FT-IR marca Shimadzu modelo IRAffinity-1S equipado con una celda de reflectancia difusa marca Pike, promediando 45 escaneos entre 4000 y 400 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} .

5.3.4. Fisisorción de nitrógeno (análisis de área superficial y porosidad)

En las aplicaciones fotocatalíticas el área superficial efectiva y la porosidad de un catalizador son parámetros que afectan el proceso fotocatalítico, por lo cual es importante el análisis de estas propiedades. Existen diferentes métodos para determinar el área superficial y la porosidad, sin embargo, uno de los más comúnmente utilizados es el método de adsorción de gas en la superficie de un material sólido, siendo el nitrógeno el gas inerte principalmente usado.

La adsorción de N_2 se produce en la superficie externa y en la superficie de los poros a una temperatura de 77 K, la cual corresponde a la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido. El método más usado y reportado para calcular el área superficial específica de un sólido es el método Brunauer, Emmett y Teller (BET), en el cual, la formación de la monocapa de moléculas de gas en la superficie del material es usado para determinar el área superficial específica, mientras, que el principio de condensación capilar se puede aplicar para evaluar la presencia de poros, volumen de poros y distribución de tamaños de poros. Esta técnica comprende evaluaciones de área externa del material y área interna de los poros para determinar así el área específica total del material en unidades de $m^2 g^{-1}$.^{17,32}

La curva característica de estas mediciones es la isoterma de adsorción, la cual es una función del volumen o cantidad de gas adsorbido en la muestra con la presión del gas en fase fluida en condiciones de equilibrio. Esta gráfica es construida punto por punto mediante la introducción de cargas sucesivas de gas sobre el adsorbente. La IUPAC clasificó las isotermas de adsorción en ocho tipos, de las cuales solamente los tipos IV y V muestran histéresis (Figura 3), es decir, que las isotermas de adsorción y desorción no coinciden en determinada región de presiones relativas, siendo la isoterma tipo IV típica para materiales mesoporosos (ancho de poro en el rango de 2 a 50 nm).

Existen diferentes métodos para determinar la distribución de poros y tamaño de poro promedio, entre los más utilizados se encuentran el método BJH y métodos estudiados más recientemente como el método de la teoría de la densidad funcional (DFT)⁶².

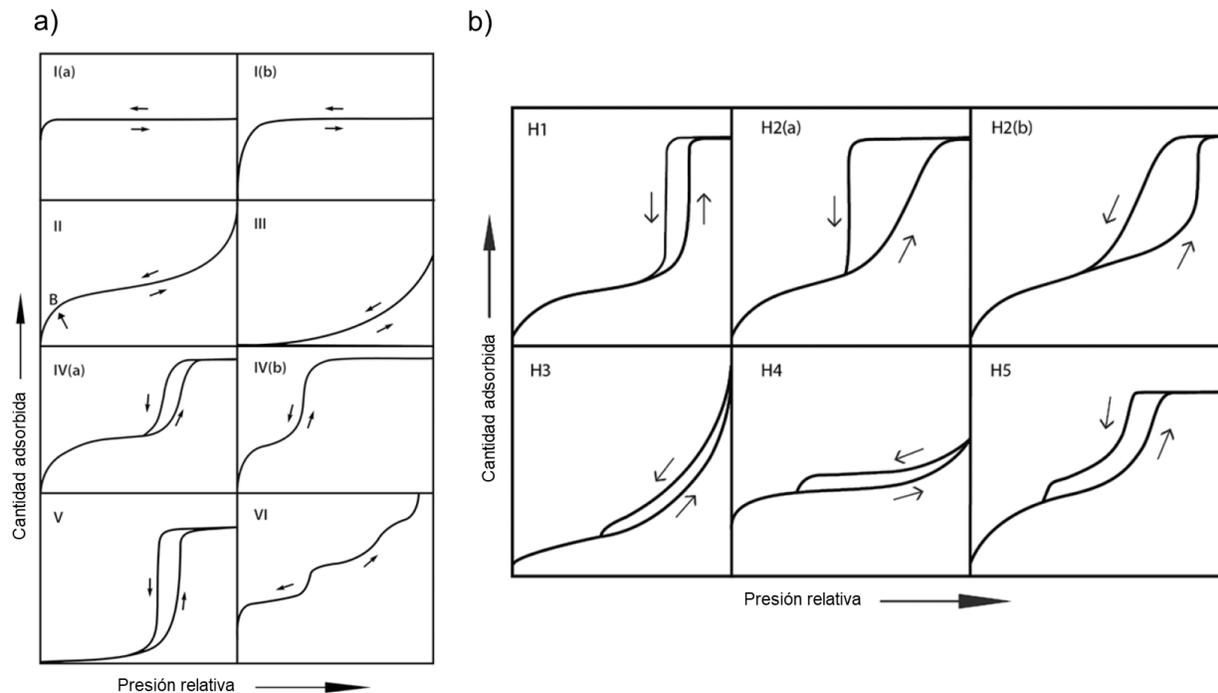


Figura 3. Clasificación de a) isothermas de fisisorción y b) lazos de histéresis. (Tomado del reporte técnico de la IUPAC⁶²)

En este trabajo el área superficial específica de los catalizadores fue calculada por el método BET a partir de datos obtenidos de la isoterma de adsorción de N₂ medidas en un equipo marca Micromeritics modelo TriStar II Plus. La distribución y tamaño de poro promedio se calculó empleando el método BJH (Barrett-Joyner-Halenda) y DFT para óxidos metálicos. Las muestras de los catalizadores fueron previamente desgasificadas a vacío a una temperatura de 120 °C por 2 h antes de ser analizadas.

5.3.5. Espectroscopia UV-Vis con reflectancia difusa (DRS).

La DRS (por sus siglas en inglés) es una técnica no destructiva que permite medir las propiedades ópticas de muestras en polvo. Esta técnica es útil para determinar la energía de banda prohibida (E_g) (región de energía entre las bandas de valencia y la de conducción) de un material semiconductor. La DRS se basa en la absorción electrónica de la radiación electromagnética reflejada en todas las direcciones por una superficie rugosa de un material. Como fuente de radiación electromagnética se utiliza radiación

UV-Vis entre 190 y 800 nm, y para obtener la medida de la radiación que es reflejada en todas las direcciones se utiliza un accesorio llamado esfera de integración.

Debido a que las muestras analizadas por DRS presentan fenómenos de dispersión y absorción de la radiación simultánea, una forma de analizar y describir los datos recolectados es mediante una teoría que aborda los dos fenómenos. En este contexto, el modelo de Kubelka-Munk utiliza el coeficiente de dispersión efectivo (S) y el de absorción efectivo (K) para describir las propiedades ópticas de una muestra en polvo.

En la función de Kubelka-Munk, $F(R_{\infty})$, se relaciona el coeficiente de absorción aparente (K) y el coeficiente de dispersión aparente (S) dados por la ecuación 5.3

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1-R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S} \quad (5.3)$$

Donde R_{∞} es la relación entre la reflectancia de la muestra y la reflectancia del estándar^{17,63}.

De este modo los valores de E_g fueron estimados a partir del intercepto en el eje de energía de la recta obtenida en el gráfico generado $((F(R_{\infty}) hv)^{1/2}$ vs energía del fotón)

Para calcular la (E_g) de los catalizadores, se analizaron por espectroscopia de reflectancia difusa UV-Vis (DRS) con un espectrofotómetro UV-Vis marca Perkin Elmer modelo Lambda 365, en el rango de 200 a 700 nm con doble haz y se utilizó el accesorio de esfera de integración, con una velocidad de barrido de 300 nm por min.

5.3.6. Espectroscopia de absorción atómica (EAA)

La espectroscopia de absorción atómica de flama es una técnica destructiva utilizada para determinar diferentes elementos en una muestra. Esta técnica es extremadamente sensible y específica debido a que las líneas de absorción atómica son estrechas (0.002 a 0.005 nm) y las energías de transición electrónica son únicas para cada elemento⁶¹.

En la EAA con flama la muestra en estado líquido es aspirada a través de un tubo capilar y es conducida hacia un nebulizador y forma pequeñas gotas de líquido, las cuales son enviadas a una flama donde ocurre la atomización. Los átomos absorben la luz emitida

por una lámpara de cátodo hueco, dicho cátodo esta hecho del elemento y elementos que se desean determinar. Los métodos de absorción atómica miden por medio de un detector la cantidad de energía en forma de fotones que son absorbidos por la muestra y esta es comparada con la absorción de estándares conocidos para cuantificar la concentración del elemento.

La concentración es calculada con base a la ley de Beer-Lambert, donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración. La concentración se obtiene a partir de una curva de calibración de estándares de concentración conocida. Sin embargo, se debe conocer para cada elemento el rango de concentración en que se cumple la ley de Lambert-Beer, dando una relación lineal⁶⁴.

En este trabajo se utilizó la EAA para determinar la concentración de plata y cobre incorporada en los catalizadores sintetizados, el equipo empleado fue un espectrofotómetro de absorción atómica Varian modelo SpectrAA 220FS. Se utilizaron las lámparas de cátodo hueco de Ag Visimax II marca Thermo Jarrell Ash y para Cu P814 marca Photron, empleando una llama con aire como gas oxidante y acetileno como gas combustible, con un flujo de 14 y 1.5 L/min, respectivamente.

Para obtener los iones metálicos en la disolución, los catalizadores fueron digeridos basándose en el método 3052 de la EPA⁶⁵. Para este procedimiento, se añadieron en un vaso de teflón Xpress de 75 mL 10 mg de cada catalizador y se agregó una mezcla de ácidos concentrados (HCl:HNO₃:HF (1:3:1)). Posteriormente, se llevó a cabo una pre-digestión de las muestras por 30 min a temperatura ambiente y a continuación se realizó la digestión de estas en un microondas marca CEM modelo MARS 6, con una rampa de temperatura de 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 180 °C por 20 min. Finalmente, los catalizadores digeridos fueron trasvasados a tubos Falcon y se diluyeron a 10 mL con agua bidestilada.

5.3.7. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido SEM (por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada para obtener información topográfica y morfológica de la superficie

de un material a escala nanométrica y micrométrica, además, es utilizada para realizar la caracterización de la composición química de la muestra. El fundamento de esta técnica se basa en la utilización de un haz de electrones, el cual se encuentra generalmente en la región de energía de 0.2-40 keV y es emitido comúnmente por un filamento de tungsteno que es calentado por corriente a más de 2500 °C^{66,67}. El haz de electrones generado es enfocado sobre la superficie de la muestra para formar un punto de aproximadamente 0.4-5 nm, y escanea la muestra formando así una imagen 2D de la misma¹⁷.

La formación de imágenes en SEM depende de la adquisición de señales producidas por la interacción del haz de electrones con la muestra. Estas interacciones pueden ser divididas en dos categorías principalmente como interacciones elásticas e interacciones inelásticas. La dispersión elástica resulta de la desviación del electrón incidente por el núcleo atómico de la muestra o por los electrones de la capa externa de energía similar, esta dispersión se caracteriza por una pérdida de energía insignificante durante la colisión. Los electrones que se dispersan a más de 90° son llamados electrones retrodispersados (BSE, por sus siglas en inglés) y producen una señal útil para obtener imágenes de la muestra que contiene información sobre la composición de la muestra. Por otra parte, en la dispersión inelástica se dan interacciones entre los electrones incidentes y los electrones de la muestra, dando como resultado que el electrón incidente transfiera energía al átomo, esta excitación conduce a la generación de electrones secundarios (SE, por sus siglas en inglés), los cuales pueden también ser usados para obtener imágenes de la muestra y contienen información de la topografía de la superficie. Además, de estas señales que son utilizadas para generar imágenes, también se producen otras señales cuando el electrón interactúa con la muestra, como emisión de rayos X característicos, electrones Auger y catodoluminiscencia^{17,68}.

En la actualidad, los microscopios modernos pueden producir imágenes compuestas SE-BSE, las cuales contienen información sobre la topografía y composición. Estos instrumentos por lo general están equipados con un detector de espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS), que permiten realizar el análisis elemental u obtener información química de la muestra.

En este trabajo la morfología de la superficie y el tamaño de las nanopartículas de los catalizadores se analizaron a partir de imágenes SEM utilizando un microscopio JEOL JSM 6701F. Estas imágenes fueron tomadas en el modo de imagen de electrones secundarios con un voltaje de aceleración de 5.0 kV y una magnificación de 50,000X.

5.3.8. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X es una técnica utilizada para determinar la composición química y estados de oxidación de los elementos presentes en la capa superficial de un material (1-10 nm).

El fundamento de esta técnica se basa en el efecto fotoeléctrico, este ocurre, cuando inciden fotones de rayos X sobre un material generando la emisión de fotoelectrones desde la superficie de éste. La emisión de los electrones ocurre cuando se usa un haz monocromático de rayos X (principalmente cátodos de Al- $\kappa\alpha$ (1,486.6 eV) o Mg- $\kappa\alpha$ (1,253.6 eV)), en un ambiente de ultra alto vacío (10^{-8} a 10^{-10} mbar)¹⁷.

La energía de los fotoelectrones que son emitidos de la muestra son característicos para cada elemento y corresponde a la energía de enlace (EE), esta energía también se ve afectada por el estado de oxidación, el entorno del enlace, la identidad de los átomos más cercanos, etc., por lo que permite determinar el estado oxidación de los átomos que se encuentran en la muestra⁶⁷.

La ecuación que relaciona la energía de enlace del fotoelectrón emitido con la energía cinética (EC) de los electrones está dada por la ecuación 5.4

$$EE = h\nu - EC - \phi \quad (5.4)$$

Donde $h\nu$ es la energía del fotón incidente y ϕ es la función trabajo, que depende tanto del espectrómetro como del material, por lo que a menudo se trata como un factor de corrección instrumental ajustable.

El espectro resultante consiste en una gráfica del número de fotoelectrones detectados en función de la energía de enlace. El análisis de estos espectros permite obtener la

composición elemental de la superficie al ser comparada con materiales estándares o utilizando base de datos de XPS^{17,67}.

La composición de la superficie y los estados de oxidación de los elementos en los catalizadores se determinaron utilizando un espectrómetro de fotoelectrones de rayos X modelo PHI 5000 Versa Probe II con una fuente de radiación monocromática de Al-K α (1486.6 eV).

5.4. INACTIVACIÓN DE *E. coli* Y *S. typhimurium* MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA UTILIZANDO CATALIZADORES DE Ag-Cu/TiO₂

5.4.1. Reactivos

TiO₂ Degussa P25 (Aeroxide), agar Chromocult® Coliform (Merck), agua destilada, NaCl (>99.5%, Sigma-Aldrich) y etanol (<99.6%, DEQ).

5.4.2. Materiales y equipos

En la Tabla 6 se describen los materiales y equipos que se utilizaron para evaluar el desempeño fotocatalítico de los catalizadores en la inactivación de las bacterias de estudio.

Tabla 6. Lista de materiales y equipo usados para la eliminación de los microorganismos mediante fotocatalisis heterogénea.

Equipos y/o materiales	Marca	Modelo
Simulador solar	Atlas	Sunset XLS+
Balanza analítica	Ohaus® Pioneer™	PA224C
Plancha de calentamiento y agitación	Fisher Scientific IKA	Isotemp C-MAG HS10
Congelador	Whirlpool	Wc10001q
Material de vidrio	Pyrex	NA
Radiómetro	Kipp & Zonen	CUV5 UV
Autoclave automática	All American	75X
Incubadora de baja temperatura	Lab Companion	IL-11
Campana de flujo laminar	Prendo	CFL 101 NW
Micropipeta 100-1000 μ L	Accumaxium	Smart SVA-600
Cajas Petri desechables estériles	DEQ	-
Agitador Vortex	Fisher Scientific	945404
Microprobeta cónica de polipropileno	Eppendorf	-

5.4.3. Evaluación de la actividad fotocatalítica de los catalizadores Ag-Cu/TiO₂ en la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium*

Con base en los resultados obtenidos en la detección de las bacterias en los diferentes puntos de la PTAR se eligieron las bacterias *E. coli* (ATCC 11229) y *S. typhimurium* (ATCC 14028) como microorganismos modelo para evaluar la actividad fotocatalítica de los materiales sintetizados. Ambos microorganismos se cultivaron por separado en agar nutritivo (BD Bioxon) a 37 °C durante 24 h y luego se recuperaron en disolución salina (0.85% m/m NaCl) para obtener una suspensión con una concentración de células bacterianas de aproximadamente 3 a 6 x 10⁸ UFC/mL de cada microorganismo ajustada con el nefelómetro de McFarland.

Los experimentos de inactivación fotocatalítica se realizaron en un reactor discontinuo cerrado de vidrio Pyrex utilizando un simulador solar Suntest XLS+ (Atlas), el cual emplea una lámpara de xenón equipada con un filtro de luz diurna que emite radiación de 300 a 800 nm y fue configurado para emitir una radiación UV instantánea de 30 W/m² que corresponde a un día de luz solar natural promedio. Para cada experimento se añadió una suspensión de cada bacteria a 200 mL de agua destilada estéril, para obtener una cantidad final de 10⁶ UFC/mL de cada microorganismo, esta disolución se dejó en oscuridad con agitación magnética durante 30 min antes de añadir el catalizador; en este momento, se tomó la muestra inicial del experimento de desinfección y se inició la irradiación de la solución. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1.0 mL en recipientes estériles (tubo Eppendorf) sin retirar el catalizador a diferentes tiempos de tratamiento para evaluar el proceso fotocatalítico en términos de inactivación de bacterias en función de la reducción de UFC/mL.

El método de dilución y siembra en placa se utilizó para establecer el número de células bacterianas viables durante el proceso, para ello, se esparcieron 100 µL de la dilución apropiada de la muestra en la superficie de una placa Petri que contenía agar Chromocult Coliform (Merck) procurando mantener homogénea la muestra utilizando un mezclador vortex (Fisher Scientific) previo a la siembra. Las placas ya inoculadas fueron incubadas

en posición invertida durante 24 h a 37 °C. En este medio, *E. coli* produce colonias de color azul oscuro y *S. typhimurium* genera colonias blancas.

Adicionalmente, se realizaron pruebas control como desinfección solar (SODIS) (*E. coli* y *S. typhimurium* + radiación solar sin catalizador) y actividad bactericida de los catalizadores (*E. coli* y *S. typhimurium* + catalizadores en oscuridad). Así como pruebas con los catalizadores dopados individualmente (Ag-TiO₂ y Cu-TiO₂) y el catalizador sin dopar (TiO₂). Durante los experimentos, la temperatura de la disolución nunca superó los 37 °C y se mantuvo entre 30 y 34 °C.

Para evaluar el efecto de la incorporación de Ag (0.3-2.1% m/m) y Cu (0.3-2.1% m/m) en los catalizadores y la cantidad de catalizador (0.1-0.5 g/L) usado durante la inactivación fotocatalítica de *E. coli* y *S. typhimurium*, se utilizó un diseño de experimentos central compuesto centrado en las caras 2³ ($\alpha = 1$) con tres réplicas en los puntos centrales. Se llevaron a cabo un total de 17 experimentos en orden aleatorio y las constantes de velocidad de inactivación (k_{app}) de los dos microorganismos se utilizaron como variable de respuesta. En la Tabla 7 se muestran los experimentos que fueron realizados en el diseño de experimentos. Los datos se analizaron utilizando el software Design Expert 7.0.0 donde el análisis de varianza (ANOVA) fue utilizado para analizar los resultados y estimar la significancia.

Bajo la mejor condición se llevaron a cabo pruebas para observar la reactivación del microorganismo después de finalizado el tratamiento, para ello se mantuvo bajo oscuridad el agua tratada a temperatura ambiente y se recolectaron muestras a 24 y 48 h con el fin de evaluar si los microorganismos se reactivan o se reproducen una vez que el proceso haya terminado.

Por último, el material co-dopado Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2 % m/m fue evaluado en la eliminación de los dos microorganismos en mezcla en el efluente del tratamiento secundario de una PTAR previamente esterilizada.

Tabla 7. Diseño de experimentos central compuesto 2^3 para la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium* empleando el catalizador co-dopado Ag/Cu-TiO₂.

Prueba	# experimento aleatorizado	% m/m Ag	% m/m Cu	Cantidad de catalizador (g/L)
1	18	0.3	0.3	0.1
2	1	2.1	0.3	0.1
3	9	0.3	2.1	0.1
4	4	2.1	2.1	0.1
5	2	0.3	0.3	0.5
6	16	2.1	0.3	0.5
7	5	0.3	2.1	0.5
8	6	2.1	2.1	0.5
9	19	0.3	1.2	0.3
10	14	2.1	1.2	0.3
11	13	1.2	0.3	0.3
12	20	1.2	2.1	0.3
13	8	1.2	1.2	0.1
14	12	1.2	1.2	0.5
15	7	1.2	1.2	0.3
16	10	1.2	1.2	0.3
17	11	1.2	1.2	0.3

5.5. INACTIVACIÓN DE *E. coli* Y *S. typhimurium* MEDIANTE EL PROCESO FOTOFENTON UTILIZANDO ÓXIDO DE HIERRO (III) (λ -Fe₂O₃ y α -Fe₂O₃)

5.5.1. Reactivos

Peróxido de hidrógeno (30 % m/m, grado reactivo ACS, Sigma-Aldrich), maghemita y hematita (grado reactivo <98%, Sigma-Aldrich), agar Chromocult® Coliform (Merck), agua destilada, NaCl (>99.5%, Sigma-Aldrich) y etanol (<99.6%, DEQ).

5.5.2. Materiales y equipos

Los materiales y equipos usados para la evaluación del proceso foto-Fenton en la eliminación de los microorganismos de estudios son los mismos presentados en la Tabla 6.

5.5.3. Evaluación del proceso foto-Fenton en la inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium*

Se utilizó el mismo montaje experimental y procedimiento descrito en la sección 5.4.3. Sin embargo, el proceso foto-Fenton en la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium* bajo radiación solar simulada se evaluó utilizando un diseño de experimentos central compuesto centrado en las caras de dos factores y dos niveles (2^2), obteniendo como respuesta las constantes de velocidad de inactivación (k_{app}) de los dos microorganismos. Los parámetros evaluados en el diseño de experimentos fueron cantidad de Fe^{3+} en suspensión (0.6, 1.5 y 2.4 mg/L) proveniente de maghemita y cantidad de peróxido de hidrógeno adicionado (2, 6 y 10 mg/L) a un pH fijo de 6.5. En la Tabla 8 se muestran los experimentos que fueron realizados en el diseño de experimentos. Además, se realizaron pruebas control como fotocátalisis heterogénea con el óxido de hierro, adición de peróxido de hidrógeno con y sin luz y el proceso Fenton en ausencia de radiación.

Tabla 8. Diseño de experimentos central compuesto 2^2 para la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium* empleando foto-Fenton heterogéneo con maghemita.

Prueba	# experimento aleatorizado	Fe^{3+} (mg/L)	H_2O_2 (mg/L)
1	7	0.6	2
2	6	2.4	2
3	9	1.5	2
4	2	1.5	6
5	5	1.5	6
6	8	1.5	6
7	11	0.6	6
8	3	2.4	6
9	1	0.6	10
10	4	2.4	10
11	10	1.5	10

A la mejor condición se comparó con el proceso foto-Fenton usando óxido de hierro (III) fase hematita a las mismas condiciones. También se realizaron pruebas para observar si existe reactivación del microorganismo después de finalizado el tratamiento aplicado.

Adicionalmente, se evaluó la mejor condición encontrada del proceso foto-Fenton para la eliminación de los dos microorganismos en un efluente del tratamiento secundario de una PTAR previamente esterilizada.

5.6. CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS MEDIANTE LOS PROCESOS ESTUDIADOS

Se calcularon las constantes de velocidad de eliminación de los microorganismos *E. coli* y *S. typhimurium* ajustando los valores experimentales obtenidos en los tratamientos a un modelo cinético ampliamente utilizado para este propósito, el modelo de Hom⁶⁹⁻⁷¹. Las variables que fueron ajustadas son k_{ap} y m . Este modelo estudia la velocidad de mortalidad de la población de bacterias durante el proceso. A continuación, se muestra la ecuación del modelo y los coeficientes cinéticos.

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k * C^n * t^m = -k_{ap} * t^m \quad (5.5)$$

Donde N_t es el conteo de colonias a cada tiempo, N_0 son el número colonias iniciales, k es la constante de velocidad de eliminación de primer orden, k_{ap} es la constante de velocidad aparente, C es la concentración del desinfectante, n es la constante de dilución y m es la constante empírica del modelo.

5.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PROCESOS SOBRE LAS ESTRUCTURAS BACTERIANAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEM.

La observación de imágenes de SEM de células bacterianas se llevó a cabo en diferentes etapas del tratamiento, se tomaron imágenes al inicio, mitad y final de los procesos fotocatalíticos (fotocatálisis heterogénea y foto-Fenton heterogéneo), esto con el fin de detectar cualquier cambio de la estructura celular de las cepas de estudio producida por los procesos empleados. A continuación, se describe la metodología empleada para el procesamiento de las muestras y toma de las imágenes de SEM.

Se tomaron muestras de 200 mL al tiempo inicial (0 min), tiempo intermedio (5 min para fotocátalisis heterogénea y 1 h para foto-Fenton heterogéneo) y tiempo final (15 min para fotocátalisis heterogénea y 2 h para foto-Fenton heterogéneo), las alícuotas fueron centrifugadas a 4000 rpm, se retiró el sobrenadante y fueron fijadas con 1 mL de glutaraldehído al 3% en buffer de fosfatos (pH 7.4) hasta su posterior tratamiento.

Posteriormente, cada una de las alícuotas fue lavada con 1 mL de buffer de fosfatos durante 10 min y después fue centrifugada por 5 min a 8000 rpm y se retiró el sobrenadante antes de adicionar la nueva solución buffer, este procedimiento se repitió en tres ocasiones.

Adicionalmente, se realizó la postfijación con tetróxido de osmio (OsO_4) al 2% en buffer por 2 h, añadiendo 1 mL a cada alícuota, después de este tiempo, se lavó cambiando el buffer y añadiendo nuevo buffer de fosfatos por 10 min y se centrifugó por 5 min a 8000 rpm, este procedimiento de lavado fue realizado en tres ocasiones, en esta parte del procedimiento se mantuvo la temperatura de las muestras en 4 °C. A la misma temperatura se llevó a cabo la deshidratación de las muestras con etanol-agua V:V a 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 y 100% de etanol. A continuación, se sometió a secado a punto crítico en el equipo Tousimis Samdri-PVT-3D, las muestras ya secas fueron montadas sobre un portamuestra de aluminio (pin) con cinta carbón doble cara. Estos pines con la muestra ya incorporada fueron recubiertos con oro en el equipo Cressington Modelo 108 auto.

Por último, se obtuvieron las micrografías en el SEM modelo Quanta FEG 250 de FEI, estas imágenes fueron tomadas en el modo de imagen de electrones secundarios y electrones retrodispersados con un voltaje de aceleración de 20 kV y una magnificación entre 12,000X y 24,000X.

5.8. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Los residuos generados fueron depositados en los contenedores correspondientes de acuerdo con la clasificación otorgada por el departamento de manejo y control de residuos de laboratorio de la FCQ de la UANL. De forma resumida los residuos de la

síntesis de los materiales fueron depositado en los contenedores C y E según correspondió y los residuos de los tratamientos fotocatalíticos fueron depositados en bolsas rojas para residuos peligrosos biológico-infecciosos, los cuales fueron esterilizados a 121°C por 20 min, antes de su disposición final.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos, los cuales corresponden a la caracterización fisicoquímica de las muestras de la PTAR, la detección de *E. coli* y *Salmonella* spp en el efluente, la caracterización de los catalizadores sintetizados y los experimentos de desinfección con los procesos de fotocátalisis heterogénea utilizando el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ y el de foto-Fenton heterogéneo con maghemita y hematita bajo radiación solar simulada.

6.1. MUESTREO DE LA PLANTA TRATADORA DE AGUA RESIDUAL

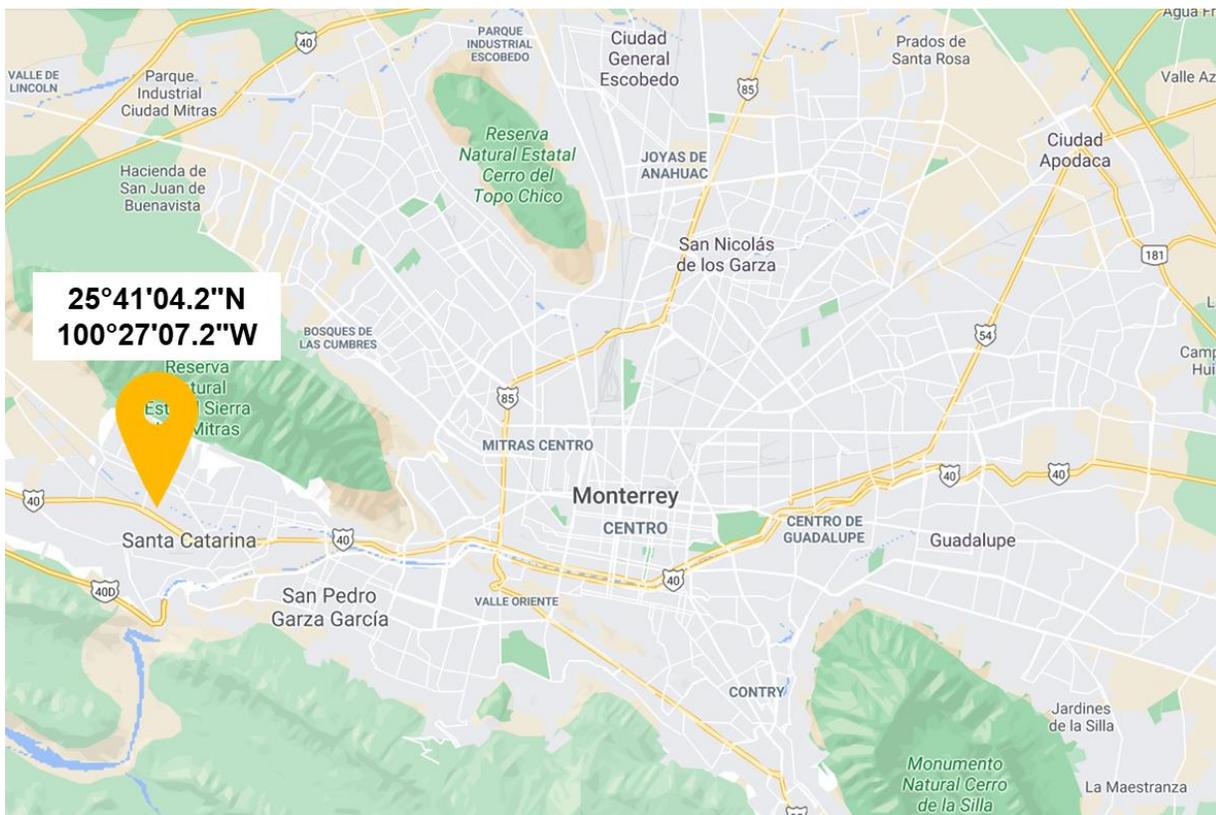


Figura 4. Localización de la PTAR muestreada.

La PTAR donde se realizó el muestreo se encuentra ubicada en el área metropolitana de Monterrey, N.L. (Fig. 4) y tiene como propósito tratar agua de origen doméstico e industrial para obtener un efluente que pueda ser utilizado para fines industriales y

agrícolas, por lo cual debe asegurarse de cumplir los requerimientos que presentan sus clientes, como es la disminución de la carga orgánica, la eliminación de microorganismos patógenos, pH, temperatura, conductividad y dureza.

6.1.1. Caracterización fisicoquímica de las muestras recolectadas en la PTAR

Para la recolección de las muestras de agua de la PTAR se realizaron tres periodos de muestreo, uno en agosto de 2018, el siguiente en febrero de 2019 y el último en marzo de 2021. Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las muestras recolectadas de la PTAR en las diferentes etapas son mostrados en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Caracterización de la muestra de agua recolectada en agosto de 2018

Etapas de muestreo	Parámetro		
	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (mS/cm)
Clarificador primario	25.3	7.54	1356
Clarificador secundario	25.2	7.20	1137
Después de cloración	25.4	7.17	1164

En el primer periodo de muestreo (Tabla 9), solamente se midieron tres parámetros los cuales fueron temperatura, pH y conductividad. Los valores de pH y de temperatura son los únicos parámetros que se encuentran normados y los dos se encuentran dentro del rango permisible en descargas de agua residual tratada en agua y bienes nacionales (NOM-001-SEMARTNAT-1996) y agua residual tratada para su reúso (NOM-003-ECOL-1997), los cuales son para pH de 5 a 10 unidades y para la temperatura que sea inferior a 40 °C. Sin embargo, los parámetros de conductividad, COT, oxígeno disuelto y concentración de iones no se encuentran legislados para este tipo de efluentes.

Además, se observó que los valores de pH, conductividad y temperatura fueron similares en las muestras recolectadas en las diferentes etapas de la PTAR. Asimismo, estos parámetros fueron análogos a los obtenidos en los periodos de muestreo de febrero de 2019 y marzo de 2021 (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización de las muestras de agua residual recolectadas en febrero de 2019 y marzo de 2021

Parámetro	Etapa de muestreo			
	Febrero 2019			Marzo 2021
	Clarificador primario	Clarificador secundario	Después de cloración	Clarificador secundario
Temperatura (°C)	17.90 ± 0.10	19.33 ± 0.06	18.03 ± 0.21	N.R
Oxígeno disuelto(mg/L)	1.88 ± 0.46	5.18 ± 0.16	7.58 ± 0.03	N.R
Conductividad (mS/cm)	1426 ± 13.1	1180 ± 10.2	1244 ± 10.1	1337 ± 11.2
pH	7.50 ± 0.04	7.37 ± 0.07	6.83 ± 0.03	7.14 ± 0.01
COT (mg/L)	172.46 ± 1.69	22.63 ± 0.00	19.55 ± 0.71	4.21 ± 0.99
Cl (mg/L)	97.60 ± 0.73	56.42 ± 0.02	41.17 ± 0.35	73.00 ± 2.00
Fluoruros (mg/L)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cloruros (mg/L)	101.4 ± 0.1	107.4 ± 0.7	173.2 ± 2.3	85.82 ± 0.7
Nitritos (mg/L)	N.D	N.D	N.D	N.D
Nitratos (mg/L)	13.2 ± 0.5	13.4 ± 2.1	59.2 ± 0.8	16.28 ± 1.0
Fosfatos (mg/L)	24.2 ± 1.5	25.8 ± 3.6	25.9 ± 1.5	3.94 ± 0.8
Sulfatos (mg/L)	152.6 ± 1.9	223.4 ± 6.0	226.4 ± 3.0	140.55 ± 1.7

n=2, ± desviación estándar

N.D= no detectado

N.R= no registrado

LOQ= límite de cuantificación

Se detectó un aumento del oxígeno disuelto en las muestras del clarificador secundario y después de cloración con respecto a la muestra del clarificador primario, esto se debe a que en el tratamiento biológico se burbujea aire para llevar a cabo el proceso, aumentando así el oxígeno disuelto en el medio; el proceso biológico se encuentra entre el clarificador primario y el secundario.

Además, se observó que el proceso biológico y de cloración logró disminuir el carbono orgánico total en un 89%, mientras que el carbono inorgánico se redujo en un 58% al final del tratamiento. Por otra parte, se detectaron en las muestras los aniones cloruro, nitrato, fosfato y sulfato, encontrando en mayor concentración a los cloruros (85.82 a 173.2 mg/L) y sulfatos (140.55 a 226.4 mg/L).

Los valores de los parámetros medidos fueron comparados con los reportados por diversos autores para efluentes de una PTAR, encontrando que los parámetros como pH, temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, COT, Cl, así como cloruros, fosfatos,

nitratos y sulfatos están dentro del rango comúnmente reportado para este tipo de efluente⁷²⁻⁷⁵.

Cabe resaltar que la determinación de diferentes parámetros como COT, CI y iones presentes en el agua residual es de gran importancia en la evaluación de la eficiencia de los procesos fotocatalíticos por el efecto que pueden tener estas especies como secuestradores del radical $\cdot\text{OH}$. Por este motivo es importante tener en cuenta los valores obtenidos de la muestra recolectada a la salida del clarificador secundario (2021), ya que ésta fue utilizada como matriz para evaluar los tratamientos fotocatalíticos.

6.1.2. Detección de *E. coli* en diferentes etapas del tratamiento de la PTAR.

En primer lugar, se realizó la detección de *E. coli* en las muestras de agua recolectadas en las tres etapas de una PTAR. El procedimiento es ilustrado de manera resumida en la Figura 5.

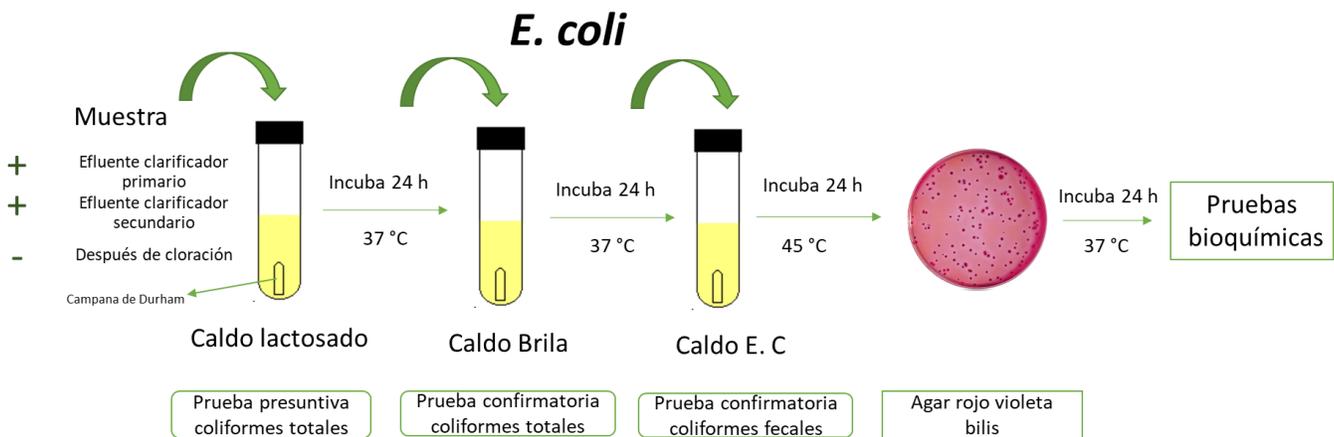


Figura 5. Procedimiento para la detección de *E. coli* en agua procedente de la PTAR

Para la detección de *E. coli* se llevó a cabo en primer lugar la prueba presuntiva de coliformes totales utilizando como medio de cultivo el caldo lactosado, este caldo al ser rico en nutrientes y no contener inhibidores de crecimiento bacteriano, permite el

crecimiento de las bacterias coliformes, las cuales fermentan la lactosa y producen ácido y gas. Se observó la formación de gas utilizando campanas Durham (Figura 5) después de incubar 24 h a 37 °C. Para las muestras de los efluentes de los clarificadores primario y secundario se presentó la generación de gas y turbidez, lo que indica que la prueba presuntiva es positiva para coliformes totales; sin embargo, para la muestra recolectada después de la etapa de cloración, no hubo presencia de generación de gas, ni turbidez, por lo cual la prueba presuntiva se consideró negativa para esta muestra, lo que indicó la ausencia de coliformes totales, esto se atribuyó a que la toma de muestra se realizó a muy pocos metros de la adición de cloro, por lo cual, el contenido de cloro residual presente en el agua era muy alta. Con base a estos resultados en los pasos posteriores solamente se trabajó con las muestras recolectadas de los clarificadores primario y secundario.

A continuación, se realizó la prueba confirmatoria de coliformes totales, utilizando como medio de cultivo el caldo verde brillante bilis. Este medio de cultivo contiene peptona como nutriente y lactosa para un adecuado crecimiento, no obstante, también contiene inhibidores como la bilis y el verde brillante que actúan como agentes selectivos y evitan el desarrollo de bacterias gram-positivas y gram-negativas a excepción de las coliformes. Los resultados de esta prueba fueron positivos para prueba confirmatoria de coliformes totales en ambas muestras^{76,77}.

Posteriormente, se llevó a cabo la prueba confirmatoria de coliformes fecales, para lo cual se utilizó el caldo EC. Este medio cuenta con tripteína como fuente de péptidos, aminoácidos y nitrógeno, además de lactosa, lo cual favorece el crecimiento de bacterias coliformes; sin embargo, también contiene sales biliares que inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas⁷⁸. Los resultados de esta prueba se obtuvieron al incubar por 24 h a 45 °C, y dio como resultado positivo para la prueba confirmatoria de coliformes fecales en las dos muestras recolectadas de los clarificados, lo que indica la presencia de estos microorganismos. En seguida, se extrajo una asada de los cultivos en caldo EC y se sembró en el medio de cultivo agar rojo violeta bilis utilizando la técnica de aislamiento por estriado en tres campos. En este medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura son usados como nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, mientras que las sales biliares y el cristal violeta actúan como inhibidores de crecimiento de bacterias

gram-positivas. Adicionalmente, este medio también contiene lactosa y rojo neutro, este último actúa como indicador de pH, y produce un viraje rojo intenso en presencia de acidez en el medio debido a la precipitación de bilis⁷⁸. Las cajas Petri con el agar rojo violeta bilis que contenían las muestras provenientes del clarificador primario y secundario fueron incubadas por 24 h a 37 °C. En la caja Petri donde se sembró la muestra del clarificador primario no se obtuvieron colonias características de *E. coli*; sin embargo, en la caja Petri con la muestra del clarificador secundario sí se observaron varias colonias típicas bien aisladas de *E. coli* por lo cual, se decidió seleccionar tres de estas colonias y someterlas a pruebas bioquímicas para verificar que se tratara de colonias de *E. coli*.

Las tres colonias aisladas fueron rotuladas como 1, 2 y 3, y se les realizaron seis pruebas bioquímicas para identificar *E. coli*. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos y además se añadió una columna donde se muestran los resultados típicos de colonias de *E. coli* para cada prueba. Donde los signos “+” y “-” indican que la prueba dio positiva o negativa respectivamente. A continuación, se describen los resultados de las pruebas bioquímicas mostradas en la Tabla 11.

La primera prueba que se realizó fue el sembrado por estriado en agar eosina azul de metileno (EMB). Este agar contiene peptona para favorecer el crecimiento microbiano y contiene los indicadores eosina y azul de metileno, los cuales permiten diferenciar entre organismos que son capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, de los que no son capaces, además, estas dos sustancias actúan como inhibidores para bacterias Gram positivas. Las cepas de *E. coli* fermentan la lactosa y generan colonias color negro azulado y además presentan un característico brillo verde metálico en la superficie del agar debido a una rápida fermentación de la lactosa⁷⁸. Las tres muestras analizadas generaron colonias negras azuladas con presencia de brillo verde metálico después de 24 h de incubación a 37 °C, por lo cual dieron positivo a las características típicas de las colonias de *E. coli*.

Tabla 11. Resultados de pruebas bioquímicas *E. coli*, para tres colonias típicas aisladas del efluente secundario de la PTAR recolectado en febrero de 2019

Medio	Colonia /Característica	1	2	3	<i>E. coli</i>
EMB	Brillo verde metálico	+	+	+	+
	Colonias azules negras	+	+	+	+
Citrato de Simmons	Cambio de coloración	-	-	-	-
MR-VP (rojo de metilo)	Color rojo	+	+	+	+
MR-VP (Voges Proskauer)	Color rojo	-	-	-	-
SIM	Movilidad	+	+	+	+
	Color rojo en la superficie (indol)	+	+	+	+
	Producción de H ₂ S (color negro)	-	-	-	-
TSI	Amarillo	+	+	+	+
	Producción de gas	+	+	+	+
	Producción de H ₂ S	-	-	-	-

Por otra parte, se llevaron a cabo las pruebas con el agar citrato de Simmons que permite la diferenciación de bacterias gram-negativas. En este medio de cultivo, el fosfato monoamónico y el citrato de sodio son las únicas fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente, y además contienen azul de bromotimol el cual actúa como indicador de pH produciendo un cambio de color verde (neutro) a azul (alcalino) en presencia de organismos capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono, produciendo una reacción alcalina. *E. coli* no contiene la enzima citrato permeasa, por lo cual no es capaz de metabolizar el citrato, por ello no generan ningún cambio en la coloración del agar⁷⁸. En este análisis las tres colonias seleccionadas dieron negativas para la prueba con el agar citrato de Simmons, sin generar cambio de color en el agar después de ser incubadas a 37°C por 24 h.

Otro medio de cultivo utilizado fue el MR-VP, el cual es útil para clasificar enterobacterias. En este medio, la pluripeptona actúa como fuente de nutrientes para el crecimiento bacteriano y la glucosa es el carbohidrato fermentable. Debido a que la glucosa puede ser metabolizada por diferentes vías, se pueden generar sustancias ácidas (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico) o neutras (acetil metil carbinol) como productos finales dependiendo de la vía metabólica. Para observar esta diferencia, se agregan dos indicadores por separado, uno es el rojo de metilo, el cual revela la presencia de productos ácidos y el otro es el alfa naftol e hidróxido de potasio los cuales muestran la

presencia de productos finales neutros⁷⁸. Las dos pruebas fueron realizadas después de incubar 24 h a 37 °C. Para la primera prueba MR-VP (rojo de metilo) las tres colonias seleccionadas dieron positivo mostrando un color rojo en el medio, característico de las cepas de *E. coli* que generan productos ácidos. Por consiguiente, no deberían generarse productos finales neutros, lo cual se evidenció realizando la prueba de Voges Proskauer, misma que dio negativa para las tres colonias seleccionadas.

Posteriormente, se llevó a cabo una prueba en el medio SIM, el cual es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae. Este medio de cultivo contiene tripteína y peptona como nutrientes para el crecimiento bacteriano; el triptófano proveniente de la tripteína puede ser metabolizado por algunas bacterias para producir indol mediante un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se mezcla con el aldehído del reactivo de Kovac's (p-dimetilaminobenzaldehído) y forma un compuesto quinoidal de color rojo violeta. Por otra parte, a partir del tiosulfato de sodio algunos microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico, el cual reacciona con el hierro presente en el medio formando sulfuro de hierro, un precipitado de color negro. Además, contiene agar a una concentración que le otorga una propiedad de ser semisólido con la que se puede detectar la movilidad (0.35%)^{78,79}. La producción de H₂S y la movilidad fueron evaluados después de un periodo de incubación de 24 h a 37°C, mientras que la prueba de indol fue evaluada después de añadir el reactivo de Kovac's. Los resultados obtenidos para las tres colonias seleccionadas fueron los mismos, dieron positivo a las pruebas de movilidad y producción de indol (color rojo en la superficie) y negativo para la producción de H₂S; estas características son típicas en las cepas de *E. coli*.

Por último, se realizó la prueba con el agar triple azúcar hierro (TSI), este agar es utilizado para diferenciar enterobacterias, en base a la fermentación de diferentes azúcares y a la producción de H₂S. Este medio contiene extracto de carne y pluripeptona como nutrientes para el desarrollo de las bacterias, contiene lactosa, sacarosa y glucosa como carbono fermentable, además, tiosulfato de sodio como sustrato necesario para la producción de H₂S y el sulfato de hierro y amonio como fuente de hierro, que puede reaccionar con el ácido para producir sulfuro de hierro, de color negro. Adicionalmente, este agar incluye rojo de fenol como indicador de pH, el cual hace que el agar cambie de color a amarillo

en medio ácido⁷⁸. Los resultados para esta prueba fueron obtenidos luego de inocular las colonias seleccionadas en el agar TSI e incubar por 24 h a 37°C, los resultados obtenidos para las tres colonias fueron los mismos, la coloración del agar fue completamente amarillo y hubo generación de gas debido a que el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa; no se observó ennegrecimiento del medio, por lo cual no hay producción de H₂S, características que son típicas de cepas de *E. coli*.

Mediante estas pruebas bioquímicas se evidenció que las colonias analizadas tienen todas las características típicas de cepas de *E. coli* (Tabla 11), por lo cual se concluye que sí está presente esta bacteria en la muestra de agua recolectada en febrero de 2019 del efluente del clarificador secundario de la PTAR y se podría deducir que también se encuentra en la muestra obtenida del clarificador primario.

6.1.3. Detección de *Salmonella* spp en diferentes etapas del tratamiento.

Para la detección de *Salmonella* spp en las muestras de diferentes etapas del tratamiento de la PTAR, se realizó un pre-enriquecimiento no selectivo utilizando caldo lactosado para cada una de las muestras, las cuales fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Posteriormente, se tomaron dos muestras del caldo lactosado de cada etapa y se sembraron en dos medios de enriquecimiento, los cuales fueron incubados por 24 h a 37 °C.

El primer medio de enriquecimiento fue el caldo tetrionato con adición de iodo-ioduro. El caldo tetrionato contiene peptona como fuente de nutrientes, carbonato de calcio el cual cumple la función de neutralizar y adsorber metabolitos tóxicos, sales biliares y tiosulfato de sodio. Las sales biliares y tetrionato (compuesto producido en el medio de cultivo al reaccionar el tiosulfato de sodio con la solución iodo-iodurada) inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas y de algunas enterobacterias. Sin embargo, la toxicidad del tetrionato no afecta a *Salmonella* spp debido a que esta contiene la enzima tetrionato reductasa⁷⁸.

El otro medio de enriquecimiento utilizado fue el caldo selenito cistina, al igual que en el caldo tetrionato contiene peptona como fuente de nutrientes, además contiene lactosa

como carbohidrato fermentable y selenito de sodio como inhibidor de microorganismos gram-positivos y de la mayoría de los microorganismos entéricos a excepción de *Salmonella* spp. Este medio también contiene L-cistina como agente reductor de la toxicidad generada por el selenito de sodio, produciendo una mayor recuperación de especies de *Salmonella*⁷⁸.

De cada uno de los caldos de enriquecimiento se tomó una asada y fue sembrado por estriado en tres campos en los agares bismuto sulfito; xilosa, lisina y desoxicolato (XLD) y agar *Salmonella* Shigella (SS). El procedimiento se explica más claramente en el esquema de la Figura 6.

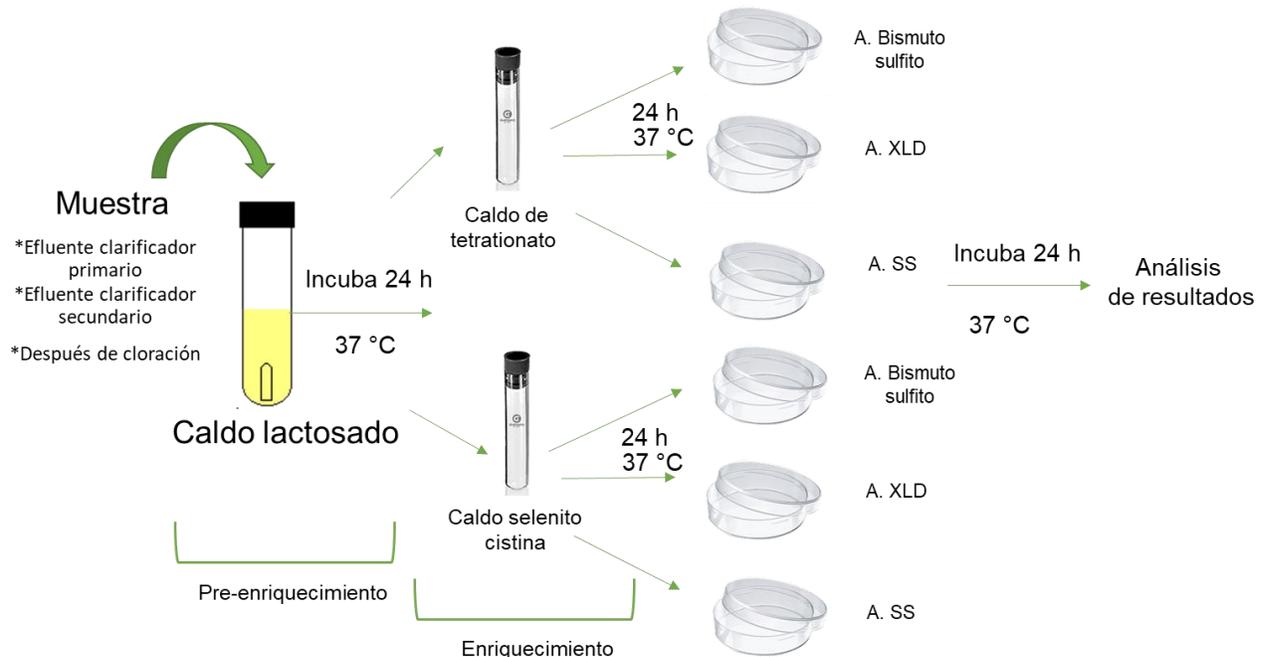


Figura 6. Procedimiento para la detección de *Salmonella* spp en agua procedente de la PTAR

El primer medio selectivo para *Salmonella* utilizado fue el agar bismuto sulfito, el cual se usa para aislar y diferenciar *Salmonella typhi* y otras cepas de *Salmonella* presentes en una muestra. En este agar las bacterias gram-positivas y algunos coliformes gram-negativos son inhibidos por el sulfito de bismuto y el verde brillante. Las colonias de *Salmonella* positivas para formación de H₂S muestran un ennegrecimiento debido a la reacción con el sulfuro de hierro (III) que actúa como indicador. Además, la reducción de

iones de bismuto a bismuto metálico produce el característico brillo metálico alrededor de las colonias. Las características típicas de *Salmonella* son colonias grises o negras; algunas veces presentan brillo metálico y el medio circundante a la colonia generalmente es café⁷⁸. Los resultados que se obtuvieron mostraron que en las muestras procedentes de la etapa posterior a la cloración en la PTAR no hubo crecimiento de ninguna colonia, sin embargo, en las muestras recolectadas en 2018 del clarificador primario y secundario se encontraron colonias típicas. Adicionalmente, en el muestreo realizado en 2019 en el clarificador secundario no se encontraron colonias, pero en el clarificador primario sí se encontraron colonias típicas de *Salmonella*.

El segundo medio selectivo utilizado fue el agar XLD, este medio es también utilizado para el aislamiento y diferenciación de *Salmonella*. Este agar utiliza el extracto de levadura como fuente de nutrientes, el desoxicolato de sodio como agente inhibidor de bacterias gram-positivas. También contiene xilosa, lactosa y sacarosa como fuente de carbohidratos fermentables, donde la xilosa es fermentada por la mayoría de los microorganismos entéricos a excepción de *Shigella* spp. La lisina es agregada para diferenciar la *Salmonella* de otros microorganismos no patógenos, esta fermenta la xilosa, y una vez agotada en el medio *Salmonella* actúan sobre la lisina mediante la enzima lisina-descarboxilasa, revertiendo el pH a valores alcalinos, similar a la reacción de *Shigella*. Adicionalmente, los indicadores de producción de H₂S son el tiosulfato sódico y el citrato férrico amónico, permitiendo observar la formación de colonias con centro negro. Las características típicas de *Salmonella* son colonias rosas con o sin centro negro, algunas pueden producir centro negro muy grande y volverse completamente negras⁷⁸. Al igual que en el agar bismuto sulfito no se presenció crecimiento de ninguna colonia en la muestra de agua de la etapa después de la cloración y en el caso de las muestras recolectadas en 2018 se determinó que tanto las del clarificador primario como las del secundario formaron colonias típicas, mientras que, en las muestras obtenidas en 2019, en las dos etapas de muestreo se formaron colonias no típicas (colonias que no poseen las características de color, forma, tamaño, etc. generalmente descritas para ese tipo de microorganismo).

El último medio selectivo utilizado fue el agar Salmonella Shigella (SS), al igual que los dos anteriores es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Salmonella*. Este

agar contiene pluripeptona y extracto de carne como fuente de nutrientes para el desarrollo de las bacterias, lactosa como fuente de carbono fermentable, además, sales biliares y verde brillante como inhibidores de bacterias Gram positivas y de la mayoría de coliformes. También contiene tiosulfato de sodio que permite observar la formación de H₂S y rojo neutro que actúa como indicador de pH. Las colonias fermentadoras de lactosa acidifican el medio y crecen como colonias rojas o rosas, mientras que colonias no fermentadoras de lactosa como *Salmonella* generan colonias típicas transparentes con centro negro⁷⁸. En las muestras procedentes de la etapa después de cloración no ocurrió crecimiento de colonias en el agar SS. Por otra parte, en el muestreo del 2018, se observaron colonias típicas en las muestras de agua recolectadas del clarificador primario (C1) y secundario (C2), mientras que, para las obtenidas en el periodo de muestreo de 2019, sólo se formaron colonias no típicas en ambos puntos de muestreo.

Los resultados de las pruebas selectivas en los diferentes medios de cultivo se presentan en forma de resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de las pruebas selectivas para la detección de *Salmonella*.

Características de colonias típicas	Agares		
	Bismuto sulfito	Bismuto sulfito	Bismuto sulfito
	Negras con o sin brillo metálico, halo café.	Negras con o sin brillo metálico, halo café.	Negras con o sin brillo metálico, halo café.
C1 2018	Típicas	Típicas	Típicas
C2 2018	Típicas	Típicas	Típicas
C1 2019	Típicas	No típicas	No típicas
C2 2019	Sin colonias	No típicas	No típicas

Tanto a las colonias típicas como no típicas se le realizaron pruebas bioquímicas para identificar la presencia de *Salmonella*. La primera prueba realizada fue utilizando el medio de cultivo agar lisina hierro (LIA), el cual es utilizado para diferenciar microorganismos en especial *Salmonella* spp. Este medio contiene peptona y extracto de levadura como nutriente, glucosa como hidrato de carbono fermentable y lisina como sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y deaminasa. Los indicadores

de producción de H₂S son el citrato de hierro y amonio y el tiosulfato de sodio, mientras que el indicador de pH es el púrpura de bromocresol (amarillo en pH < 5.2 y violeta a pH > 6.8). Las bacterias que fermentan la glucosa acidifican el medio y provocan una coloración amarilla, el ambiente ácido favorece la descarboxilación de la lisina elevando el pH del medio y generando un color violeta. Las bacterias que fermentan la glucosa, pero no tienen actividad lisina descarboxilasa, se mantienen de color amarillo igual que el medio y la superficie se torna violeta debido al consumo de las peptonas lo que produce alcalinidad. La generación de H₂S se visualiza con el ennegrecimiento del medio y algunas bacterias que desaminan la lisina producen ácido alfa-ceto-carbónico, el cual con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forman un color rojizo en la superficie del medio. Los resultados característicos de esta prueba para las cepas de *Salmonella* son descarboxilación de lisina positivo (color del fondo púrpura), desaminación de lisina negativo (color de la superficie púrpura) y producción de H₂S positivo (color negro)⁷⁸. Para las muestras recolectadas en el 2018 provenientes del clarificador primario y secundario se encontraron todos los resultados característicos de cepas de *Salmonella*, mientras que en las muestras recolectadas en 2019 se descarta la presencia de cepas de *Salmonella* ya que no se observó descarboxilación de lisina, ni producción de H₂S.

La otra prueba que se llevó a cabo fue con el agar TSI cuyo fundamento esta explicado en la sección 6.1.2. Las cepas de *Salmonella* sólo fermentan la glucosa presente en el medio, por lo cual obtienen una superficie alcalina (superficie roja) y profundidad ácida (fondo amarillo), además, presentan la generación de H₂S mostrando un ennegrecimiento del medio y finalmente no presentan producción de gas. Del mismo modo que la prueba LIA, las muestras obtenidas en 2018 provenientes del clarificador primario y secundario mostraron las características típicas de las cepas de *Salmonella*; sin embargo, las muestras obtenidas en 2019 no presentaron una o más características típicas, por lo cual se descartaron como cepas de *Salmonella*, esto se atribuyó a que se realizaron muestreos puntuales en diferentes temporadas del año, lo que influyó en la cantidad y diversidad de microorganismos que pudieron estar presentes en cada una de las muestras. En la Tabla 13 se muestra un resumen de los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas para la detección de *Salmonella* en las diferentes etapas de la PTAR, además, se agregó una columna con los resultados característicos de *Salmonella*.

De acuerdo con los resultados anteriormente descritos, se encontró que en al menos uno de los dos periodos de muestreo se identificó *Salmonella* a lo largo del proceso de tratamiento, siendo la muestra obtenida después de cloración la única etapa donde no se encontró su presencia; esto se atribuyó al cloro residual presente en la muestra.

Tabla 13. Resultados de las pruebas bioquímicas para la detección de *Salmonella*.

Medio/Muestra	C1 2018	C2 2018	C1 2019	C2 2019	<i>Salmonella</i>
LIA	Descarboxilación de lisina (positivo fondo color púrpura, negativo fondo color amarillo)				
	+	+	-	-	+
	Desaminación de lisina (positivo superficie color rojo, negativo superficie color púrpura)				
	-	-	-	-	-
	Producción de H ₂ S				
	+	+	-	-	+
TSI	Fermenta los tres azúcares (positivo superficie amarilla (ácida), negativo (Superficie roja (alcalina))				
	-	-	+	+	-
	Fermenta glucosa (positivo fondo amarillo, negativo fondo rojo)				
	+	+	+	+	+
	Presencia de gas				
	-	-	-	-	-
	Producción de H ₂ S				
	+	+	-	-	+

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CATALIZADORES SINTETIZADOS

En esta sección se muestran los resultados y discusión de la caracterización de los catalizadores sintetizados en este proyecto.

6.2.1. Difracción de rayos X (DRX)

Los resultados de la difracción de rayos X indicaron que todos los fotocatalizadores preparados presentaron el patrón característico de la fase cristalina anatasa del TiO₂, el cual concuerda con la ficha JCPDS no. 21-1272 como única fase cristalina presente. En la Figura 7 se muestra los difractogramas de cuatro catalizadores seleccionados a manera de ejemplo. En estos difractogramas no se registran señales correspondientes a

especies de Ag o Cu, lo cual se atribuye al bajo porcentaje incorporado de estos metales en el TiO₂, debido al límite de detección del equipo de DRX (generalmente menor 5% m/m)^{48-50,80}.

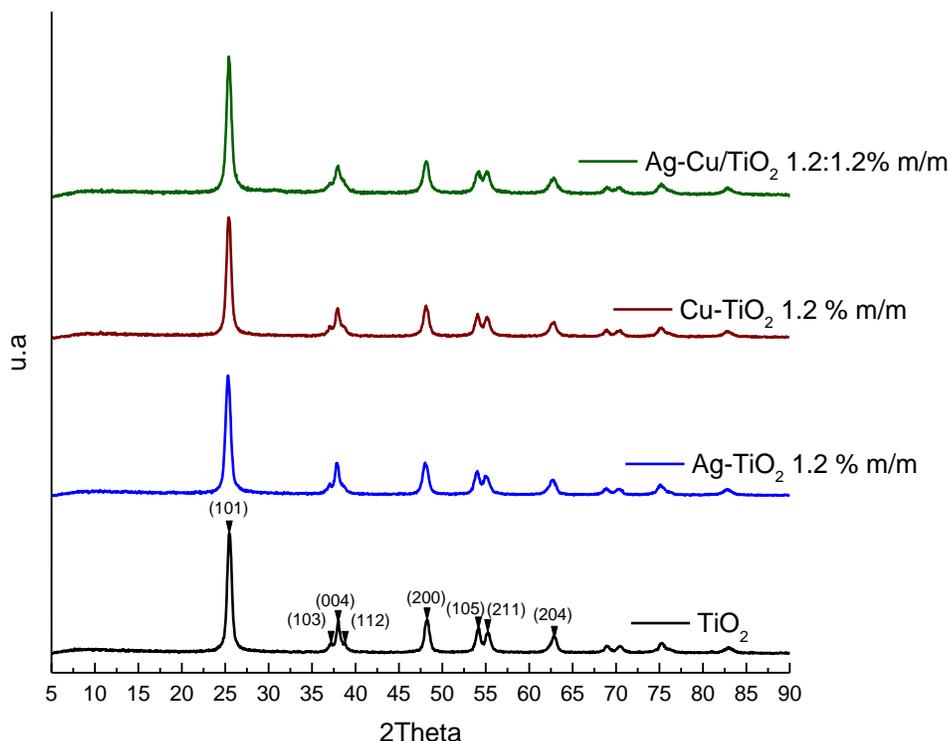


Figura 7. Difractogramas de los fotocatalizadores TiO₂, Ag-TiO₂ 1.2, Cu-TiO₂ 1.2 y Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2 y TiO₂ sintetizados por el método sol-gel.

A partir de los patrones de difracción de los materiales, se calculó el tamaño de cristalito promedio de cada catalizador mediante la ecuación de Scherrer. Se obtuvieron valores entre 10.7 y 12.5 nm, donde se observó una ligera disminución cuando se incorporaron los metales al TiO₂ (12.5 nm). El parámetro que tiene mayor repercusión en la disminución del tamaño de cristalito es la incorporación de cobre, cuando el porcentaje de Cu aumentó, el tamaño de cristalito disminuye. Los resultados se muestran en la Tabla 14 y fueron comparables a los reportados por otros estudios donde sintetizaron catalizadores de TiO₂ dopados con Cu o Ag (tamaño de cristalito entre 7 y 25.3 nm)^{44,48,50,51,80,81}.

Posteriormente, fueron calculados los parámetros de red (a y c) utilizando el software UnitCell⁸² y los resultados se muestran también en la Tabla 14. Los parámetros de red a y c no presentaron variación con la incorporación de Ag y Cu, los valores medios de a y c fueron 3.7882 y 9.5040 Å, respectivamente, muy cercanos a los reportados por la ficha JCPDS no. 21-1272 (a=3.7852 Å y c=9.5139 Å). La posición similar de los picos e intensidad, así como la similitud en el ancho a la altura media de los mismos, muestra que la incorporación de los metales tiene una influencia despreciable sobre el tamaño de cristal y la estructura cristalina del TiO₂.

Tabla 14. Tamaño de cristalito promedio y parámetros de red de los catalizadores sintetizados

Catalizador	Tamaño del cristalito (nm)	Parámetro de red (Å)	
		a	c
TiO ₂	12.8	3.7822	9.5105
Ag-TiO ₂ 1.2	11.2	3.7828	9.4938
Cu-TiO ₂ 1.2	12.2	3.7866	9.5182
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:0.3	12.2	3.7893	9.5177
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:1.2	11.5	3.7873	9.4909
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:2.1	10.7	3.7941	9.5094
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:0.3	11.7	3.7783	9.4924
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2	11.6	3.7911	9.5007
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:2.1	10.9	3.7824	9.4767
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:0.3	12.5	3.7825	9.4933
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:1.2	11.5	3.8004	9.5179
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:2.1	11.6	3.8020	9.5263

Para la incorporación de cobre se utilizó como precursor acetato de cobre, donde el cobre se encuentra como Cu²⁺ cuyo radio iónico es de 0.73 Å, mientras que el Ti⁴⁺ tiene un radio iónico de 0.75 Å, por lo cual es posible que haya una sustitución de pequeñas cantidades de Ti⁴⁺ por Cu²⁺ en la estructura, lo que podría estar acompañado por una débil reducción de la red, generada por la ligera diferencia entre sus radios iónicos⁸⁰. Sin embargo, esta pequeña diferencia no ocasionó un cambio en los parámetros de red. De acuerdo a la reglas de Hume-Rothery⁸³, la diferencia del radio iónico debe ser menor al

15% para que el dopante pueda sustituir al Ti^{4+} , siendo aquí el caso, por tanto, esto indica que se puede incorporar Cu^{2+} de manera sustitucional en el TiO_2 ⁴⁴.

Por otra parte, es poco probable que la Ag^+ con radio iónico de 1.15 Å proveniente del nitrato de plata, pueda sustituir al Ti^{4+} , lo cual sí generaría una expansión importante de los parámetros de red⁸¹; sin embargo, no sucedió así como puede observarse en los resultados de la Tabla 14. Además, cabe resaltar que no cumpliría con las reglas de Hume-Rothery mencionadas anteriormente, donde en este caso el radio iónico de la Ag^+ es casi el doble del de Ti^{4+} . En consecuencia, es menos probable encontrar Ag^+ dentro de la red cristalina del TiO_2 , y es más probable que se encuentre como nanopartículas de Ag^0 en la superficie del material. Esto último se confirmó posteriormente mediante el análisis XPS.

6.2.2. Espectroscopia Raman

Los espectros Raman de los catalizadores TiO_2 , $Ag-TiO_2$ 1.2, $Cu-TiO_2$ 1.2 y $Ag-Cu/TiO_2$ 1.2:1.2, se muestran en la Figura 8. Se confirmó la presencia de la fase cristalina anatasa en todos los materiales, la cual muestra las bandas características de E_{g1} a 143 cm^{-1} (vibración de estiramiento simétrico O-Ti-O), B_{1g} a 397 cm^{-1} (vibración de aleteo O-Ti-O), $A_{1g}+B_{1g}$ a 515 cm^{-1} y E_{g2} a 639 cm^{-1} (vibración de estiramiento asimétrico O-Ti-O)^{45,84}. Sin embargo, no se encontraron señales correspondientes a enlaces Ag-O o Cu-O producidos por la formación de óxidos metálicos, lo que podría indicar que la plata y el cobre se incorporaron como ion metálico (Cu^{2+}) o como metal (Ag^0) en el TiO_2 .

El cambio en la posición de la banda E_{g1} (143 cm^{-1}) y la ampliación del ancho a la altura media de dicha banda ha sido estudiada ampliamente, y se le ha dado varias interpretaciones, las cuales implican diferentes efectos estructurales y morfológicos, como variación de los parámetros de red y deformaciones⁸⁵; distribución no homogénea del tamaño de partícula⁸⁶ y defectos estructurales como vacancias de oxígeno^{87,88}.

El recuadro en la Figura 8 muestra un desplazamiento de la banda E_g a 143 cm^{-1} hacia un número de onda mayor en los catalizadores dopados con iones metálicos en comparación con el TiO_2 sin modificar. Este cambio ha sido comúnmente atribuido a que las incorporaciones de dopantes como los metales provocan un aumento del número de

vacancias de oxígeno en la superficie del material, causando una posible disminución del efecto de la recombinación del par electrón-hueco y mejorando así la actividad fotocatalítica de los catalizadores^{84,86-88}.

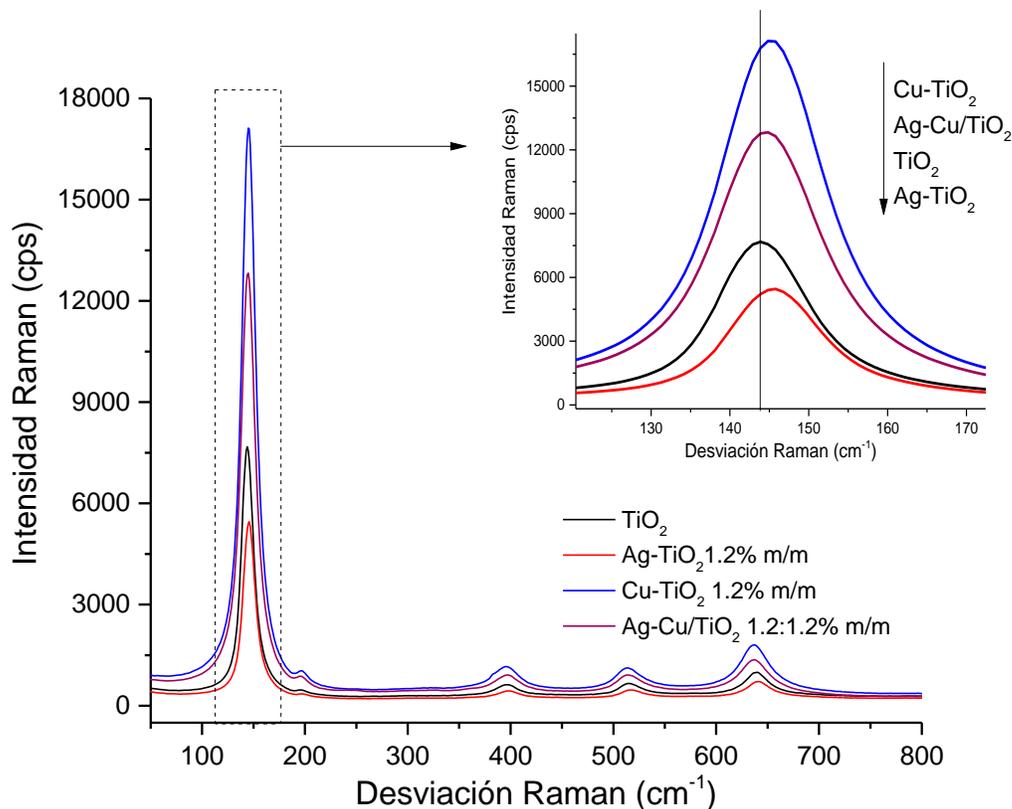


Figura 8. Espectros Raman de los fotocatalizadores TiO_2 , Ag-TiO_2 1.2, Cu-TiO_2 1.2 y Ag-Cu/TiO_2 1.2:1.2 sintetizados por el método sol-gel.

6.2.3. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).

En la Figura 9 se muestran los espectros FT-IR obtenidos para los catalizadores TiO_2 , Ag-TiO_2 1.2, Cu-TiO_2 1.2 y Ag-Cu/TiO_2 1.2:1.2. En todos los materiales se observaron las mismas bandas características, la banda correspondiente a la señal de la vibración Ti-O de estiramiento se encuentra entre 450 y 700 cm^{-1} , la cual coincide con la comúnmente reportada^{51,89-91}. Además, se observaron otras bandas, como la señal ancha alrededor de $3000\text{-}3500$ característica de los grupos hidroxilo adsorbidos en la superficie del material y la señal en 1630 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de flexión del enlace

O-H; esta señales también son atribuidas a moléculas de agua fisisorbida en el material^{51,89,92}. Adicionalmente, se observó una banda a 2230 cm^{-1} la cual corresponde al CO_2 de la atmósfera. Por último, el resto de las bandas detectadas en los espectros (1530 y 1340 cm^{-1}) indican la presencia de impurezas, las cuales podrían ser atribuidas a especies carboxilatos, hidrocarbonadas, nitratos o residuos del alcóxido empleado en la síntesis⁶⁰.

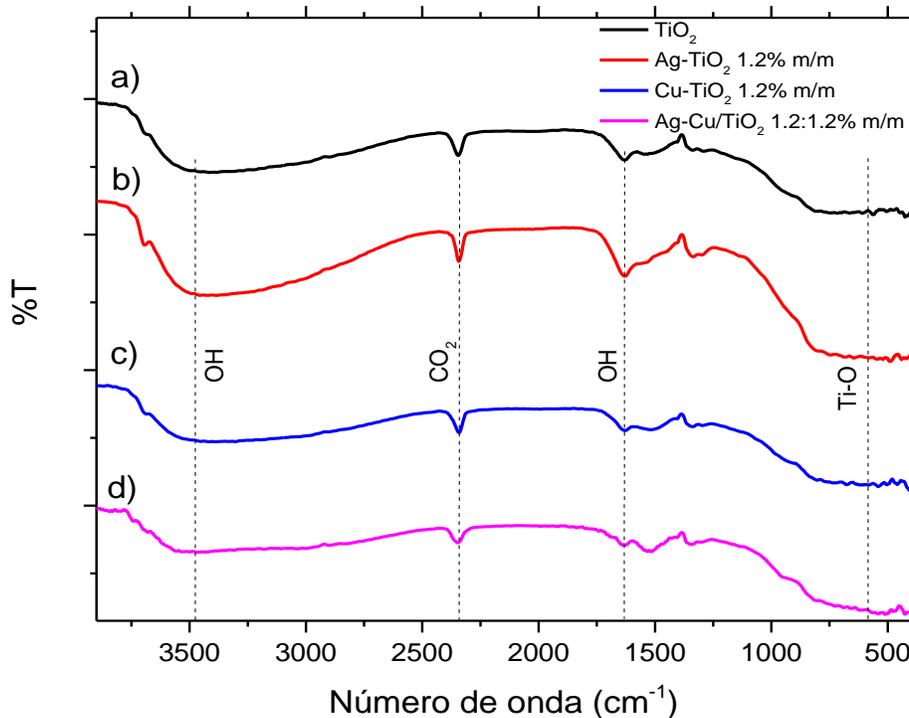


Figura 9. Espectro infrarrojo de los fotocatalizadores a) TiO_2 , b) Cu-TiO_2 1.2 %, c) Ag-TiO_2 1.2 % y d) Ag-Cu/TiO_2 1.2:1.2% m/m

6.2.4. Fisisorción de nitrógeno (método BET)

Se realizó el análisis de fisisorción de nitrógeno para cada uno de los catalizadores sintetizados, registrando sus isotermas de adsorción-desorción y mediante el software del equipo (TriStar II Plus versión 3.01) se calcularon las áreas superficiales utilizando el método BET y la distribución de poro y tamaño de poro promedio por el método BJH.

La Figura 10 muestra las isothermas de adsorción-desorción de N₂ de cuatro catalizadores a manera de ejemplo, a partir de las cuales se calcularon los valores mostrados en la Tabla 15.

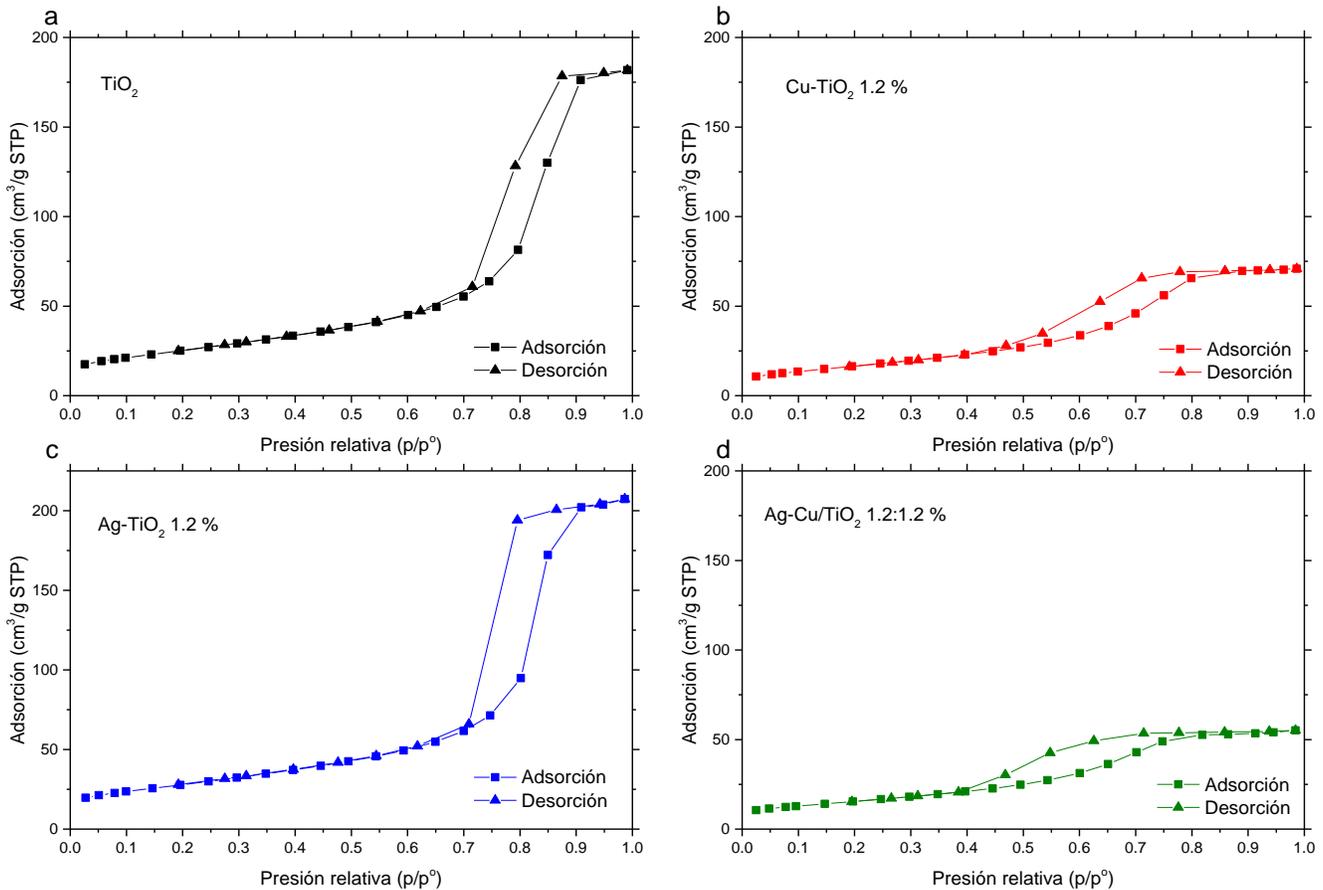


Figura 10. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ de los catalizadores: a) TiO₂, b) Cu-TiO₂ 1.2 %, c) Ag-TiO₂ 1.2 % y d) Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m

Todos los materiales sintetizados exhiben isothermas tipo IVa las cuales generalmente las presentan óxidos inorgánicos u otros sólidos porosos y son características de materiales mesoporosos según la clasificación IUPAC⁶². Por otra parte, es bien conocido que la forma y tamaño de los ciclos de histéresis aporta información sobre la morfología de los poros y la distribución de la porosidad. En este sentido, los catalizadores TiO₂ y Ag-TiO₂ presentan un lazo de histéresis del tipo H1 (Figura 10a y 10c), característico de materiales que muestran un rango estrecho de tamaños medio de sus mesoporos (8.5-9.3 nm),

como lo observado en la Figura 11, y además poseen poros con forma de bote de tinta (ink-bottle) donde el ancho del cuello es similar al ancho de la cavidad. Por otro lado, en los materiales que contienen Cu incorporado (Figura 10b y 10d) se apreció un tipo de histéresis H2(b), la cual está asociada a materiales mesoporosos formados por partículas esféricas y con una distribución de poros de varios tamaños (2.6-5.1 nm), pero con el mismo diámetro de entrada (poros cuello de botella) ^{60,62,93,94}. Los valores de tamaño de poro promedio oscilaron entre 2.85 y 9.25 nm, correspondientes a materiales mesoporosos (tamaño de poro promedio de 2 a 50 nm).

Tabla 15. Área superficial y tamaño de poro promedio de los catalizadores sintetizados

Catalizador	Área superficial (m²/g) ^a	Tamaño de poro promedio (nm) ^b
TiO ₂	91.4	9.3
Ag-TiO ₂ 1.2	100.8	8.5
Cu-TiO ₂ 1.2	61.9	5.1
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:0.3	59.4	4.6
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:1.2	53.2	3.9
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:2.1	55.8	3.9
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:0.3	61.9	4.9
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2	57	2.6
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:2.1	54.7	2.9
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:0.3	54.6	4.6
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:1.2	53.2	4.6
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:2.1	47.9	4.2

^a Método BET ^b Método BJH

En la isotermas correspondientes a los catalizadores TiO₂ y 1.2% Ag-TiO₂ (Figura 10a y 10c) se observó que hay una mayor adsorción de gas en comparación con los materiales que tienen cobre incorporado, esto se traduce en una menor área superficial para los materiales que contienen Cu respecto a los que solamente tienen Ag incorporada o el TiO₂ sin ninguna modificación. Esto se apreció en la Tabla 15, en donde las medidas del área superficial indicaron que se obtuvo mayor área superficial para los catalizadores Ag-TiO₂ y TiO₂ sin modificar (92-100 m²/g), con respecto a los catalizadores dopados con cobre, ya sea Cu-TiO₂ y los co-dopados Ag-Cu/TiO₂, los cuales presentan área superficial

que varía entre 48 y 62 m²/g. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores, donde la incorporación de Ag no modifica el área superficial del TiO₂ o la aumenta ligeramente posiblemente por las nanopartículas de plata adheridas a la superficie que aumentan ligeramente el área de contacto^{48,84,95}. Por otra parte, el dopaje con iones Cu²⁺ disminuye el área superficial^{42,96}, lo que podría atribuirse a la alta aglomeración de las partículas de TiO₂ inducida por la incorporación de cobre⁵⁰ lo cual fue confirmado posteriormente por las imágenes de SEM.

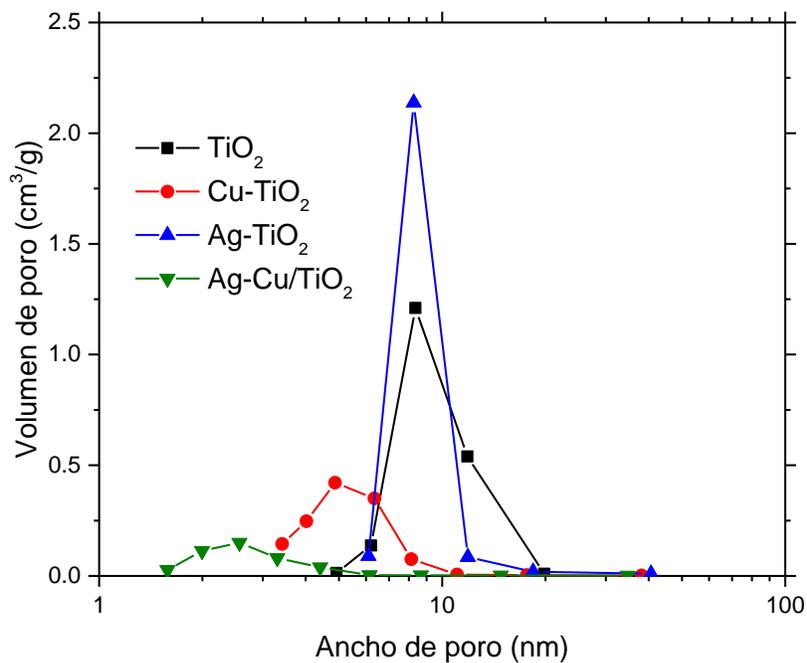


Figura 11. Distribución de tamaño de poro de los materiales TiO₂, Ag-TiO₂ 1.2, Cu-TiO₂ 1.2 y Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2

6.2.5. Espectroscopia UV-Vis con reflectancia difusa.

En la Figura 12 se muestra la representación gráfica de la ecuación de Kubelka-Munk, para algunos de los catalizadores sintetizados. La función de Kubelka-Munk fue usada para calcular la energía de banda prohibida (E_g) de los materiales obtenida de la intersección de la línea recta de la pendiente con el eje de las abscisas de la gráfica $(F(R)^*hv)^{1/2}$ vs hv .

Adicionalmente en la Tabla 16 se presentan los valores de E_g de todos los catalizadores y sus correspondientes longitudes de onda de absorción.

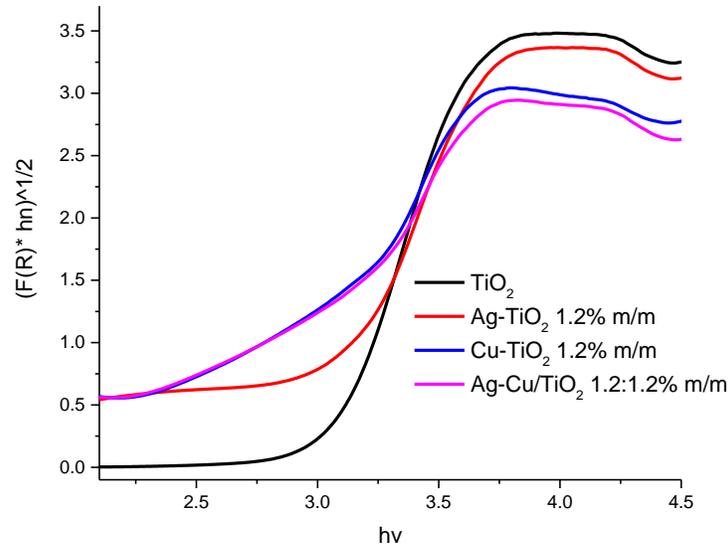


Figura 12. Representación gráfica de la ecuación de Kubelka-Munk para el cálculo de E_g de los catalizadores TiO_2 , $Ag-TiO_2$ 1.2, $Cu-TiO_2$ 1.2 y $Ag-Cu/TiO_2$ 1.2:1.2

Tabla 16. Valores de energía de banda prohibida E_g y longitud de onda de absorción calculadas por la función de Kubelka-Munk de los catalizadores

Catalizador	E_g (eV)	Longitud de onda (nm)
TiO_2	3.07	404
$Ag-TiO_2$ 1.2	3.02	411
$Cu-TiO_2$ 1.2	2.86	434
$Ag-Cu/TiO_2$ 0.3:0.3	3.00	413
$Ag-Cu/TiO_2$ 0.3:1.2	2.78	446
$Ag-Cu/TiO_2$ 0.3:2.1	2.40	517
$Ag-Cu/TiO_2$ 1.2:0.3	2.92	425
$Ag-Cu/TiO_2$ 1.2:1.2	2.84	437
$Ag-Cu/TiO_2$ 1.2:2.1	2.62	473
$Ag-Cu/TiO_2$ 2.1:0.3	2.98	416
$Ag-Cu/TiO_2$ 2.1:1.2	2.87	432
$Ag-Cu/TiO_2$ 2.1:2.1	2.55	486

La incorporación de cationes metálicos puede crear niveles de energía dentro del ancho de banda prohibida del semiconductor lo que produce un desplazamiento de absorción de los catalizadores hacia el rojo, este desplazamiento permite la absorción de energía

en la región visible del espectro¹⁷. Se encontró una correlación (Fig. 13a) entre el porcentaje de Cu²⁺ incorporado con la Eg, donde el aumento de cobre disminuye el valor del ancho de banda y, en consecuencia, el catalizador absorbe en el rango visible. Sin embargo, esta tendencia no se presentó al aumentar el porcentaje de plata, (Fig.13b) y se atribuyó al hecho de que la cantidad de Ag incorporada fue muy baja, lo cual se confirmó cuando el contenido real de este metal en el TiO₂ se determinó mediante el análisis por EAA. Cabe resaltar, que todos los catalizadores sintetizados y en especial los modificados con los metales, son activos bajo la región visible del espectro (400-700 nm) por lo que su uso en procesos fotocatalíticos con luz solar resulta más atractivo.

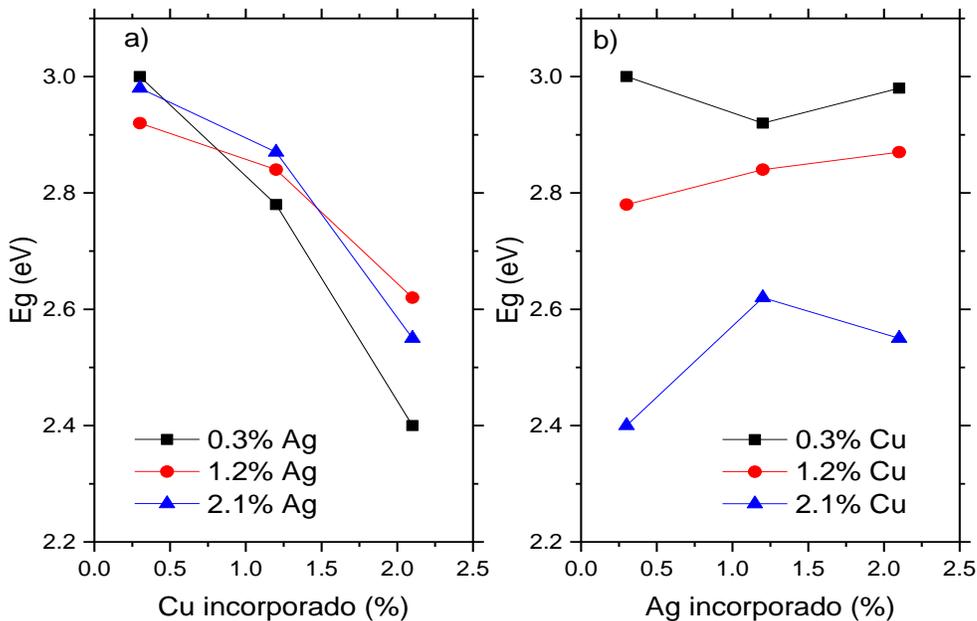


Figura 13. Correlación entre porcentaje de incorporación de a) Cu y b) de Ag versus Eg.

6.2.6. Espectroscopia de absorción atómica (EAA)

El porcentaje real de incorporación de los metales en el TiO₂ se determinó por EAA y se muestra en la Tabla 17. A grandes rasgos, se observó que el cobre fue incorporado satisfactoriamente en todos los materiales; sin embargo, la plata se incorporó en el TiO₂ en porcentajes menores a los establecidos en la síntesis. El contenido de Ag varió entre 0.1 y 0.42% m/m, correspondiente al 8 y 70% de incorporación con respecto al valor teórico, encontrando mejores rendimientos cuando se añadieron menores cantidades de

este metal, por lo cual, se deduce que hay un límite de incorporación mediante este método para la Ag. Este fenómeno ha sido reportado en otros trabajos para la incorporación de Ag y para otros metales como el Fe^{24,97}.

Tabla 17. Determinación de la incorporación de Ag y Cu por EAA de los catalizadores sintetizados por el método sol-gel

Catalizador	Ag incorporada (% m/m) ^a	Cu incorporado (% m/m) ^a
TiO ₂	N/A	N/A
Ag-TiO ₂ 1.2	0.27 ± 0.01	N/A
Cu-TiO ₂ 1.2	N/A	1.37 ± 0.1
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:0.3	0.14 ± 0.02	0.36 ± 0.08
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:1.2	0.15 ± 0.04	1.44 ± 0.03
Ag-Cu/TiO ₂ 0.3:2.1	0.21 ± 0.05	2.07 ± 0.15
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:0.3	0.16 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2	0.33 ± 0.02	1.44 ± 0.02
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:2.1	0.10 ± 0.05	2.32 ± 0.08
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:0.3	0.17 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:1.2	0.42 ± 0.10	1.36 ± 0.10
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:2.1	0.35 ± 0.08	2.48 ± 0.05

^a Medido por EAA (n=3); N/A: No aplica.

Esto puede atribuirse a diferentes razones, una de ellas podría ser que durante el método de preparación el precursor de titanio es hidrolizado muy rápidamente y no alcanzan a enlazarse con los cationes de plata dispersos en la solución acuosa cuando su concentración es muy alta, pudiendo quedar estos iones en disolución con el butanol sobrante, el cual es retirado antes de la etapa de secado. Otra causa, podría ser atribuida a la diferencia entre el radio iónico de la Ag⁺ y Cu²⁺, siendo el radio iónico de la Ag⁺ el doble que el del Ti y Cu, dificultando así su incorporación de manera sustitucional o intersticial.

6.2.7. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la Figura 14 se muestra la morfología de los materiales en las imágenes SEM. Se encontraron aglomeraciones de partículas esféricas de TiO₂ en todos los catalizadores; sin embargo, el grado de aglomeración, tamaño de partícula y homogeneidad variaron

dependiendo del material. Los materiales TiO_2 y Ag-TiO_2 mostraron menos aglomeración de las partículas, con tamaños de partículas promedio de 52 y 22 nm, respectivamente. Una menor aglomeración permite una mayor área de contacto disponible, por lo que se obtienen áreas superficiales mayores. En contraste, los materiales dopados con Cu exhiben un mayor grado de aglomeración de partículas como se observa en la Figura 14 c) y d), con tamaños de partículas promedio de 64 y 23 nm para los catalizadores de Cu-TiO_2 y Ag-Cu/TiO_2 , respectivamente. La alta aglomeración de partículas que se presentan en los catalizadores dopados con cobre da como resultado una reducción del área superficial específica con respecto al TiO_2 sin modificar, como se mostró en la Tabla 17.

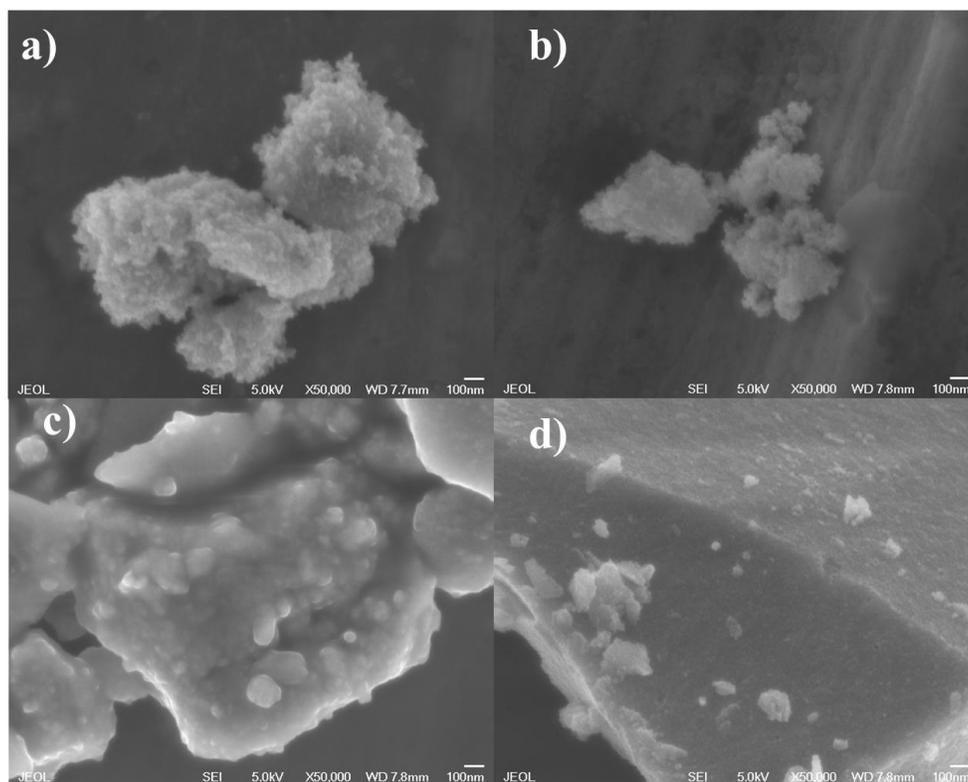


Figura 14. Imágenes del SEM de los catalizadores: **a)** TiO_2 , **b)** Ag-TiO_2 1.2, **c)** Cu-TiO_2 1.2 y **d)** Ag-Cu/TiO_2 1.2:1.2.

6.2.8. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La Figura 15 muestra el espectro XPS del catalizador Ag-Cu/TiO_2 1.2:1.2 y los espectros de alta resolución de Ti 2p, O 1s, Ag 3d y Cu 2p donde se observaron las señales típicas

de los elementos Ti, O, Ag, Cu y C. Los espectros XPS de alta resolución de Ti 2p (Fig. 15b) muestran dos picos Ti 2p_{1/2} y Ti 2p_{3/2} a energías de enlace de 458.6 y 464.4 eV, respectivamente, la distancia entre los picos de Ti 2p_{1/2} y Ti 2p_{3/2} fue de 5.8 eV, lo que indica que el Ti se encuentra como Ti⁴⁺^{90,93}. Así mismo, en la Figura 15d se observaron dos señales a 368.1 y 374.1 eV, correspondientes a Ag 3d_{5/2} y Ag 3d_{3/2} en el espectro XPS de alta resolución de Ag 3d, una división entre los dos picos de 6.0 eV es característica de la presencia de plata en su estado elemental Ag⁰^{98,99}, además no fueron encontradas señales correspondientes al ion Ag⁺, esto se atribuye al hecho de que probablemente todas las especies de Ag presentes en la superficie de TiO₂ se redujeron térmicamente a Ag⁰ por la calcinación a 450 °C durante el proceso de síntesis^{95,100}.

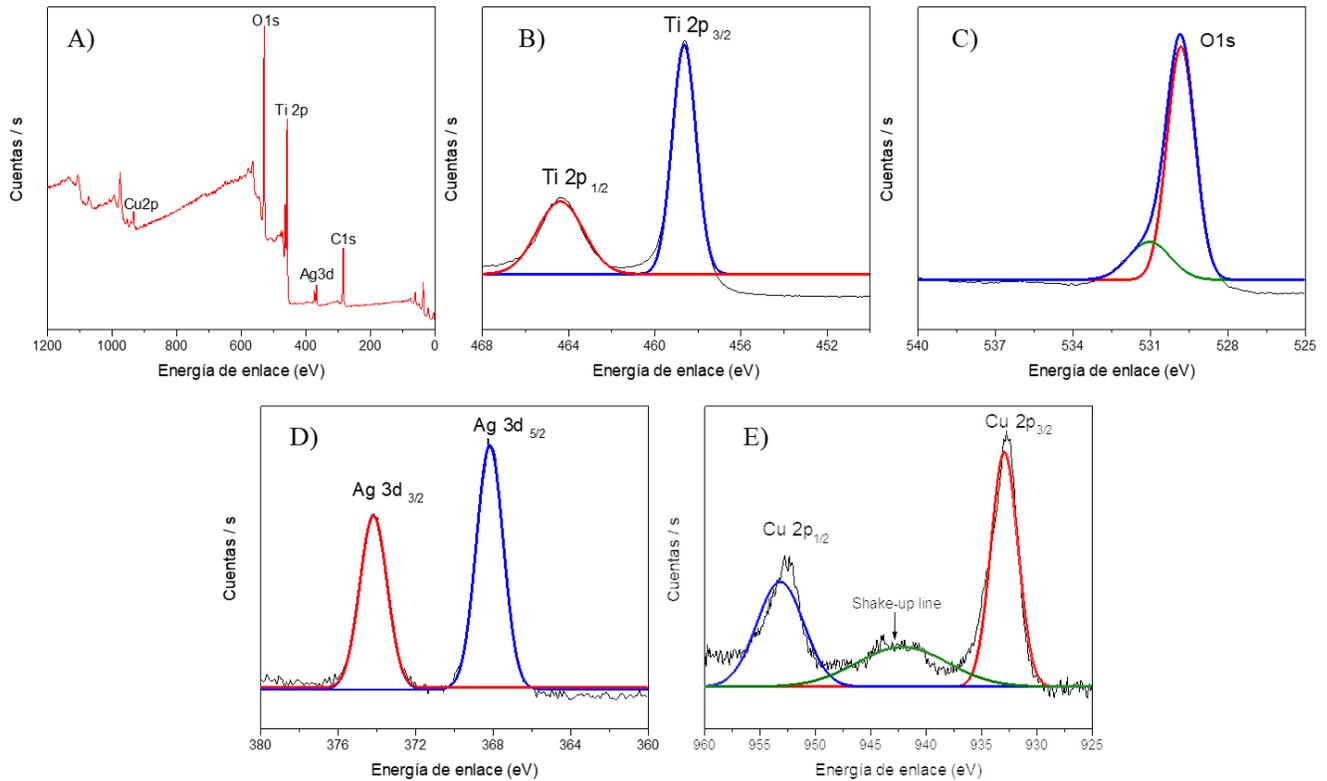


Figura 15. Espectro XPS del catalizador Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2 (A) y espectro XPS de Alta-Resolución de Ti 2p (B), O 1s (C), Ag 3d (D) y Cu 2p (E)

Por otra parte, los picos registrados a energías de enlace de 932.4 y 952.6 eV (Fig. 15e) pertenecen a Cu 2p_{3/2} y Cu 2p_{1/2}, respectivamente, corroborando la presencia de Cu en el catalizador como Cu²⁺, confirmado que este metal se encuentra incorporado de manera

sustitucional en el TiO₂. Además, la “shake-up line” que aparece alrededor de 943 eV es una señal característica de las especies Cu²⁺⁹⁶. La señal asimétrica de O 1s (Fig. 15c) se deconvolucionó en dos picos, el pico intenso a 529.9 eV corresponde al enlace titanio-oxígeno (Ti-O) y el pico a 531.1 eV se atribuyó al enlace hidrógeno-oxígeno (O-H). Finalmente, la señal C 1s (Fig. 15a) se observa comúnmente y se atribuye al carbono introducido durante la preparación de la muestra ²⁵.

6.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DE LOS CATALIZADORES Ag-Cu/TiO₂ EN LA ELIMINACIÓN DE *E. coli* Y *S. typhimurium*

6.3.1. Análisis estadístico de los experimentos de fotocatalisis heterogénea usando los catalizadores Ag-Cu/TiO₂

Los resultados de las 17 pruebas experimentales son mostrados en las Figuras 16 y 17 y se resumen en la Tabla 18. La cinética de inactivación fotocatalítica se obtuvo ajustando los datos experimentales a un modelo log-lineal, también llamado modelo de Chick-Watson (Ec. 6.1)^{101,102}.

$$\log \frac{N}{N_0} = -kCt = -k_{app}t \quad (6.1)$$

Donde k es la constante de velocidad cinética de inactivación (min^{-1}), N_0 y N son el número de microorganismos en el tiempo cero y en un tiempo determinado, respectivamente, t es el tiempo de tratamiento y C es la concentración del desinfectante. El modelo se puede simplificar integrando la concentración de desinfectante a una constante aparente de velocidad de inactivación (k_{app}).

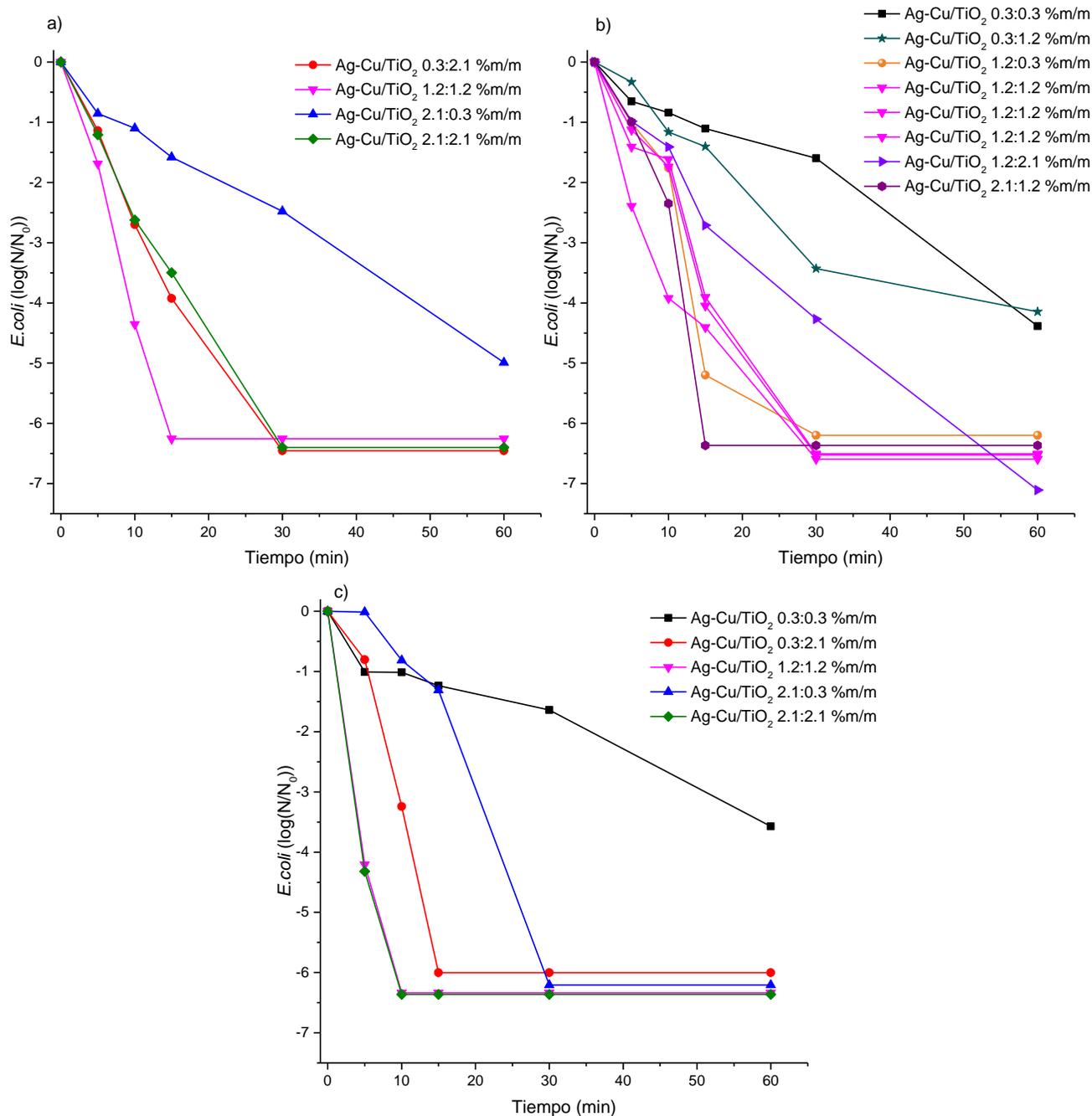


Figura 16. Inactivación fotocatalítica de *E. coli* bajo luz solar simulada usando diferentes cargas de catalizadores de acuerdo con el diseño de experimentos: a) 0.1 g/L, b) 0.3 g/L y c) 0.5 g/L.

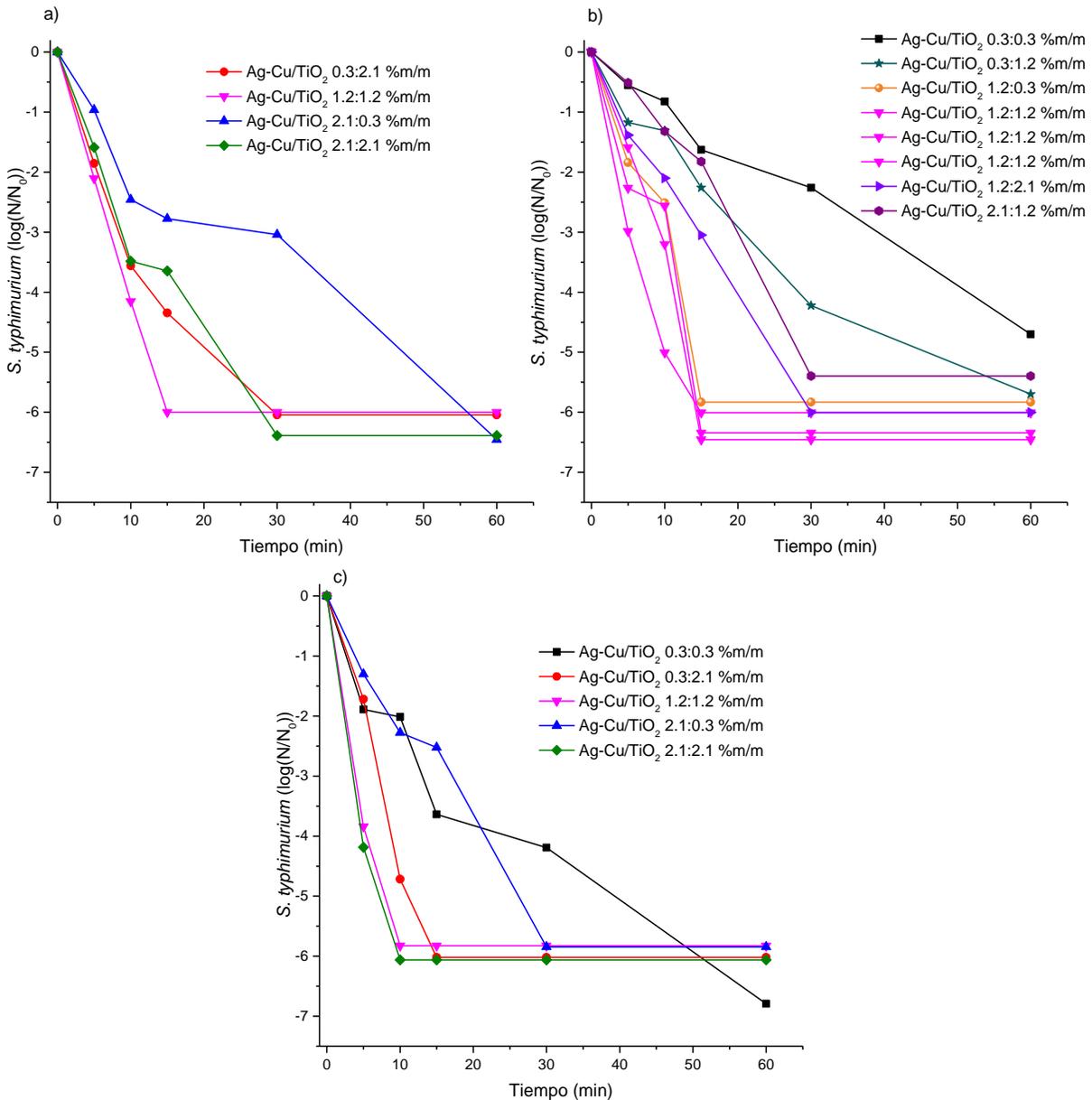


Figura 17. Inactivación fotocatalítica de *S. typhimurium* bajo luz solar simulada usando diferentes cargas de catalizadores de acuerdo con el diseño de experimentos: a) 0.1 g/L, b) 0.3 g/L y c) 0.5 g/L.

Se utilizó el análisis de varianza para evaluar la significancia del modelo y los parámetros, usando un nivel de significancia del 5%, el modelo propuesto (modelo cuadrático) y los factores se consideran significativos si el valor p es menor que 0.05. A partir de los valores p reportados en la Tabla 19, se obtuvo que el modelo cuadrático es significativo para la inactivación de *S. typhimurium* (valor p : 0.04); sin embargo, no es significativo para la

inactivación de *E. coli* (valor de p : 0.05). Además, los factores de incorporación de Cu y cantidad de catalizador resultaron significativos ($p < 0,05$) para la inactivación de ambos microorganismos. No obstante, la incorporación de Ag no fue significativa en ambos casos ($p > 0.05$). Este comportamiento se atribuyó al hecho de que la cantidad de plata incorporada es muy baja (como se observa en la Tabla 17), resultando cantidades similares de plata en la mayoría de los materiales. Caso contrario con la adición de cobre, a medida que se aumentó la cantidad de Cu^{2+} incorporado, también aumentó la velocidad de inactivación de ambas bacterias.

Tabla 18 Constantes de velocidad de inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* por desinfección fotocatalítica solar.

Catalizador	Carga de catalizador (g/L)	<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>	
		k_{app} ($\times 10^{-2}$ min $^{-1}$)	R 2	k_{app} ($\times 10^{-2}$ min $^{-1}$)	R 2
Ag-Cu/TiO $_2$ 0.3:0.3	0.1	7.00	0.97	7.94	0.98
Ag-Cu/TiO $_2$ 0.3:0.3	0.5	6.13	0.89	12.73	0.78
Ag-Cu/TiO $_2$ 0.3:1.2	0.3	7.96	0.88	10.75	0.89
Ag-Cu/TiO $_2$ 0.3:2.1	0.1	22.81	0.98	23.32	0.83
Ag-Cu/TiO $_2$ 0.3:2.1	0.5	36.13	0.93	41.73	0.98
Ag-Cu/TiO $_2$ 1.2:0.3	0.3	22.93	0.87	34.80	0.93
Ag-Cu/TiO $_2$ 1.2:1.2	0.1	41.65	0.99	40.59	1.00
Ag-Cu/TiO $_2$ 1.2:1.2	0.3	25.21	0.80	44.33	0.94
Ag-Cu/TiO $_2$ 1.2:1.2	0.3	22.15	0.97	37.74	0.90
Ag-Cu/TiO $_2$ 1.2:1.2	0.3	22.36	0.97	39.08	0.96
Ag-Cu/TiO $_2$ 1.2:1.2	0.5	67.52	0.96	61.97	0.96
Ag-Cu/TiO $_2$ 1.2:2.1	0.3	12.66	0.96	20.30	0.99
Ag-Cu/TiO $_2$ 2.1:0.3	0.1	8.51	0.98	11.33	0.87
Ag-Cu/TiO $_2$ 2.1:0.3	0.5	17.13	0.84	19.40	0.98
Ag-Cu/TiO $_2$ 2.1:1.2	0.3	35.41	0.87	16.20	0.91
Ag-Cu/TiO $_2$ 2.1:2.1	0.5	68.18	0.95	65.23	0.94
Ag-Cu/TiO $_2$ 2.1:2.1	0.1	22.14	0.99	23.13	0.92

Adicionalmente, la carga de catalizador influyó directamente en la mejora de la inactivación fotocatalítica de los microorganismos, al aumentar la cantidad de fotocatalizador (en el rango estudiado), se obtuvieron valores de constantes de velocidad más altos. Una mayor cantidad de catalizador genera más especies de oxígeno reactivas y aumenta la actividad antimicrobiana del material; sin embargo, grandes cantidades del sólido pueden inhibir el proceso, de ahí la importancia de determinar la cantidad adecuada a utilizar^{23,103}.

Dado que el modelo no fue significativo para la inactivación de *E. coli* y los coeficientes de determinación (R^2) no fueron satisfactorios, 0.8254 y 0.8379 para la inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium*, respectivamente, los modelos calculados no se utilizaron para maximizar la respuesta, en este contexto, los dos materiales que obtuvieron los valores de k_{app} más altas fueron seleccionados para los siguientes estudios y comparados con los materiales modificados individualmente y las pruebas control.

Tabla 19. Análisis de varianza para dos respuestas (inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* por fotocátalisis heterogénea solar)

Fuente de variaciones	Respuestas			
	Inactivación de <i>E. coli</i>		Inactivación de <i>S. typhimurium</i>	
	Valor-F	Valor-p	Valor-F	Valor-p
Modelo cuadrático	3.68	0.0500	4.02	0.0400*
Incorporación de Ag (A)	3.61	0.0990	1.33	0.2859
Incorporación de Cu (B)	7.14	0.0319*	6.78	0.0352*
Carga de catalizador (C)	6.14	0.0424*	7.95	0.0258*
A*B	0.32	0.5916	0.19	0.6726
A*C	1.58	0.2489	0.80	0.3995
B*C	2.36	0.1680	2.52	0.1568
A ²	2.32	0.1712	10.83	0.0133*
B ²	4.25	0.0782*	1.26	0.2984
C ²	9.08	0.0196*	6.42	0.0390*

*valor significativo $p < 0.05$

6.3.2. Actividad fotocatalítica

Los mejores resultados fotocatalíticos en la inactivación de ambas bacterias se obtuvieron utilizando la carga de catalizador de 0.5 g/L con los catalizadores co-dopados Ag-Cu/TiO₂ 2.1:2.1 y Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2, logrando la inactivación completa de ambos microorganismos en 10 min de reacción (reducción de 6 log). En la Figura 18 se muestran

algunas imágenes de las placas Petri tomadas en diferentes tiempos de tratamiento. Los resultados se compararon con la desinfección solar (SODIS por sus siglas en inglés) en donde no se añade catalizador y con la desinfección fotocatalítica usando los catalizadores Ag-TiO₂ 1.2%, Cu-TiO₂ 1.2% y TiO₂ a una carga de 0.5 g/L.

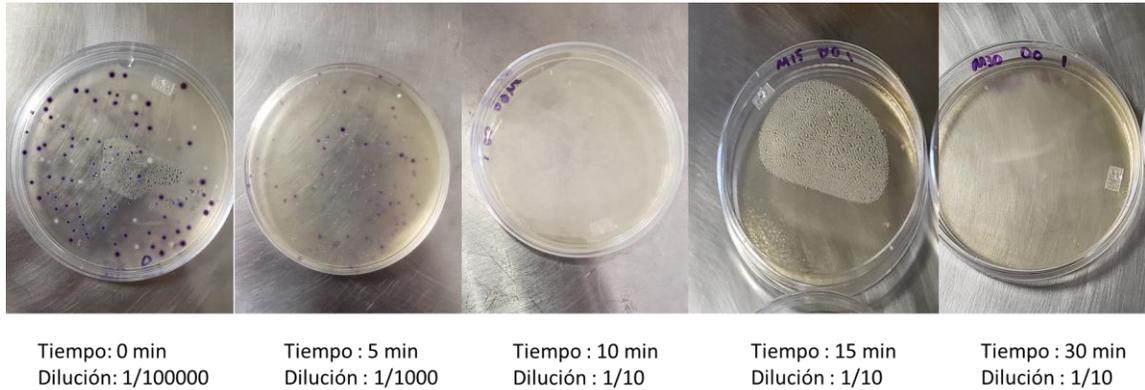


Figura 18. Placas tomadas en diferentes tiempos de tratamiento usando el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2 (*E. coli* produce colonias de color azul oscuro (violetas) y *S. typhimurium* genera colonias blancas)

De acuerdo con la Figura 19, con el proceso SODIS se logró una reducción de 3 log en la concentración de *E. coli* en 60 min, mientras que para *S. typhimurium* se obtuvo una reducción de 4.3 log en el mismo periodo, además, se evidenció que los catalizadores Ag-TiO₂ 1.2% y el TiO₂ tienen poca actividad bajo radiación visible, obteniendo una inactivación menor que el proceso SODIS en una hora de tratamiento. El material Cu-TiO₂ 1.2% inactivó ambas bacterias en 60 min de tratamiento (reducción de *E. coli* de 6.6 log y reducción de *S. typhimurium* de 5 log). Al comparar estos resultados con los obtenidos con los catalizadores co-dopados queda de manifiesto la superioridad de éstos al lograr una rápida eliminación de ambos microorganismos.

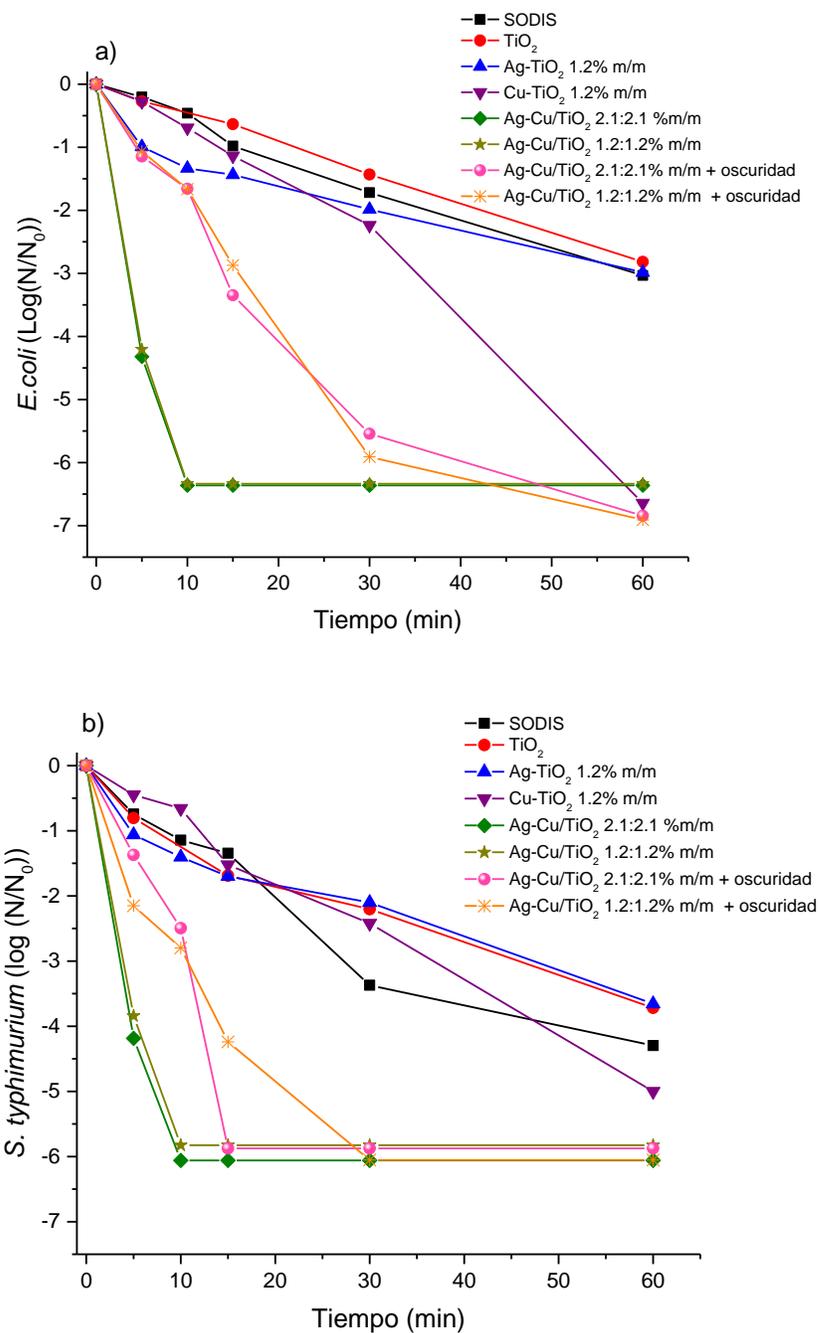


Figura 19. Perfiles de desinfección para a) *E. coli* y b) *S. typhimurium* mediante SODIS y fotocatalisis heterogénea utilizando 0.5 g/L de cada catalizador.

Por otra parte, se evaluó la actividad antimicrobiana de los materiales co-dopados Ag-Cu/TiO₂ 2.1:2.1 y Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2 con la misma carga de catalizador de 0.5 g/L en oscuridad. Como se puede ver en la Fig. 19b) *S. typhimurium* fue más sensible que *E. coli* al tratamiento con estos catalizadores en ausencia de radiación, logrando la

inactivación completa (reducción de 6 log) en 15 min con el catalizador Ag-Cu/TiO₂ 2.1:2.1 y en 30 min con Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2. Por el contrario, *E. coli* (Fig. 19a) se inactivó completamente en un tiempo más largo de 60 min utilizando ambos fotocatalizadores en la oscuridad. Este comportamiento ha sido reportado por Shahbaz y col., 2016 y Kim y col., 2013, donde se emplearon procesos fotocatalíticos usando TiO₂ para inactivar ambas bacterias; en estos estudios *S. typhimurium* fue más sensible a los procesos de desinfección por fotocátalisis en comparación con *E. coli*. Aunque ambas bacterias son gram negativas y poseen estructuras celulares similares, su resistencia no es la misma. Los autores atribuyeron este comportamiento a la sensibilidad o estabilidad que puede tener *S. typhimurium* en el medio en el que se produce la reacción, además, ambos estudios demostraron mediante imágenes SEM que *S. typhimurium* en las mismas condiciones y tiempo de inactivación usando TiO₂ con radiación UV sufrió más daño celular que *E. coli*, lo que indica la mayor sensibilidad de la membrana celular de *S. typhimurium* a algunas especies reactivas generadas en el proceso por fotocátalisis heterogénea^{104,105}.

Adicionalmente, se calcularon las constantes cinéticas para los experimentos mostrados en la Figura 19, ambos catalizadores co-dopados mostraron una mejor actividad fotocatalítica e inactivaron los microorganismos de 8 a 14 veces más rápido que el proceso SODIS, el TiO₂ y los catalizadores dopados individualmente (Tabla 20).

Tabla 20. k_{app} de la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium* por SODIS, con los catalizadores Ag-Cu/TiO₂ 2.1:2.1% p/p y Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% p/p en oscuridad y por F. H. con los catalizadores dopados individualmente

Experimento	<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	k_{app} ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$)	R ²	k_{app} ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$)	R ²
SODIS	5.24	0.99	8.13	0.90
TiO ₂	4.69	0.99	6.71	0.90
Ag-TiO ₂ 1.2	5.47	0.78	6.75	0.77
Cu-TiO ₂ 1.2	10.13	0.96	8.21	0.99
Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2	67.52	0.96	61.97	0.96
Ag-Cu/TiO₂ 2.1:2.1	68.18	0.95	65.23	0.94
Ag-Cu/TiO ₂ 1.2:1.2 sin luz	19.39	0.99	22.71	0.88
Ag-Cu/TiO ₂ 2.1:2.1 sin luz	19.11	0.98	34.26	0.92

La mejora en la inactivación de ambas bacterias con catalizadores co-dopados en comparación con los otros catalizadores se atribuye a varios factores. Por un lado, los catalizadores co-dopados son activos en la región visible (2.55-2.84 eV), mientras que los catalizadores TiO₂ y Ag-TiO₂ se activan con energía cercana a la región ultravioleta (3.07 y 3.02 eV). De esta forma, los catalizadores co-dopados pueden generar más especies reactivas de oxígeno, como los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), radicales superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), etc., logrando una mayor inactivación de los microorganismos. Se ha reportado que, en el caso de las bacterias, las especies oxidantes se unen a la pared celular bacteriana, induciendo daño celular a través de diversos procesos como la peroxidación de lípidos de la membrana y dañando el ácido nucleico bacteriano ^{13,19}.

Por otro lado, otro factor que influyó en la mejora de la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium* fueron la naturaleza de los metales incorporados en el material co-dopado, ya que es bien conocido que tanto la Ag como el Cu poseen actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas. Este efecto se demostró en las pruebas realizadas en condiciones de oscuridad donde se observó que las bacterias se inactivan, pero requieren tiempos más prolongados para su eliminación completa. Se ha reportado que los iones y las nanopartículas metálicas pueden penetrar en las células y afectar la integridad de la membrana, generar radicales libres, desnaturalizar proteínas y enzimas y dañar la información genética¹⁰⁶. Adicionalmente, el ion Cu^{2+} incorporado al TiO₂ y las nanopartículas de Ag^0 presentes en la superficie del catalizador pueden actuar como trampas de electrones y mejorar la separación del par electrón-hueco disminuyendo la tasa de recombinación de estos, y así contribuir a mejorar la velocidad de inactivación en comparación con el TiO₂ sin modificar ^{44,95}.

Dado que los catalizadores Ag-Cu/TiO₂ 2.1:2.1% m/m y 1.2:1.2% m/m tuvieron el mejor comportamiento, se concluyó que una incorporación en el TiO₂ entre el 1.0 y 2.5% m/m de Cu con 0.35% de Ag (Tabla 17) favorece la actividad de estos catalizadores en la eliminación de las bacterias. Por lo tanto, se eligió el catalizador Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2 para los experimentos de las especies reactivas, reúso del catalizador y pruebas en el efluente real. Esto debido a que tiene el mismo comportamiento fotocatalítico; sin embargo, el uso de reactivos para su síntesis es menor, generando un menor costo del material.

6.3.3. Estudio de especies reactivas

Se realizaron pruebas de inactivación con agentes secuestradores de especies reactivas, esto con el fin de determinar la contribución de las principales especies en la inactivación fotocatalítica de *E. coli* y *S. typhimurium*. Para estos experimentos se utilizó isopropanol (10 mM) y oxalato de sodio (10 mM) como secuestrantes (scavengers) de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y huecos (h^+) respectivamente; de manera similar, se utilizó el complejo Fe-EDTA (0.1 mM) y benzoquinona (0.05 mM) como captador de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), respectivamente.

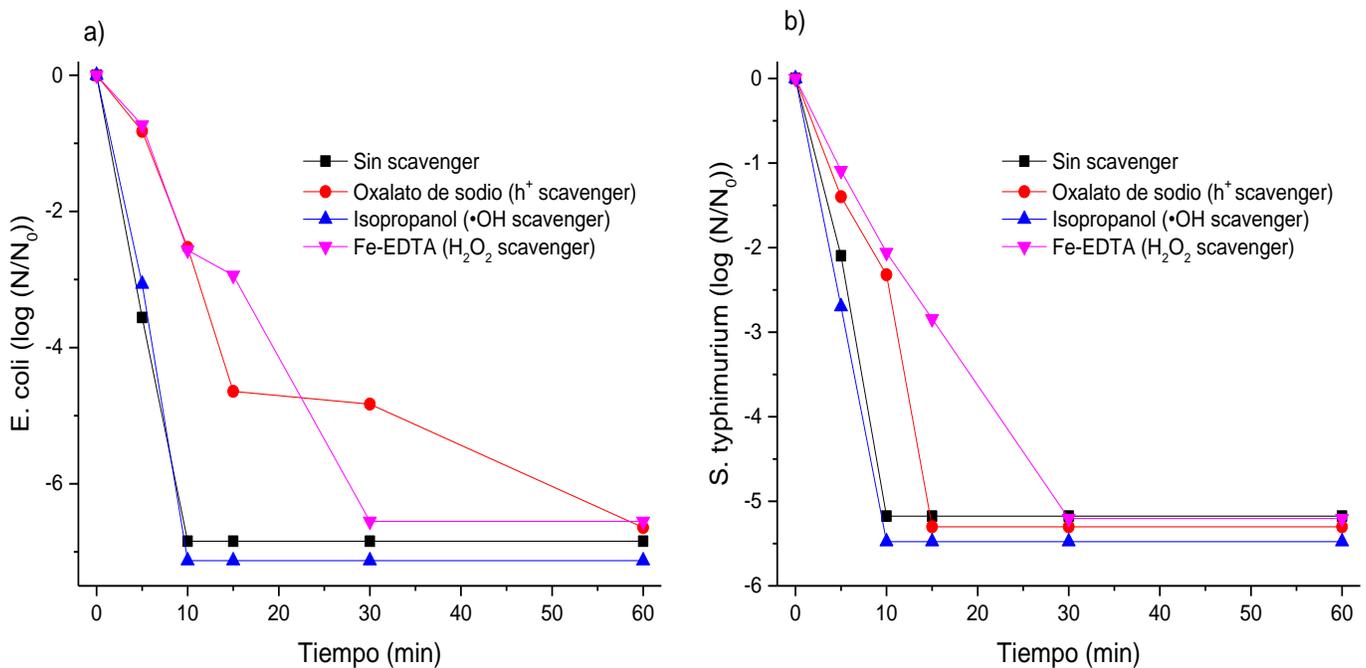


Figura 20. Inactivación fotocatalítica de a) *E. coli* y b) *S. typhimurium* usando el catalizador Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m en presencia y ausencia de diferentes secuestradores de especies reactivas.

Los resultados mostraron que cuando se usó isopropanol como secuestrante de radicales hidroxilo, el perfil de inactivación no cambió con respecto a la prueba control (sin adición de ningún reactivo), este hecho indica que el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) no presenta un papel importante en la inactivación bacteriana como especie reactiva (Figura 20). Por otro lado, la adición de oxalato de sodio y Fe-EDTA inhibió la eliminación bacteriana, provocando una reducción significativa en la velocidad de desinfección. Este resultado indica que

ambas especies oxidantes, h^+ (oxidación directa por huecos) y H_2O_2 , tuvieron un papel importante en la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium*. Los resultados correspondientes al uso de benzoquinona no fueron presentados debido a que este agente secuestrante es altamente tóxico para las células de *E. coli* y *S. typhimurium*, por lo que no se observaron colonias de estos patógenos tras la adición de benzoquinona. En resumen, para este sistema de reacción fotocatalítica, el $\bullet OH$ juega un papel menor en la inactivación fotocatalítica, mientras que el h^+ y el H_2O_2 son las principales especies reactivas que participan en la inactivación de ambos microorganismos.

6.3.4. Estabilidad y reusabilidad del catalizador

La estabilidad del catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ se investigó repitiendo los experimentos de inactivación fotocatalítica de *E. coli* durante cinco ciclos consecutivos de uso. Entre cada ciclo, el catalizador se recuperó centrifugando y secándolo para utilizarlo inmediatamente en el siguiente experimento sin lavados previos. Los resultados se muestran en la Figura 21 donde se obtuvo una eliminación completa del microorganismo en los cinco ciclos consecutivos, observando un ligero incremento en el tiempo requerido para lograr la inactivación (15-30 min).

Por otro lado, la lixiviación de metales desde el catalizador es un fenómeno que puede ocurrir durante el proceso fotocatalítico. Por esto, la cantidad de cobre y plata liberados del catalizador a la disolución después de un ciclo de uso fue medida mediante EAA (límite de detección para ambos metales de 0.1 mg/L). Después del tiempo de reacción (60 min) no se detectó cobre en la disolución, por lo que la lixiviación de este metal del catalizador fue despreciable, esto fue atribuido a que el Cu se incorporó de manera sustitucional en el TiO₂, por lo cual, se encontraba fuertemente adherido al material. Por el contrario, se encontró una liberación gradual de plata incorporada en el material hacia la disolución (Figura 22). La concentración de plata liberada al final del tratamiento fue de 0.85 mg/L, lo cual corresponde al 52% de la plata inicial que se encontraba incorporada en el catalizador, esto fue atribuido a que la plata se incorporó de forma superficial en el TiO₂, provocando que sea más fácil que esta se desprenda del catalizador. Además, esta

pérdida de plata explica el hecho de que la inactivación de *E. coli* después de cada ciclo de reutilización lleva más tiempo. Para el primer uso, la inactivación completa se logró en 10 min, aunque para los ciclos 2 y 3 el tiempo necesario para alcanzar la inactivación total aumentó ligeramente a 15 min. Finalmente, se requirieron 30 min para eliminar los microorganismos en los ciclos consecutivos 4 y 5. Los resultados obtenidos demuestran una excelente actividad fotocatalítica del catalizador co-dopado, manteniendo la eficiencia en la eliminación de bacterias hasta por cinco ciclos de uso.

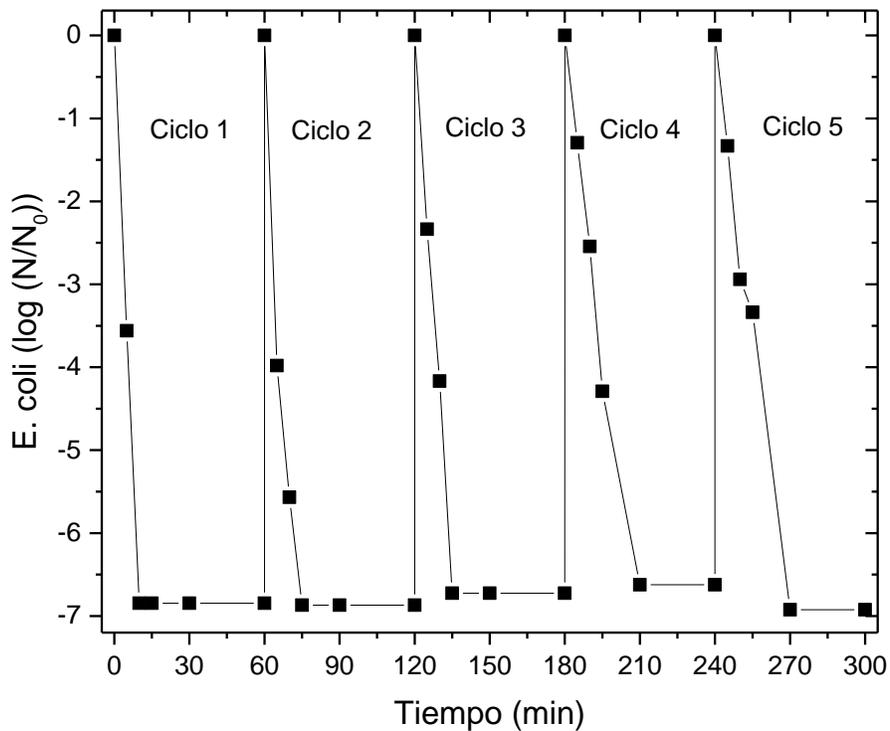


Figura 21. Reutilización del catalizador Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m después de diferentes ciclos consecutivos de uso en la inactivación fotocatalítica de *E. Coli*.

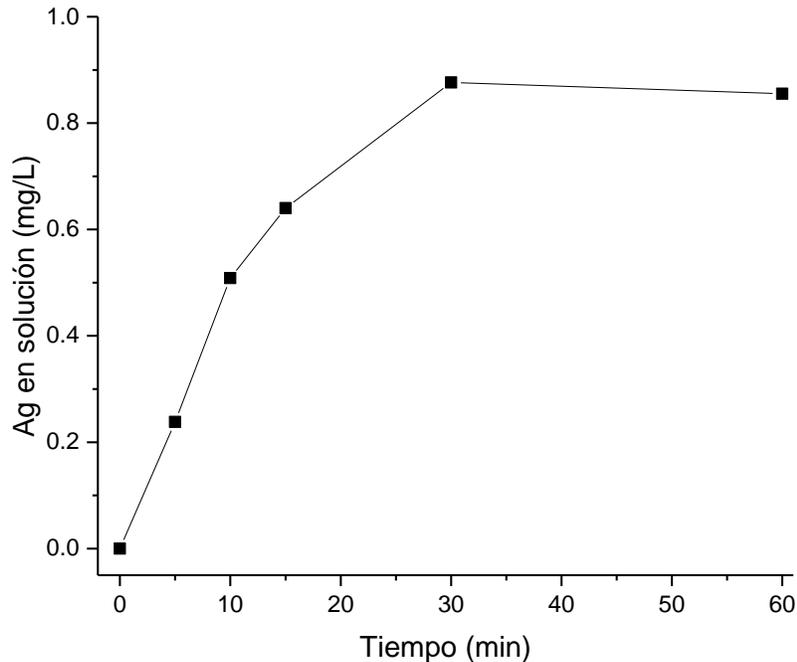


Figura 22. Plata lixiviada desde el catalizador co-dopado a la disolución.

Con base en los resultados obtenidos de la lixiviación de los metales en la disolución, se decidió complementar las pruebas control realizando una prueba con la sal del metal en la cantidad máxima de plata lixiviada del catalizador. Para ello se utilizó nitrato de plata como fuente de plata y se añadió en una cantidad adecuada para obtener una concentración final de 0.85 mg/L. Se llevó a cabo una prueba en oscuridad y otra prueba bajo radiación solar simulada y los resultados son mostrados en la Figura 23. Se comprobó el efecto bactericida de la plata; sin embargo, fueron necesarios tiempos más prolongados comparados con la fotocatalisis heterogénea para lograr una completa inactivación de ambas bacteria, En el caso de *S. typhimurium* fue eliminada completamente en periodos de tratamiento entre 30 y 60 min, no obstante, *E. coli* no logró ser inactivada por completo solamente con la plata disuelta en disolución, sin embargo, al añadir luz solar simulada se logró una completa eliminación en un tiempo prolongado de 60 min.

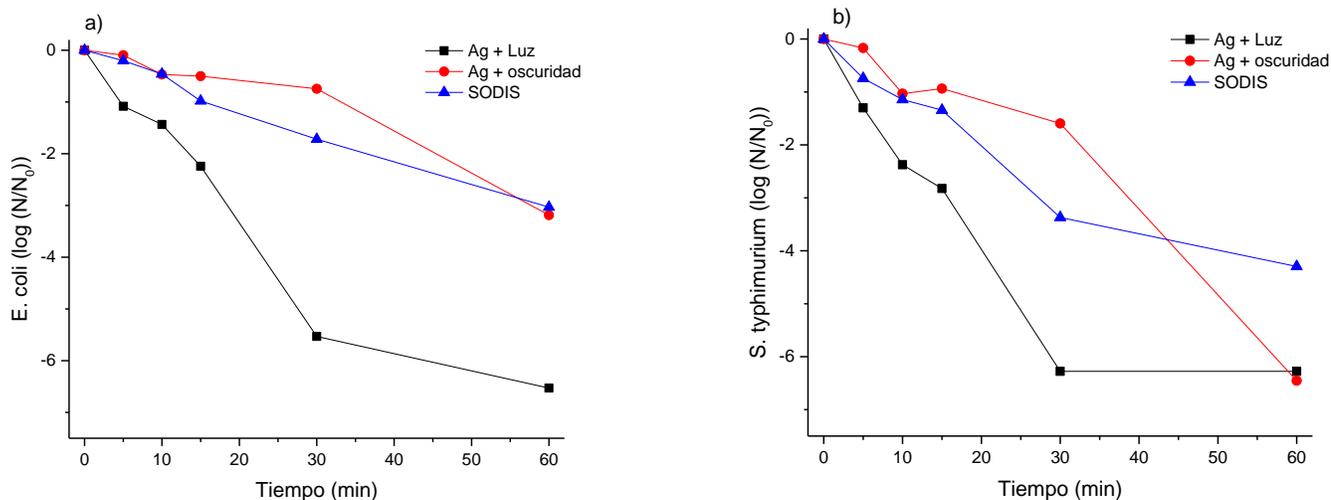


Figura 23. Inactivación de a) *E. coli* y b) *S. typhimurium* usando 0.85 mg/L de plata en disolución en presencia y ausencia de radiación solar simulada.

6.3.5. Mecanismo propuesto de inactivación fotocatalítica de los microorganismos por el catalizador Ag-Cu/TiO₂ bajo radiación solar.

Con base en los estudios de especies reactivas, estabilidad del catalizador y con los resultados obtenidos de las pruebas en oscuridad, se propuso un mecanismo de inactivación, que se ilustra en la Figura 24. El H₂O₂ generado por la reducción de oxígeno y los huecos fotogenerados durante el proceso, atacan principalmente a la membrana celular de la bacteria y posteriormente al contenido intracelular, mientras que las nanopartículas y los iones metálicos penetran en la célula causando daño interno a través de los diferentes procesos antes mencionados en la sección 6.3.2^{13,19,106}.

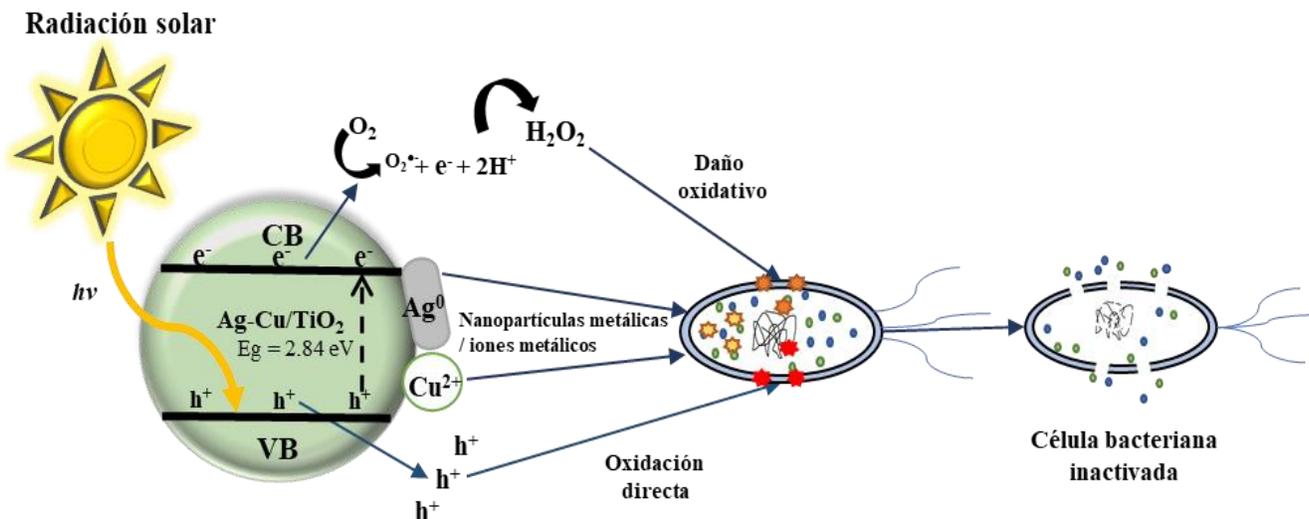


Figura 24. Mecanismo propuesto de inactivación fotocatalítica de bacterias gram-negativas utilizando el catalizador Ag-Cu/TiO₂ bajo radiación solar.

6.3.6. Pruebas de recrecimiento bacteriano después del tratamiento fotocatalítico

Se realizó una prueba de recrecimiento bacteriano después del tratamiento fotocatalítico para *E. coli* y *S. typhimurium*, llevando a cabo un experimento de desinfección a la mejor condición (0.5 g/L de Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2 % m/m) bajo radiación solar simulada, en donde fueron irradiados 200 mL de agua destilada con ambas bacterias en mezcla usando el catalizador en suspensión por 60 min. Al final del tratamiento fotocatalítico (60 min) se tomó una muestra y se dejó de irradiar y agitar la solución, posteriormente, dos muestras más fueron tomadas a las 24 y 48 h; la disolución se mantuvo en condiciones de oscuridad entre cada toma de muestra y cada una de las muestras fue sembrada para observar la cantidad de bacterias a los tiempos estudiados. Se encontró que en ninguno de los casos hubo recrecimiento, por lo cual, las bacterias que han sido inactivadas mediante este proceso son incapaces de volver a reproducirse o activarse y se comprueba que estas son eliminadas completamente del agua¹⁰⁷.

6.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL PROCESO FOTO-FENTON HETEROGÉNEO USANDO ÓXIDO DE HIERRO (III) EN LA ELIMINACIÓN DE *E. coli* y *S. typhimurium*

Antes de iniciar los experimentos del proceso foto-Fenton heterogéneo solar se analizó por DRX los óxidos de hierro III adquiridos comercialmente de marca Sigma-Aldrich. En la Figura 25 se muestran los difractogramas de los óxidos de hierro (Fe_2O_3) y se confirmó que presentan el patrón correspondiente a la fase maghemita (Fig 25a) ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ficha JCPDS No. 39-1346) y fase hematita (Fig. 25b) ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ficha JCPDS No: 79-0007). Ambas fases han mostrado buenos resultados en la inactivación de bacterias y virus^{55,108}.

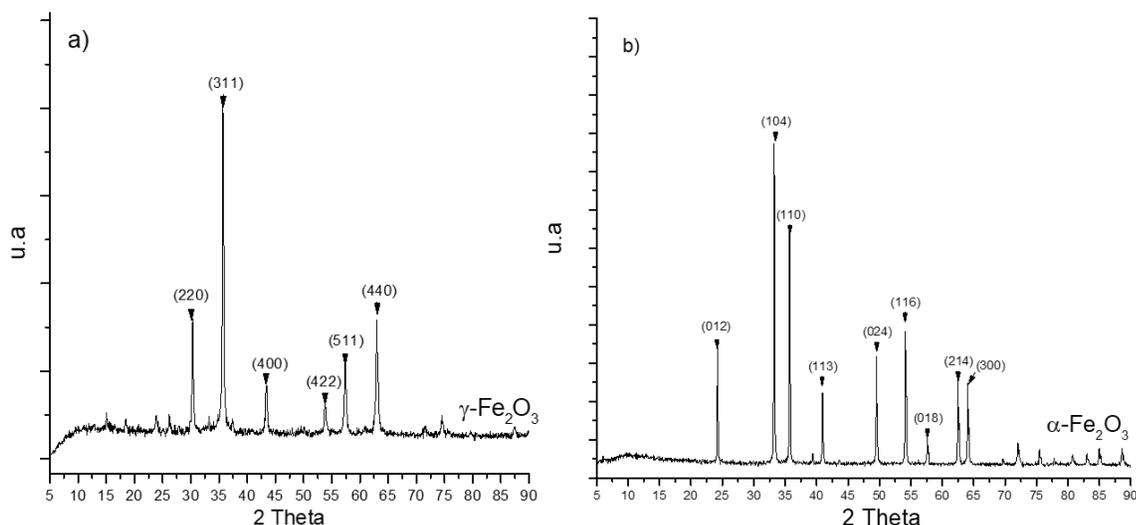


Figura 25. Difractogramas de los óxidos de hierro (III) utilizado para las pruebas de foto-Fenton. a) Fase maghemita, b) fase hematita.

6.4.1. Análisis estadístico de los experimentos de foto-Fenton heterogéneo usando óxido de hierro (III) fase maghemita.

Los resultados de las 11 pruebas del diseño de experimentos son mostrados en las Figura 26, donde se varió la cantidad de Fe^{3+} (2-10 mg/L) proveniente de Fe_2O_3 y de H_2O_2 (2-10 mg/L). Además, la Tabla 21 presenta las constantes cinéticas de la eliminación de las bacterias, las cuales fueron calculadas ajustando los datos experimentales al modelo Chick-Watson descrito en la sección 6.3.1.

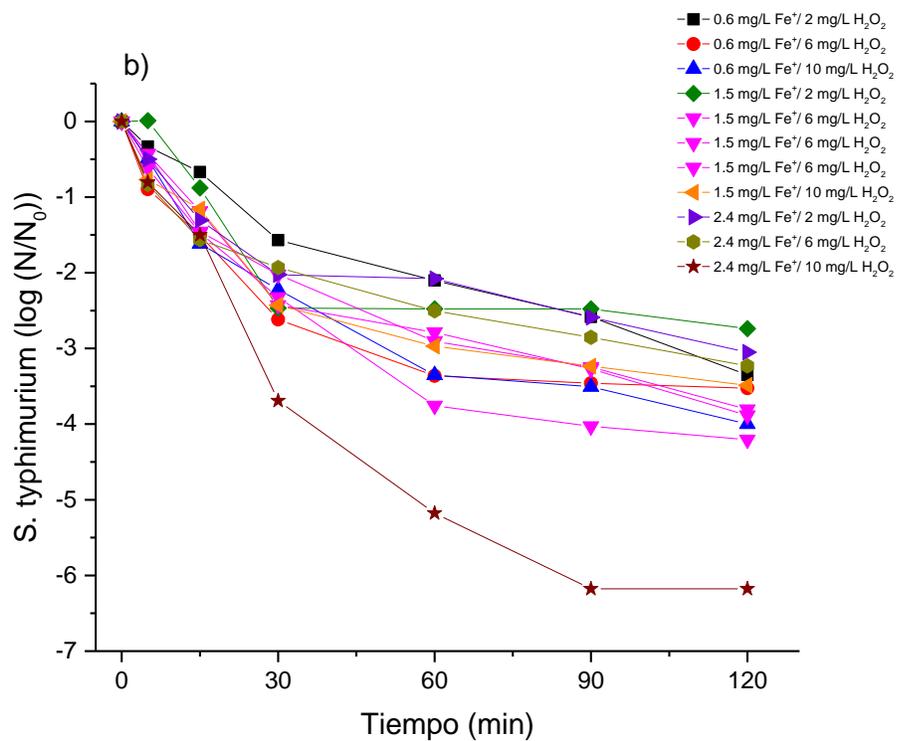
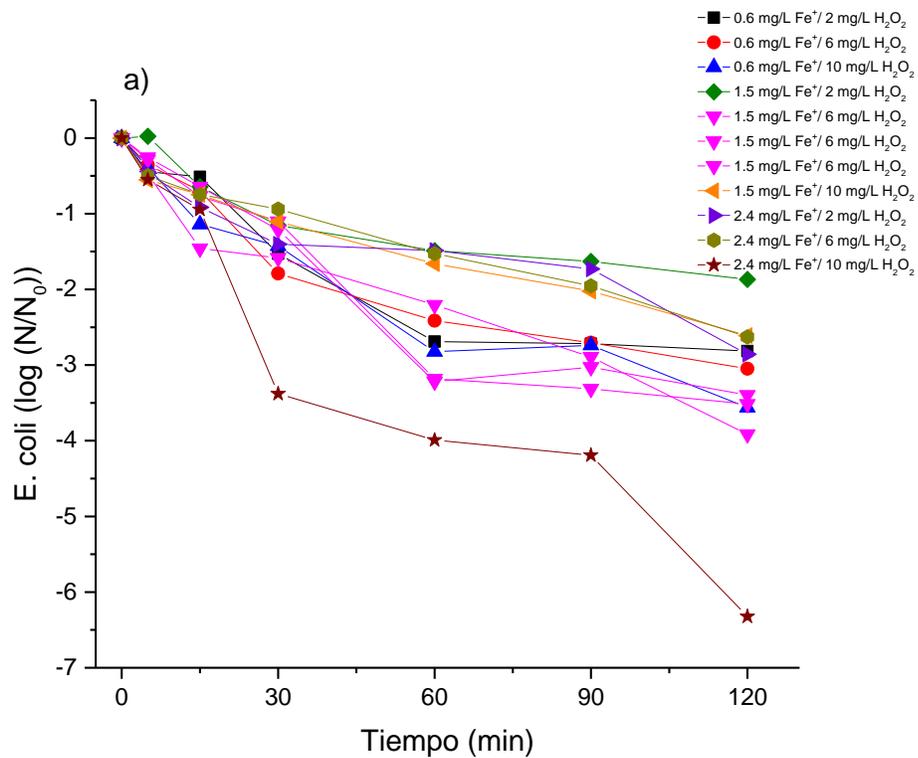


Figura 26. Inactivación de a) *E. coli* y b) *S. typhimurium* mediante el proceso foto-Fenton solar heterogéneo con maghemita, bajo diferentes cantidades de hierro y H₂O₂ adicionado.

Tabla 21. Constantes de velocidad de inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* por foto-Fenton solar heterogéneo.

Fe ³⁺ (mg/L)	H ₂ O ₂ (mg/L)	<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>	
		k _{app} (x10 ⁻² min ⁻¹)	R ²	k _{app} (x10 ⁻² min ⁻¹)	R ²
0.6	2	2.93	0.93	3.01	0.97
0.6	6	3.01	0.94	3.82	0.87
0.6	10	3.32	0.95	4.00	0.92
1.5	2	1.85	0.92	2.89	0.85
1.5	6	3.38	0.94	4.36	0.92
1.5	6	3.51	0.95	3.70	0.94
1.5	6	3.43	0.97	3.75	0.93
1.5	10	2.36	0.96	3.60	0.90
2.4	2	2.37	0.93	2.84	0.88
2.4	6	2.29	0.97	3.23	0.90
2.4	10	5.48	0.95	7.81	0.96

El diseño de experimentos central compuesto centrado en las caras 2² fue analizado utilizando el análisis de varianza esto con el fin de evaluar la significancia del modelo y los parámetros. El modelo propuesto para este análisis fue un modelo lineal de interacción de dos factores, usando un nivel de significancia del 5%, el modelo propuesto y los factores se consideran significativos si el valor *p* es menor que 0.05. A partir de los valores *p* reportados en la Tabla 22, se obtuvo que el modelo lineal de interacción de dos factores es significativo solamente para la inactivación de *S. typhimurium* (valor *p*: 0.04); sin embargo, no fue significativo para la inactivación de *E. coli* (valor de *p*: 0.17). Por otra parte, el factor cantidad de peróxido de hidrógeno resultó significativo para la inactivación de *E. coli* con un nivel de significancia del 10% (valor de *p*: 0.09) y para *S. typhimurium* con un nivel de significancia de 5% (valor de *p*: 0.02). No obstante, la adición de Fe³⁺ no fue significativa para ambos casos (*p* > 0.05). Este comportamiento fue atribuido a que no hubo una variación considerable entre las cantidades de hierro adicionadas (0.6 a 2.4 mg/L), lo que provocó resultados similares en la mayoría de los casos.

Tabla 22. Análisis de varianza para dos respuestas (inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* por foto-Fenton solar heterogéneo)

Respuestas

Fuente de variaciones	Inactivación de <i>E. coli</i>		Inactivación de <i>S. typhimurium</i>	
	Valor-F	Valor-p	Valor-F	Valor-p
Modelo Lineal 2FI ^a	2.29	0.1655	4.93	0.0378*
Fe ³⁺ (A)	0.19	0.6763	1.77	0.2253
H ₂ O ₂ (B)	3.94	0.0875*	8.51	0.0225*
A*B	2.73	0.1423	4.53	0.0709

Valor significativo * p<0.10, * p< 0.05

^a 2-Factor interacción

Adicionalmente, se observó en la Figura 26 y Tabla 21 que no hubo una tendencia en el aumento de la velocidad de inactivación de ambas bacterias al aumentar o disminuir la cantidad de hierro o la cantidad de peróxido de hidrógeno adicionada al proceso, por lo cual, se sugiere aumentar el rango de estudio de las variables con el fin de dilucidar de una mejor forma el efecto de éstas en la eliminación de *E. coli* y *S. typhimurium*.

Por último, dado que el modelo no fue significativo para la inactivación de *E. coli* y los coeficientes de determinación (R^2) no fueron satisfactorios, 0.4951 y 0.6789 para la inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium*, respectivamente, los modelos calculados no se utilizaron para maximizar la respuesta.

Sin embargo, se determinó que el proceso foto-Fenton solar heterogéneo usando 2.4 mg/L de Fe³⁺ proveniente de maghemita y 10 mg/L de H₂O₂ logra una completa inactivación de las bacterias en 120 min de tratamiento, siendo de 1.6 a 3.0 veces más rápido en la eliminación de *E. coli* y de 1.8 a 2.8 veces más rápido en la eliminación *S. typhimurium*, con respecto a las otras condiciones estudiadas en foto-Fenton heterogéneo. Siendo ésta la mejor condición obtenida en el rango estudiado. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Giannakis y col. en 2017 donde encontraron que usando el óxido de hierro fase maghemita obtienen una inactivación completa de *E. coli* en 120 min de tratamiento bajo condiciones similares (1 mg/L Fe₂O₃ y 10 mg/L H₂O₂)¹⁴.

6.4.2. Actividad fotocatalítica del proceso foto-Fenton heterogéneo y pruebas control

Bajo la mejor condición se realizaron las pruebas control correspondientes y además se comparó con el proceso foto-Fenton heterogéneo usando óxido de hierro (III) fase hematita, los resultados son mostrados en la Figura 27.

Se observó que tanto la maghemita como la hematita logran una inactivación completa de ambas bacterias en 120 min de tratamiento, esto estuvo de acuerdo con otros estudios en donde la fase hematita también presenta buenos resultados en la inactivación de *E. coli* a concentraciones similares de reactivos (0.6 mg/L Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2)⁵⁵. Se evidenció que el proceso SODIS en un tiempo de tratamiento de 120 min no logra eliminar completamente a la *E. coli* y *S. typhimurium*, logrando una reducción de aproximadamente 4-log para cada bacteria al final del tratamiento, obteniendo resultados análogos con la prueba de H_2O_2 con radiación solar simulada. Por lo cual, se encontró que la adición de peróxido de hidrogeno no mejora la inactivación de las bacterias cuando se encuentran irradiadas bajo radiación solar simulada. Esto se confirmó al observar la curva de inactivación de peróxido de hidrogeno en ausencia de radiación, donde se encontró que a la concentración de 10 mg/L produce solamente la reducción de 1-log de la cantidad de bacterias presentes.

Por último, este estudio mostró que el proceso de fotocatalisis heterogénea utilizando oxido de hierro (III) fase maghemita fue poco efectivo para la eliminación de bacterias en medio acuoso, este resultado se atribuyó a que posee una E_g muy corta (1.9 eV), lo que produce que la tasa de recombinación sea muy alta y la generación de ROS no sea efectiva. Por otra parte, su disminución de efectividad con respecto al proceso SODIS se debe a que al estar en dispersión este catalizador bloquea la luz y produce un efecto de apantallamiento, lo que disminuye el efecto de la radiación sobre las células bacterianas, disminuyendo drásticamente la capacidad de inactivar a la *E. coli* y *S. typhimurium*.

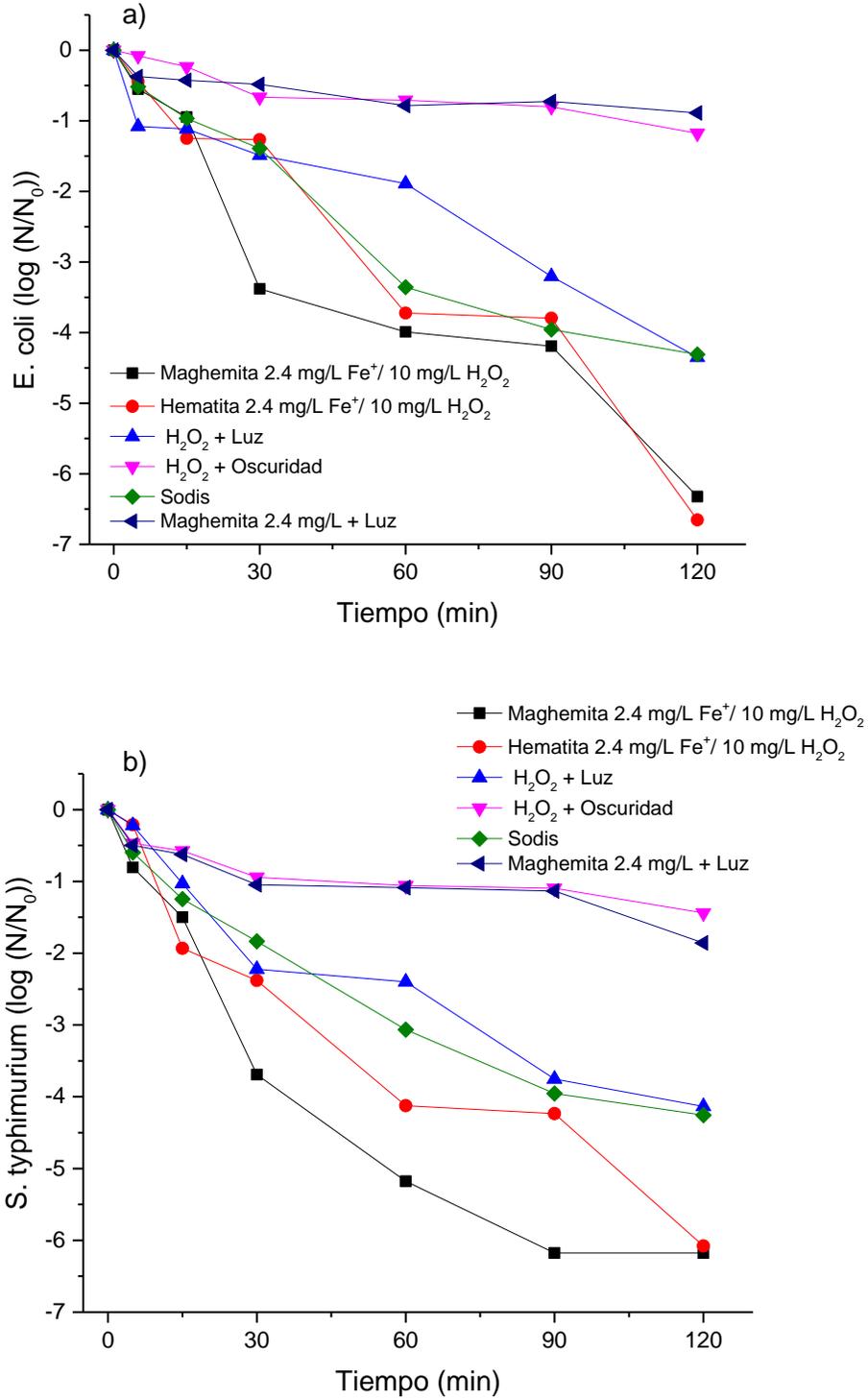


Figura 27. Inactivación de a) *E. coli* y b) *S. typhimurium* mediante foto-Fenton heterogéneo con maghemita y hematita y sus respectivas pruebas control.

6.4.3. Pruebas de recrecimiento bacteriano después del tratamiento foto-Fenton heterogéneo

Del mismo modo que se realizó la prueba de recrecimiento para el proceso de fotocatalisis heterogénea fueron realizadas dos pruebas de recrecimiento bacteriano después del tratamiento foto-Fenton heterogéneo para *E. coli* y *S. typhimurium*. Para esto fueron llevados a cabo dos experimentos de desinfección usando 2.4 mg/L de óxido de hierro (III) fase maghemita y hematita y 10 mg/L de H₂O₂. En este sentido, ambas bacterias en mezcla fueron irradiadas con luz solar simulada usando cada uno de los óxidos de hierro (III) estudiados y peróxido de hidrogeno por 120 min. Al final del tratamiento fotocatalítico (120 min) se tomó una muestra y se dejó de irradiar y agitar la disolución, posteriormente, dos muestras más fueron tomadas a las 24 y 48 h; la disolución se mantuvo en condiciones de oscuridad entre cada toma de muestra y cada una de las muestras fue sembrada para observar la cantidad de bacterias a los tiempos estudiados. Se encontró que en el caso del proceso foto-Fenton heterogéneo usando hematita no hubo recrecimiento bacteriano a las 48 h posteriores de finalizado el tratamiento; sin embargo, cuando se empleó maghemita como catalizador se observó una reactivación parcial de las bacterias, a las 24 h la cantidad de *E. coli* y *S. typhimurium* fue de 2.88×10^4 y 6.00×10^2 UFC/mL, respectivamente, y a las 48 h se incrementó levemente hasta 3.08×10^4 UFC/mL para *E. coli* y 1.7×10^3 UFC/mL para *S. typhimurium*. Este recrecimiento bacteriano fue atribuido a que probablemente al final del tratamiento (120 min) se había inducido un daño celular limitado, no siendo tan importante como para lograr obstaculizar la capacidad de multiplicación de las bacterias después de que la disolución ya no se encontrara irradiada¹⁵. Este comportamiento también ha sido reportado por algunos investigadores donde reportan un recrecimiento bacteriano después de que el tratamiento por SODIS o AOPs ha finalizado y las muestras han sido almacenadas en oscuridad por periodos de tiempo entre 12 y 72 h^{15,107,109}.

6.5. COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL PROCESO FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA Y EL FOTO-FENTON HETEROGÉNEO EN LA INACTIVACIÓN DE *E. coli* Y *S. typhimurium* EN UN EFLUENTE SECUNDARIO DE UNA PTAR

Ambos tratamientos fueron evaluados en la inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* en agua proveniente de un efluente secundario de la PTAR (E.S-PTAR) previamente esterilizado, esto con el fin de evaluar el efecto de los iones y materia orgánica en la eficacia de los procesos fotocatalíticos. La matriz utilizada fue la recolectada en marzo de 2021 y la caracterización de este efluente se encuentra descrita en la Tabla 10. En ambos procesos se utilizaron las mejores condiciones encontradas. Para fotocatalisis heterogénea (F.H) se usó 0.5 g/L del catalizador del Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m y para foto-Fenton heterogéneo (F.F.H), 2.4 mg/L de Fe³⁺ y 10 mg/L de H₂O₂. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 28.

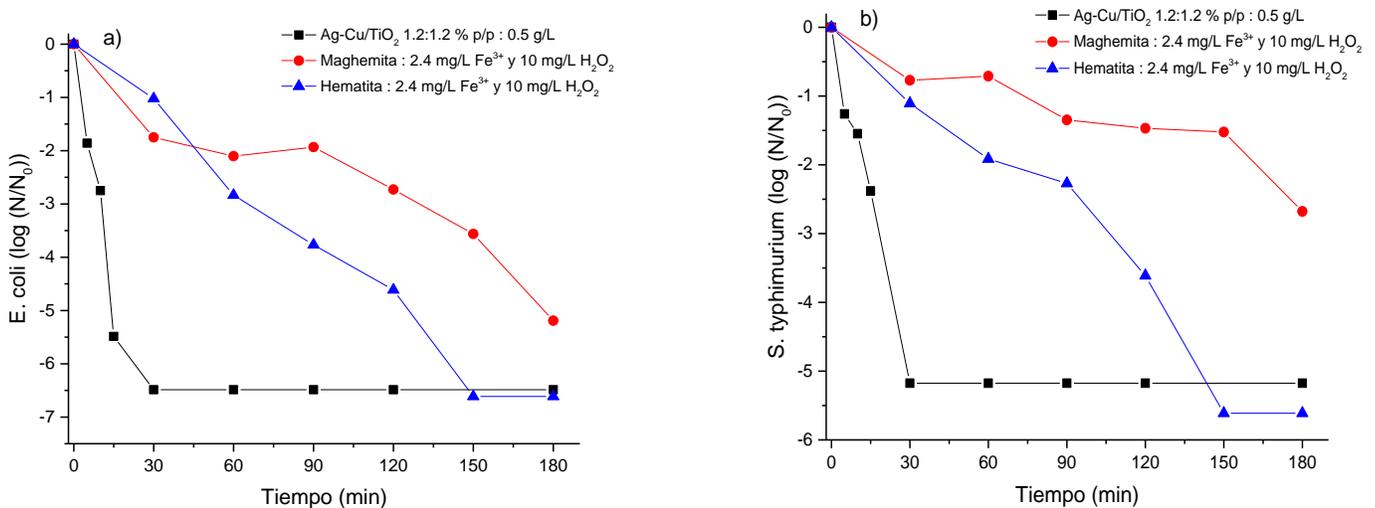


Figura 28. Inactivación de a) *E. coli* y b) *S. typhimurium* en un efluente secundario de una PTAR usando los procesos fotocatalisis heterogénea y foto-Fenton heterogéneo.

Adicionalmente, la Tabla 23 presenta las constantes cinéticas de la inactivación de ambas bacterias en el efluente real, las cuales fueron calculadas ajustando los datos

experimentales al modelo Chick-Watson descrito en la sección 6.3.1. Esta tabla también presenta a modo de comparación de las constantes cinéticas de los experimentos realizados bajo las mismas condiciones en agua destilada.

Tabla 23. Constantes cinéticas de inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* por fotocatalisis heterogénea y foto-Fenton solar heterogéneo en diferentes matrices.

Proceso	Matriz	<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>	
		k_{app} ($\times 10^{-2}$ min $^{-1}$)	R 2	k_{app} ($\times 10^{-2}$ min $^{-1}$)	R 2
F.H	E.S-PTAR	34.31	0.93	17.02	0.99
F.H	Agua destilada	67.52	0.94	61.97	0.87
F.F.H con maghemita	E.S-PTAR	2.62	0.97	1.31	0.97
F.F.H con maghemita	Agua destilada	5.48	0.92	7.81	0.85
F.F.H con hematita	E.S-PTAR	4.21	0.99	3.29	0.98
F.F.H con hematita	Agua destilada	5.22	0.98	5.35	0.96

Los resultados de la Tabla 23 muestran que ambos procesos tuvieron una disminución en la velocidad de inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* cuando se utilizó el efluente de la PTAR en lugar de agua destilada. La velocidad de inactivación de ambas bacterias utilizando el proceso de fotocatalisis heterogénea con el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m disminuyó 2.0 y 3.6 veces, para *E. coli* y *S. typhimurium*, respectivamente, cuando se utilizó el efluente secundario de una PTAR como matriz en comparación con los experimentos realizados en agua destilada. Del mismo modo la velocidad de inactivación de ambas bacterias con el proceso Foto-Fenton heterogéneo utilizando maghemita se vio disminuida 2.1 y 5.9 veces, para *E. coli* y *S. typhimurium*, respectivamente, cuando se utilizó el efluente real como matriz; sin embargo, al utilizar el proceso Foto-Fenton heterogéneo con hematita, la velocidad de inactivación solamente disminuyó entre 1.2 y 1.6 veces, siendo este el proceso menos afectado por el efecto de matriz. Adicionalmente, se observó que el óxido de hierro fase hematita obtuvo mejores resultados que la fase maghemita en la inactivación de los microorganismos en el efluente secundario, logrando una completa inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* en 150 min de tratamiento, estos resultados son acordes a los encontrados en la prueba de

recrecimiento bacteriano donde se obtuvo mejores resultados con el proceso foto-Fenton utilizando óxido de hierro fase hematita que usando la fase maghemita.

Adicionalmente, estos resultados señalan un claro efecto de la matriz sobre los procesos estudiados, esto es causado principalmente a que algunos compuestos presentes en el efluente secundario de la PTAR pueden actuar como secuestradores de especies reactivas de oxígeno, como lo son los iones presentes en el agua (bicarbonatos y cloruros) y también la materia orgánica que no logró ser removida por el tratamiento secundario de la PTAR¹¹⁰. Esta materia orgánica presente puede competir por las especies reactivas fotogeneradas y consumirlas, disminuyendo así la inactivación de las bacterias debido a que menos especies reactivas pueden interactuar con ellas ^{35,111}.

Por último, se concluyó que el proceso de fotocatalisis heterogénea con el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m logró una inactivación de *E. coli* y *S. typhimurium* más rápida y efectiva que el proceso foto-Fenton heterogéneo con maghemita y hematita, obteniendo velocidad de inactivación entre 5.2 a 13.1 veces más altas cuando se usó la F.H en comparación con el proceso F.F.H en ambas matrices estudiadas, este puede ser atribuido a la mayor cantidad de catalizador utilizado en la fotocatalisis heterogénea, lo que logra una mayor generación de especies reactivas, además del efecto bactericida que puede generar los metales presentes en el catalizador Ag-Cu/TiO₂.

6.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PROCESOS SOBRE LAS ESTRUCTURAS BACTERIANAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEM.

Las imágenes de SEM fueron usadas para demostrar el efecto de los tratamientos de inactivación en la morfología y estructura de las células bacterianas. En la Figura 29 se muestran las imágenes de SEM de las células de *E. coli* y *S. typhimurium* en mezcla en diferentes tiempos de tratamiento (inicial, intermedio y final) para cada uno de los procesos estudiados. Para este estudio se evaluó el proceso fotocatalisis heterogénea usando 0.5 g/L de Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m y el proceso foto-Fenton heterogéneo con 2.4mg/L de Fe³⁺ proveniente de óxido de hierro (III) fase hematita y 10 mg/L de peróxido de hidrógeno.

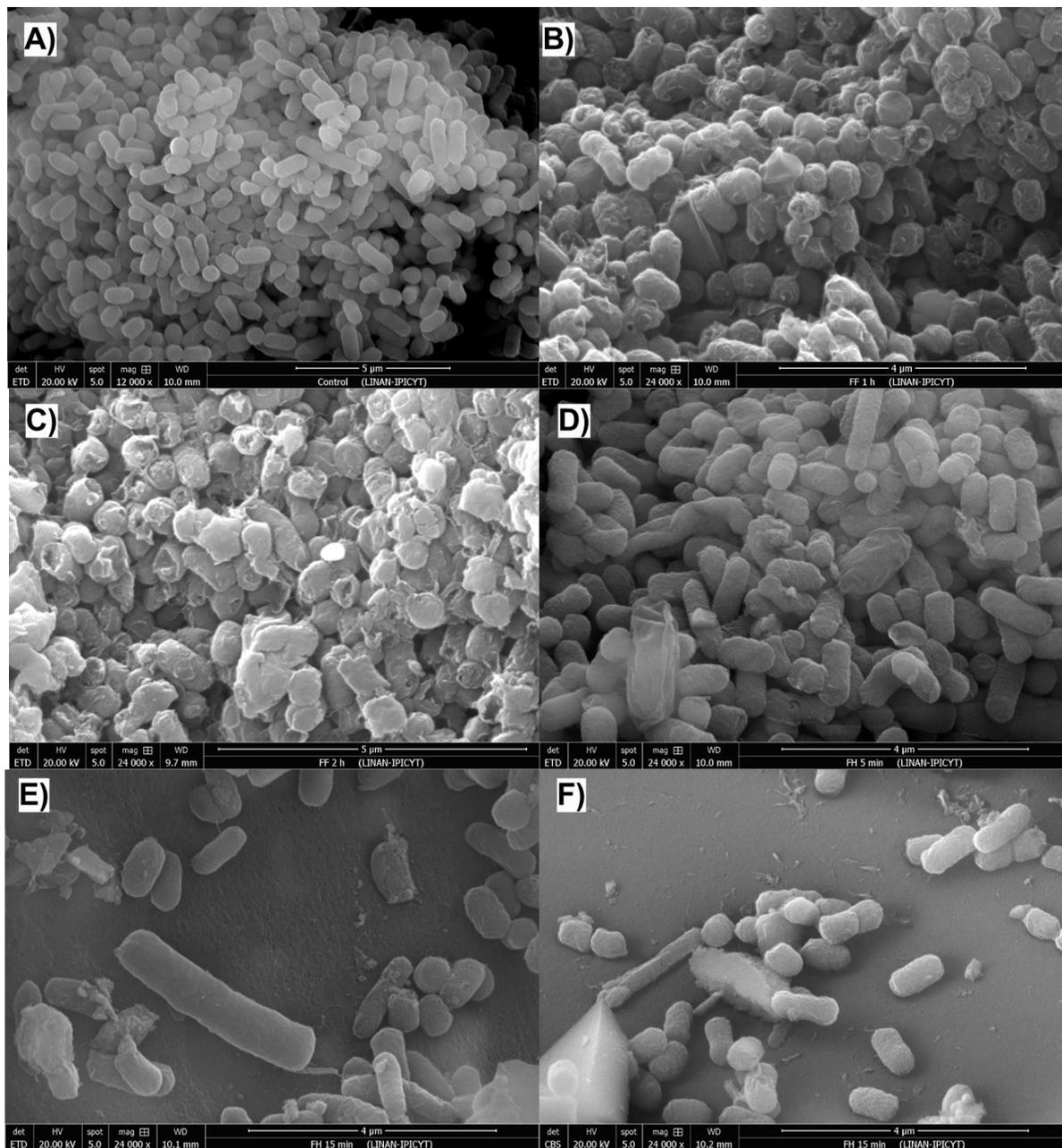


Figura 29. Imágenes de SEM de células de *E. coli* y *S. typhimurium* antes del tratamiento fotocatalítico a) control y después de ser inactivadas por foto-Fenton heterogéneo con hematita b) 1 h y c) 2h y por fotocatalisis heterogénea con el catalizador Ag-Cu/TiO₂ d) 5 min y e-f) 15 min.

El control (Fig. 29a) corresponde a la muestra antes de iniciar los tratamientos fotocatalíticos (0 min), en donde se observa una morfología típica de bacilos gram-negativos con células con morfologías regulares sin ningún daño aparente. La morfología de las células después de 1 h y 2 h de estar expuestas al tratamiento foto-Fenton

heterogéneo con hematita son mostradas en la Figura 29b y 29c, respectivamente, se observó un claro daño a la estructura celular en ambos casos, mostrando un daño a la pared y membrana celular, encontrando al final del tratamiento células no uniformes con una alta deformación morfológica y un encogimiento de las mismas. Del mismo modo, la Figura 29 (d-f) muestra las imágenes de SEM de las células bacterianas después de ser tratadas por fotocátalisis heterogénea con el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂. Se encontró que no se presenta un daño tan evidente a la pared celular como con el proceso foto-Fenton; sin embargo, se observó que sí existe un daño a la pared celular debido a que en algunos casos es evidente la pérdida de la morfología típica de las bacterias debido a una liberación del contenido citoplasmático de la célula y a la ruptura de estas, además, las células bacterianas mostraron encogimiento, fusión celular e invaginaciones en algunos casos, este comportamiento también ha sido reportado en algunas investigaciones para células bacterianas inactivadas por fotocátalisis heterogénea obteniendo daños celulares similares^{104,105,112}. No obstante, hasta nuestro conocimiento no han sido reportadas imágenes de SEM de células bacterianas tratadas por foto-Fenton heterogéneo, por lo cual no hay investigaciones con los cuales se puedan cotejar los resultados obtenidos en este trabajo.

7. CONCLUSIONES

- Con el método sol-gel se logró la incorporación de plata y cobre en los catalizadores de Ag-TiO₂, Cu-TiO₂, Ag-Cu/TiO₂; obteniendo materiales mesoporosos con fase cristalina anatasa en todos los casos.
- De acuerdo con los resultados de DRX, XPS y espectroscopia de reflectancia difusa UV-Vis de los catalizadores Ag-Cu/TiO₂ se determinó que los metales se incorporaron como Cu²⁺ y Ag⁰ en el TiO₂, generando un cambio en la absorción óptica del material hacia la región visible lo que permite la utilización de la luz solar y luz UV como fuente de activación.
- Los catalizadores Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m y Ag-Cu/TiO₂ 2.1:2.1% m/m mostraron la mayor actividad fotocatalítica y demostraron ser un tratamiento rápido para la desinfección de agua.
- El desempeño de los catalizadores co-dopados se comparó con el de los catalizadores Ag-TiO₂, Cu-TiO₂ y TiO₂, así como con el proceso SODIS, obteniendo mayor rapidez de inactivación de ambas bacterias mediante el uso de los materiales co-dopados.
- Los fotocatalizadores co-dopados manifestaron actividad antibacteriana en ausencia de luz para ambos microorganismos.
- El catalizador Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m presentó la mejor actividad en la inactivación de las bacterias, siendo eficaz aún después de cinco ciclos de uso, además, se demostró que elimina completamente las bacterias debido a que no existe recrecimiento de estas en los días posteriores al tratamiento.
- Con base en estudios de secuestradores de radicales se encontró que las especies que más participación tuvieron en la eliminación de *E. coli* y *S.*

typhimurium por fotocatalisis heterogénea fueron los huecos fotogenerados (h^+) y el H_2O_2 .

- El proceso foto-Fenton solar heterogéneo utilizando óxido de hierro fase maghemita y hematita y H_2O_2 a bajas concentraciones (2.4 mg/L de Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2) produce la inactivación de ambas bacterias en 120 min de tratamiento, sin embargo, se demostró que sólo la fase hematita elimina completamente las bacterias debido a que no existe recrecimiento de estas en los días posteriores al tratamiento.
- La inactivación fotocatalítica de *E. coli* y *S. typhimurium* por ambos procesos en el efluente secundario de una PTAR requirió más tiempo que en agua destilada, esto fue causado por el efecto de la matriz debido a las sustancias presentes en el efluente que actúan como secuestrantes de las especies reactivas. Sin embargo, el proceso de fotocatalisis con el catalizador Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m, siguió siendo efectivo logrando una completa remoción de los microorganismos en 30 min de tratamiento.
- La fotocatalisis heterogénea utilizando el catalizador co-dopado Ag-Cu/TiO₂ 1.2:1.2% m/m resultó ser un tratamiento más efectivo que el foto-Fenton heterogéneo en la eliminación de bacterias gram-negativas tanto en agua destilada como en matrices reales.
- A través de las imágenes de SEM de las células bacterianas se evidenció que los dos procesos fotocatalíticos heterogéneos generan un daño importante a la estructura celular, generando la pérdida de la morfología típica de las bacterias y dañando la integridad de las células.
- Con el catalizador Ag-Cu/TiO₂ preparado en este trabajo se podrían implementar tratamientos que sean rápidos y eficaces para la eliminación completa de bacterias en agua, surgiendo este material como un fotocatalizador que exhibe potencial

para futuras aplicaciones a mayor escala en la desinfección de aguas residuales utilizando la luz solar como recurso energético renovable.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dalin C, Qiu H, Hanasaki N, Mauzerall DL, Rodriguez-Iturbe I (2015) Balancing water resource conservation and food security in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:4588–4593
2. Organización Mundial de la Salud (2018) Agua: Datos y cifras. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>. Accessed 3 Sep 2018
3. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2011) Guías para la calidad del agua de consumo humano, Cuarta. World Health Organization, Ginebra
4. Lin YW, Li D, Gu AZ, Zeng S Yu, He M (2016) Bacterial regrowth in water reclamation and distribution systems revealed by viable bacterial detection assays. *Chemosphere* **144**:2165–2174
5. Ajonina C, Buzie C, Rubiandini RH, Otterpohl R (2015) Microbial pathogens in Wastewater Treatment Plants (WWTP) in Hamburg. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues* **78**:381–387
6. Costán-Longares A, Montemayor M, Payán A, Méndez J, Jofre J, Mujeriego R, Lucena F (2008) Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Research* **42**:4439–4448
7. WHO (2011) Guidelines for Drinking-water Quality. 518
8. Venieri D, Fraggadaki A, Kostadima M, Chatzisyneon E, Binas V, Zachopoulos A, Kiriakidis G, Mantzavinos D (2014) Solar light and metal-doped TiO₂ to eliminate water-transmitted bacterial pathogens: Photocatalyst characterization and disinfection performance. *Applied Catalysis B: Environmental* **154–155**:93–101
9. Rizzo L, Della Sala A, Fiorentino A, Li Puma G (2014) Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp-TiO₂ photocatalysis: Effect on a multi drug resistant *Escherichia coli* strain. *Water Research* **53**:145–152
10. Wéry N, Lhoutellier C, Ducray F, Delgenès JP, Godon JJ (2008) Behaviour of

- pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research* **42**:53–62
11. Ajonina C, Buzie C, Rubiandini RH, Otterpohl R (2015) Microbial pathogens in Wastewater Treatment Plants (WWTP) in Hamburg. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **78**:381–387
 12. Ajonina C, Buzie C, Otterpohl R (2013) The detection of giardia cysts in a large-scale wastewater treatment plant in Hamburg, Germany. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **76**:509–514
 13. Fernández-Ibáñez P, Polo-López MI, Malato S, Wadhwa S, Hamilton JWJ, Dunlop PSM, D'Sa R, Magee E, O'Shea K, Dionysiou DD, Byrne JA (2015) Solar photocatalytic disinfection of water using titanium dioxide graphene composites. *Chemical Engineering Journal* **261**:36–44
 14. Giannakis S, Liu S, Carratalà A, Rtimi S, Talebi Amiri M, Bensimon M, Pulgarin C (2017) Iron oxide-mediated semiconductor photocatalysis vs. heterogeneous photo-Fenton treatment of viruses in wastewater. Impact of the oxide particle size. *Journal of Hazardous Materials* **339**:223–231
 15. Giannakis S, Le TTM, Entenza JM, Pulgarin C (2018) Solar photo-Fenton disinfection of 11 antibiotic-resistant bacteria (ARB) and elimination of representative AR genes. Evidence that antibiotic resistance does not imply resistance to oxidative treatment. *Water Research* **143**:334–345
 16. Rincón AG, Pulgarin C (2005) Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO₂ photo-assisted treatment of mixed *E. coli* and *Bacillus* sp. and bacterial community present in wastewater. *Catalysis Today* **101**:331–344
 17. Hernández-Ramírez A, Medina-Ramírez I (2015) Photocatalytic Semiconductors, 1st ed. Springer, Suiza
 18. Byrne C, Subramanian G, Pillai SC (2017) Recent advances in photocatalysis for environmental applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **6**:3531–3555
 19. Laxma Reddy PV, Kavitha B, Kumar Reddy PA, Kim KH (2017) TiO₂-based

- photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. *Environmental Research* **154**:296–303
20. Xiao J, Xie Y, Cao H, Nawaz F, Zhang S, Wang Y (2016) Disparate roles of doped metal ions in promoting surface oxidation of TiO₂ photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **315**:59–66
 21. Yuranova T, Rincon AG, Pulgarin C, Laub D, Xantopoulos N, Mathieu HJ, Kiwi J (2006) Performance and characterization of Ag-cotton and Ag/TiO₂ loaded textiles during the abatement of *E. coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **181**:363–369
 22. Pham TD, Lee BK (2014) Cu doped TiO₂/GF for photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* in bioaerosols under visible light irradiation: Application and mechanism. *Applied Surface Science* **296**:15–23
 23. Sreeja S, Vidya Shetty K (2016) Microbial disinfection of water with endotoxin degradation by photocatalysis using Ag@TiO₂core shell nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research* **23**:18154–18164
 24. Liga M V., Bryant EL, Colvin VL, Li Q (2011) Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment. *Water Research* **45**:535–544
 25. Li Y, Ding H, Mao K, Wang D, Wang Q, Zhang W (2015) Bactericidal activity of Ag nanoparticles decorated TiO₂ microspheres and effects of water composition and extracellular polymeric substances. *Clean - Soil, Air, Water* **43**:512–520
 26. Tatlıdil İ, Sökmen M, Breen C, Clegg F, Buruk CK, Bacaksız E (2011) Degradation of *Candida albicans* on TiO₂ and Ag-TiO₂ thin films prepared by sol-gel and nanosuspensions. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **60**:23–32
 27. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) (2021) Secondary Drinking Water Standards: Guidance for Nuisance Chemicals. In: Pagina web U.S. Environ. Prot. Agency. <https://www.epa.gov/sdwa/secondary-drinking-water-standards-guidance-nuisance-chemicals>. Accessed 4 Aug 2021
 28. Bhardwaj S, Pal B (2018) Photodeposition of Ag and Cu binary co-catalyst onto

- TiO₂ for improved optical and photocatalytic degradation properties. *Advanced Powder Technology* **29**:2119–2128
29. Monga A, Rather RA, Pal B (2017) Enhanced co-catalytic effect of Cu-Ag bimetallic core-shell nanocomposites imparted to TiO₂ under visible light illumination. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **172**:285–292
 30. Rao G, Brastad KS, Zhang Q, Robinson R, He Z, Li Y (2016) Enhanced disinfection of *Escherichia coli* and bacteriophage MS2 in water using a copper and silver loaded titanium dioxide nanowire membrane. *Frontiers of Environmental Science and Engineering* **10**:
 31. Martínez-Montelongo JH, Medina-Ramírez IE, Romo-Lozano Y, Zapien JA (2020) Development of a sustainable photocatalytic process for air purification. *Chemosphere* **257**:
 32. Rojas Cervantes LM (2015) Diseño y síntesis de materiales “a medida” mediante el método sol-gel. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, España
 33. Schubert U, Hüsing N (2015) The Sol-Gel Handbook: Synthesis, Characterization and Applications, First Edit. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
 34. Diaz-Urbe CE, Vallejo L. W a., Miranda J (2014) Photo-Fenton oxidation of phenol with Fe(III)-tetra-4-carboxyphenylporphyrin/SiO₂ assisted with visible light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **294**:75–80
 35. Giannakis S, Liu S, Carratalà A, Rtimi S, Bensimon M, Pulgarin C (2017) Effect of Fe(II)/Fe(III) species, pH, irradiance and bacterial presence on viral inactivation in wastewater by the photo-Fenton process: Kinetic modeling and mechanistic interpretation. *Applied Catalysis B: Environmental* **204**:156–166
 36. Perini JA d. L, Silva BC e., Tonetti AL, Nogueira RFP (2017) Photo-Fenton degradation of the pharmaceuticals ciprofloxacin and fluoxetine after anaerobic pre-treatment of hospital effluent. *Environmental Science and Pollution Research* **24**:6233–6240
 37. Pupo Nogueira RF, Guimarães JR (2000) Photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol by ferrioxalate/H₂O₂ system. *Water Research* **34**:895–901

38. Santos PR dos, Daniel LA (2017) Occurrence and removal of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts from a municipal wastewater treatment plant in Brazil. *Environmental Technology (United Kingdom)* **38**:1245–1254
39. Kitajima M, Haramoto E, Iker BC, Gerba CP (2014) Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Science of the Total Environment* **484**:129–136
40. Liu B, Mu L, Zhang J, Han X, Shi H (2020) TiO₂/Cu₂(OH)₂CO₃ nanocomposite as efficient antimicrobials for inactivation of crop pathogens in agriculture. *Materials Science and Engineering C* **107**:
41. Lara-Rico R, Múzquiz-Ramos EM, López-Badillo CM, García-Pérez UM, Cruz-Ortiz BR (2019) Goethite-titania composite: Disinfection mechanism under UV and visible light. *RSC Advances* **9**:2792–2798
42. Khraisheh M, Wu L, Al-Muhtaseb AH, Al-Ghouti MA (2015) Photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* using TiO₂ P25 and Cu-doped TiO₂. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **28**:369–376
43. Xiao G, Zhang X, Zhang W, Zhang S, Su H, Tan T (2015) Visible-light-mediated synergistic photocatalytic antimicrobial effects and mechanism of Ag-nanoparticles@chitosan-TiO₂ organic-inorganic composites for water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental* **170–171**:255–262
44. Yadav HM, Otari S V., Koli VB, Mali SS, Hong CK, Pawar SH, Delekar SD (2014) Preparation and characterization of copper-doped anatase TiO₂ nanoparticles with visible light photocatalytic antibacterial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **280**:32–38
45. Fisher MB, Keane DA, Fernández-Ibáñez P, Colreavy J, Hinder SJ, McGuigan KG, Pillai SC (2013) Nitrogen and copper doped solar light active TiO₂ photocatalysts for water decontamination. *Applied Catalysis B: Environmental* **130–131**:8–13
46. Kubacka A, Muñoz-Batista MJ, Ferrer M, Fernández-García M (2013) UV and visible light optimization of anatase TiO₂ antimicrobial properties: Surface deposition of metal and oxide (Cu, Zn, Ag) species. *Applied Catalysis B:*

Environmental **140–141**:680–690

47. Liu L, Bai H, Liu J, Sun DD (2013) Multifunctional graphene oxide-TiO₂-Ag nanocomposites for high performance water disinfection and decontamination under solar irradiation. *Journal of Hazardous Materials* **261**:214–223
48. Amin SA, Pazouki M, Hosseinnia A (2009) Synthesis of TiO₂-Ag nanocomposite with sol-gel method and investigation of its antibacterial activity against *E. coli*. *Powder Technology* **196**:241–245
49. Baghriche O, Rtimi S, Pulgarin C, Sanjines R, Kiwi J (2013) Effect of the spectral properties of TiO₂, Cu, TiO₂/Cu sputtered films on the bacterial inactivation under low intensity actinic light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **251**:50–56
50. Karunakaran C, Ganapathy A, Paramasivan G, Govindasamy M, Viswanathan A (2011) Cu-TiO₂ nanoparticles for photocatalytic disinfection of bacteria under visible light. *Journal of the American Ceramic Society* **94**:2499–2505
51. Ubonchonlakate K, Sikong L, Saito F (2012) Photocatalytic disinfection of *P.aeruginosa* bacterial Ag-doped TiO₂ film. *Procedia Engineering* **32**:656–662
52. Jalali J, Mozammel M, Ojaghilkhchi M (2017) Photodegradation of organic dye using co-doped Ag/Cu TiO₂ nanoparticles: synthesis and characterization. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **28**:16776–16787
53. Angelov O, Stoyanova D, Ivanova I (2016) Antimicrobial effect of TiO₂ doped with Ag and Cu on *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Journal of Physics: Conference Series* **764**:
54. Stoyanova D, Ivanova I, Angelov O, Vladkova T (2017) Antibacterial activity of thin films TiO₂ doped with Ag and Cu on Gracilicutes and Firmicutes bacteria. *BioDiscovery* **20**:e21596
55. Ruales-Lonfat C, Barona JF, Sienkiewicz A, Bensimon M, Vélez-Colmenares J, Benítez N, Pulgarín C (2015) Iron oxides semiconductors are efficient for solar water disinfection: A comparison with photo-Fenton processes at neutral pH. *Applied Catalysis B: Environmental* **166–167**:497–508

56. Pecson BM, Decrey L, Kohn T (2012) Photoinactivation of virus on iron-oxide coated sand: Enhancing inactivation in sunlit waters. *Water Research* **46**:1763–1770
57. Ruales-Lonfat C, Benítez N, Sienkiewicz A, Pulgarín C (2014) Deleterious effect of homogeneous and heterogeneous near-neutral photo-Fenton system on *Escherichia coli*. Comparison with photo-catalytic action of TiO₂ during cell envelope disruption. *Applied Catalysis B: Environmental* **160–161**:286–297
58. Nieto-Juarez JI, Kohn T (2013) Virus removal and inactivation by iron (hydr)oxide-mediated Fenton-like processes under sunlight and in the dark. *Photochemical and Photobiological Sciences* **12**:1596–1605
59. APHA-AWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters, 21st ed. Washington, DC
60. Adán Delgado C (2008) Fotocatalizadores nanoestructurados de TiO₂ y Fe-TiO₂ para la degradación de compuestos. Rey Juan Carlos
61. Douglas A. Skoog FJH y SRC (2008) Principio Analisis Instrumental. Cengage Learning, México
62. Thommes M, Kaneko K, Neimark A V., Olivier JP, Rodriguez-Reinoso F, Rouquerol J, Sing KSW (2015) Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **87**:1051–1069
63. Workman J, Springsteen A (1998) Applied Spectroscopy, Cap 6. Academic Press, San Diego
64. Garcia R, Báez P (2012) Atomic Absorption Spectrometry (AAS). InTech
65. USEPA (1996) Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices, EPA Method 3052
66. Vernon-Parry KD (2000) Microscopy : an introduction. *III-Vs Review* **13**:40–44
67. Omid M, Fatehinya A, Farahani M, Akbari Z, Shahmoradi S, Yazdian F, Tahriri M, Moharamzadeh K, Tayebi L, Vashae D (2017) Characterization of biomaterials.

68. Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D (2007) Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications* 1–40
69. Miguel N, Lanao M, Valero P, Mosteo R, Ormad MP (2016) *Enterococcus* sp. Inactivation by Ozonation in Natural Water: Influence of H₂O₂ and TiO₂ and Inactivation Kinetics Modeling. *Ozone: Science and Engineering* **38**:443–451
70. Chong MN, Jin B, Chow CWK, Saint C (2010) Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Research* **44**:2997–3027
71. Malato S, Fernández-Ibáñez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W (2009) Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today* **147**:1–59
72. Papoutsakis S, Miralles-Cuevas S, Oller I, Garcia Sanchez JL, Pulgarin C, Malato S (2015) Microcontaminant degradation in municipal wastewater treatment plant secondary effluent by EDDS assisted photo-Fenton at near-neutral pH: An experimental design approach. *Catalysis Today* **252**:61–69
73. García-Fernández I, Fernández-Calderero I, Inmaculada Polo-López M, Fernández-Ibáñez P (2015) Disinfection of urban effluents using solar TiO₂ photocatalysis: A study of significance of dissolved oxygen, temperature, type of microorganism and water matrix. *Catalysis Today* **240**:30–38
74. Sousa MA, Gonçalves C, Vilar VJP, Boaventura RAR, Alpendurada MF (2012) Suspended TiO₂ -assisted photocatalytic degradation of emerging contaminants in a municipal WWTP effluent using a solar pilot plant with CPCs. *Chemical Engineering Journal* **198–199**:301–309
75. Urriaga AM, Pérez G, Ibáñez R, Ortiz I (2013) Removal of pharmaceuticals from a WWTP secondary effluent by ultrafiltration/reverse osmosis followed by electrochemical oxidation of the RO concentrate. *Desalination* **331**:26–34
76. Secretaria de Salud (1995) NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994,

Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. *Diario Oficial de la Federación* 1–7

77. Secretaria de Salud (2014) NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
78. Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA (2009) Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media, Second Edition
79. Becton D and C (2008) Ficha Técnica BBL SIM Medium, Ref: L007503. [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007503\(08\)\(0408\)_ES.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007503(08)(0408)_ES.pdf)
80. Bensouici F, Bououdina M, Dakhel AA, Tala-Ighil R, Tounane M, Iratni A, Souier T, Liu S, Cai W (2017) Optical, structural and photocatalysis properties of Cu-doped TiO₂ thin films. *Applied Surface Science* **395**:110–116
81. Bensouici F, Souier T, Dakhel AA, Iratni A, Tala-Ighil R, Bououdina M (2015) Synthesis, characterization and photocatalytic behavior of Ag doped TiO₂ thin film. *Superlattices and Microstructures* **85**:255–265
82. Holland TJ., Redfern SA. (1997) Unit cell refinement from powder diffraction data: the use of regression diagnostics. *Mineralogical Magazine* **61**:65–77
83. Kittel C (2005) Introduction to solid state physics. John Wiley & Sons. Inc., New York
84. Qi HP, Wang HL, Zhao DY, Jiang WF (2019) Preparation and photocatalytic activity of Ag-modified GO-TiO₂ mesocrystals under visible light irradiation. *Applied Surface Science* **480**:105–114
85. Spanier JE, Robinson RD, Zhang F, Chan SW, Herman IP (2001) Size-dependent properties of (formula presented) nanoparticles as studied by Raman scattering. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* **64**:1–8
86. Obregón S, Kubacka A, Fernández-García M, Colón G (2013) High-performance Er³⁺-TiO₂ system: Dual up-conversion and electronic role of the lanthanide. *Journal*

of Catalysis **299**:298–306

87. Duan Y, Zhang M, Wang L, Wang F, Yang L, Li X, Wang C (2017) Plasmonic Ag-TiO_{2-x} nanocomposites for the photocatalytic removal of NO under visible light with high selectivity: The role of oxygen vacancies. *Applied Catalysis B: Environmental* **204**:67–77
88. Li X, Wang J, Men Y, Bian Z (2016) TiO₂ mesocrystal with exposed (001) facets and CdS quantum dots as an active visible photocatalyst for selective oxidation reactions. *Applied Catalysis B: Environmental* **187**:115–121
89. Tobaldi DM, Seabra MP, Otero-Irurueta G, de Miguel YR, Ball RJ, Singh MK, Pullar RC, Labrincha JA (2015) Quantitative XRD characterisation and gas-phase photocatalytic activity testing for visible-light (indoor applications) of KRONOClean 7000®. *RSC Adv* **5**:102911–102918
90. Yan M, Chen F, Zhang J, Anpo M (2005) Preparation of Controllable Crystalline Titania and Study on the Photocatalytic Properties. *Journal of Physical Chemistry B* **109**:8673–8678
91. Byrne C, Fagan R, Hinder S, McCormack DE, Pillai SC (2016) New approach of modifying the anatase to rutile transition temperature in TiO₂ photocatalysts. *RSC Adv* **6**:95232–95238
92. Kusiak-Nejman E, Wanag A, Kowalczyk L, Tryba B, Kapica-Kozar J, Morawski AW (2015) The Photocatalytic Performance of Benzene- Modified TiO₂ Photocatalysts under UV-vis Light Irradiation. *Journal Of Advanced Oxidation Technologies* **18**:204–210
93. Sreethawong T, Laehsalee S, Chavadej S (2009) Use of Pt / N-doped mesoporous-assembled nanocrystalline TiO₂ for photocatalytic H₂ production under visible light irradiation. *Catalysis Communications* **10**:538–543
94. Stengl V, Grygar TM, Oplustil F, Nemeč T (2012) Ge⁴⁺ doped TiO₂ for stoichiometric degradation of warfare agents. *Journal of Hazardous Materials* **228**:62–67
95. Santos LM, Machado WA, França MD, Borges KA, Paniago RM, Patrocínio AOT, Machado AEH (2015) Structural characterization of Ag-doped TiO₂ with enhanced

- photocatalytic activity. *RSC Advances* **5**:103752–103759
96. Maldonado MI, López-Martín A, Colón G, Peral J, Martínez-Costa JI, Malato S (2018) Solar pilot plant scale hydrogen generation by irradiation of Cu/TiO₂ composites in presence of sacrificial electron donors. *Applied Catalysis B: Environmental* **229**:15–23
 97. Pecchi G, Reyes P, López T, Gómez R, Moreno A, Fierro JL., Martínez-Arias A (2003) Catalytic Combustion of Methane on Fe-TiO₂ Catalysts Prepared by Sol-Gel Method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **27**:205–214
 98. Durango-Giraldo G, Cardona A, Zapata JF, Santa JF, Buitrago-Sierra R (2019) Titanium dioxide modified with silver by two methods for bactericidal applications. *Heliyon* **5**:e01608
 99. Sung-Suh HM, Choi JR, Hah HJ, Koo SM, Bae YC (2004) Comparison of Ag deposition effects on the photocatalytic activity of nanoparticulate TiO₂ under visible and UV light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **163**:37–44
 100. Wahyuni ET, Roto R (2018) Silver Nanoparticle Incorporated Titanium Oxide for Bacterial Inactivation and Dye Degradation. In: Titanium Dioxide Material for a Sustainable Environment. pp 331–348
 101. Ganguly P, Byrne C, Breen A, Pillai SC (2018) Antimicrobial activity of photocatalysts: Fundamentals, mechanisms, kinetics and recent advances. *Applied Catalysis B: Environmental* **225**:51–75
 102. Watson H (1908) A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant. *Epidemiology and Infection* **8**:536–542
 103. Rincón AG, Pulgarin C (2003) Photocatalytical inactivation of *E. coli*: Effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Applied Catalysis B: Environmental* **44**:263–284
 104. Shahbaz HM, Yoo S, Seo B, Ghafoor K, Kim JU, Lee DU, Park J (2016) Combination of TiO₂-UV Photocatalysis and High Hydrostatic Pressure to Inactivate Bacterial Pathogens and Yeast in Commercial Apple Juice. *Food and Bioprocess*

Technology **9**:182–190

105. Kim S, Ghafoor K, Lee J, Feng M, Hong J, Lee DU, Park J (2013) Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis. *Water Research* **47**:4403–4411
106. Bastarrachea LJ, Denis-Rohr A, Goddard JM (2015) Antimicrobial Food Equipment Coatings: Applications and Challenges. *Annual Review of Food Science and Technology* **6**:97–118
107. Moreira NFF, Narciso-da-Rocha C, Polo-López MI, Pastrana-Martínez LM, Faria JL, Manaia CM, Fernández-Ibáñez P, Nunes OC, Silva AMT (2018) Solar treatment (H₂O₂, TiO₂-P25 and GO-TiO₂ photocatalysis, photo-Fenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. *Water Research* **135**:195–206
108. Giannakis S, López MIP, Spuhler D, Pérez JAS, Ibáñez PF, Pulgarin C (2016) Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction-Part 2: A review of the applications for drinking water and wastewater disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental* **198**:431–446
109. Sciacca F, Rengifo-Herrera JA, Wéthé J, Pulgarin C (2011) Solar disinfection of wild *Salmonella* sp. in natural water with a 18L CPC photoreactor: Detrimental effect of non-sterile storage of treated water. *Solar Energy* **85**:1399–1408
110. Giannakis S, Polo López MI, Spuhler D, Sánchez Pérez JA, Fernández Ibáñez P, Pulgarin C (2016) Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 1: A review of the mechanisms and the fundamental aspects of the process. *Applied Catalysis B: Environmental* **199**:199–223
111. Villegas- Guzman P, Giannakis S, Rtimi S, Grandjean D, Bensimon M, de Alencastro LF, Torres-Palma R, Pulgarin C (2017) A green solar photo-Fenton process for the elimination of bacteria and micropollutants in municipal wastewater treatment using mineral iron and natural organic acids. *Applied Catalysis B: Environmental* **219**:538–549
112. Jiang Z, Wang B, Li Y, Chan HS, Sun H, Wang T, Li H, Yuan S, Leung MKH, Lu A,

Wong PK (2019) Solar-light-driven rapid water disinfection by ultrathin magnesium titanate/carbon nitride hybrid photocatalyst: Band structure analysis and role of reactive oxygen species. *Applied Catalysis B: Environmental* **257**:1–9