

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental

Tesis

**Evaluación del tiempo de contacto y la concentración  
de nanopartículas de dióxido de titanio en la  
desinfección de las bacterias E. coli de las  
aguas residuales municipales tratadas**

Katherine Gloria Ingaruca Lazo

Para optar el Título Profesional de  
Ingeniera Ambiental

Huancayo, 2021

Repositorio Institucional Continental  
Tesis digital



Esta obra está bajo una Licencia "Creative Commons Atribución 4.0 Internacional" .

## **ASESOR**

Ing. Pablo César Espinoza Tumialán

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor Ms. Ing. Pablo César por brindarme todo su apoyo para la culminación de este trabajo de investigación, así como a todos los docentes que fueron mi soporte durante todos los años de estudio en mi prestigiosa alma máter.

Un infinito agradecimiento, por su colaboración y paciencia a los tesisistas del grupo de investigación del Centro de Investigación de Nanotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Centro del Perú, al Bach. Orlando Mandujano Galarza.

A mis padres, por su apoyo ilimitado e incondicional para culminar con el presente trabajo de investigación y por guiarme a la consecución de mis objetivos y metas.

Agradezco también a una persona muy especial, por cada palabra de aliento y sus buenos deseos, por su motivación para culminar la investigación de la mejor manera, a Luis Emerson Arzapalo Amaro.

## **DEDICATORIA**

A Dios.

A mis padres Ever y Gloria.

A mi compañero Luis, por todo su esfuerzo y dedicación diaria.

A mis hijas Kaitlyn y Naira.

A mis hermanos Jones y Vladimir.

A mis maestros y compañeros.

# ÍNDICE

<b>ASESOR</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>ÍNDICE</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	xiii
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
1.1. Planteamiento y formulación del problema .....	1
1.1.1. Planteamiento del problema .....	1
1.1.2. Formulación del problema .....	3
1.2. Objetivos .....	4
1.2.1. Objetivo general .....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Justificación e importancia.....	4
1.3.1. Justificación e importancia ambiental .....	4
1.3.2. Justificación e importancia socioeconómica .....	5
1.3.3. Justificación e importancia en Ciencia y Tecnología .....	5
1.4. Hipótesis y variables .....	5
1.4.1. Hipótesis general.....	5
1.4.2. Hipótesis específicas .....	6
1.4.3. Variables .....	6
<b>CAPÍTULO II</b> .....	7
2.1. Antecedentes de la investigación.....	7

2.1.1.	Antecedentes nacionales.....	7
2.1.2.	Antecedentes internacionales.....	8
2.2.	Bases teóricas.....	10
2.2.1.	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales (PTAR).....	10
2.2.2.	Caracterización de bacterias coliformes totales en aguas residuales.....	12
2.2.3.	Definiciones y clasificación de los nanomateriales.....	14
2.2.4.	Caracterización de las nanopartículas TiO <sub>2</sub> .....	16
2.2.5.	Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas sobre las bacterias.....	18
2.2.6.	Nanopartículas y poblaciones bacterianas.....	22
2.3.	Definición de términos.....	22
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>24</b>
3.1.	Método, tipo y nivel de la investigación.....	24
3.1.1.	Métodos de la investigación.....	24
3.1.2.	Tipo de la investigación.....	24
3.1.3.	Nivel de la investigación.....	25
3.2.	Diseño de la investigación.....	25
3.3.	Población y muestra.....	26
3.3.1.	Población.....	26
3.3.2.	Muestra.....	26
3.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	26
3.4.1.	Materiales, reactivos y equipos.....	26
3.5.	Técnicas de análisis y procesamiento de datos.....	28
<b>CAPÍTULO IV.....</b>		<b>36</b>
4.1.	Resultados del tratamiento y análisis de información.....	36
4.1.1.	Resultados de la cuantificación de las bacterias <i>E. coli</i> del efluente final de la PTAR de Sicaya.....	36
4.1.2.	Inoculación de las bacterias <i>E. coli</i> y las NTPs-TiO <sub>2</sub> y recuento de colonias en placa.....	38

4.1.3.	Resultados de la caracterización de nanopartículas .....	39
4.1.4.	Resultados del tiempo de contacto y las concentraciones de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> .....	46
4.2.	Discusión de resultados.....	47
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	<b>54</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	.....	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	.....	<b>56</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>60</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Inoculación de bacterias en placas Petri .....	13
Figura 02. Estructura de las NPs-TiO <sub>2</sub> .....	17
Figura 03. Toxicidad de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> .....	19
Figura 04. Autoclavado de los materiales para la preparación del agar MacConkey.....	31
Figura 05. Equipo DLS NICOMP PSS Z3000 utilizado para la determinación del tamaño de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> .....	34
Figura 06. Equipo de Microscopia Electrónica de Barrido utilizado para la caracterización de la morfología y composición de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> .....	35
Figura 07. Pesado del agar MacConkey para para la preparación del medio de cultivo ..	37
Figura 08. Muestras de inoculación forradas con papel kraft y atadas con pabilo .....	37
Figura 09. Recuento de las colonias de <i>E. coli</i> del efluente final de las aguas residuales de la PTAR - Alcas - Sicaya.....	38
Figura 10. Conteo de colonias de bacterias <i>E. coli</i> y NPs-TiO <sub>2</sub> (tras el experimento).....	39
Figura 11. Histograma de Intensidad de la distribución de las NPs-TiO <sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS.....	39
Figura 12. Histograma de números de distribución de las NPs-TiO <sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS.....	40
Figura 13. Histograma de Volumen de las NPs-TiO <sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS.....	40
Figura 14. Histograma de números de distribución de las NPs-TiO <sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS (2).....	41
Figura 15. Geometría y tamaño de las NPs-TiO <sub>2</sub> en el equipo SEM.....	42
Figura 16. Conglomerado de las NPs-TiO <sub>2</sub> en el equipo SEM.....	43
Figura 17. Imágenes del detector EDS con diferentes espectros en la determinación de la composición NPs-TiO <sub>2</sub> del equipo SEM.....	44
Figura 18. Composición de las NPs-TiO <sub>2</sub> en el primer espectro del equipo SEM con el detector EDS.....	45
Figura 19. Composición de las NPs-TiO <sub>2</sub> en el segundo espectro del equipo SEM con el detector EDS.....	45
Figura 20. Reporte de la composición de las NPs-TiO <sub>2</sub> del equipo SEM con el detector EDS.....	46
Figura 21. Inhibición de las bacterias <i>E. coli</i> a concentración de 10 ppm de NPs-TiO <sub>2</sub> .....	49
Figura 22. Inhibición de las bacterias <i>E. coli</i> con concentraciones de 10, 40, 70 y 100 ppm de NPs-TiO <sub>2</sub> para 720 minutos.....	50

Figura 23. Inhibición de las bacterias <i>E. coli</i> a concentración de 40 ppm de NPs-TiO <sub>2</sub> .....	51
Figura 24. Inhibición de las bacterias <i>E. coli</i> a concentraciones de 10, 40, 70 y 100 ppm de NPs-TiO <sub>2</sub> para 180 minutos .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Norma para la calidad del agua residual municipal tratada.....	7
Tabla 02. Cepas de <i>E. coli</i> .....	14
Tabla 03. Comparación de las propiedades físicas y termodinámicas de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> .....	18
Tabla 04. Efectos tóxicos de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> en bacterias <i>E. coli</i> .....	19
Tabla 05. Diseño experimental factorial.....	25
Tabla 06. Resultados del conteo de las bacterias <i>E. coli</i> en placas Petri.....	36
Tabla 07. Resumen de datos de las mediciones del diámetro hidrodinámico de las NPs-TiO <sub>2</sub> .....	40
Tabla 08. Tiempo de contacto y concentraciones las NPs-TiO <sub>2</sub> con las bacterias <i>E. coli</i> .....	46

## RESUMEN

La contaminación por coliformes totales presentes en las descargas de las aguas residuales tratadas de las plantas de tratamiento de aguas residuales genera daños a la salud y al ambiente por lo que es necesario mejorar el tratamiento final de estas aguas residuales con nuevas tecnologías. En el presente trabajo de investigación se realizó la evaluación del tiempo de contacto de las bacterias *E. coli* y la concentración de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en la desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas. Los experimentos de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y las bacterias *E. coli*, consideradas como las representativas de los coliformes totales que se encuentra en los efluentes finales de una planta de tratamiento de aguas residuales, se realizaron por la metodología del recuento en placas con diluciones del medio de cultivo agar MacConkey y las bacterias *E. coli* derivadas de ATCC® 25922™ conjuntamente con las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . El tamaño de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se determinó por la técnica del diámetro hidrodinámico mediante la Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y la morfología, como su composición, se realizó por medio de la técnica de imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Como conclusión de la investigación se determinó que para un tiempo de contacto de 180 minutos entre las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y las bacterias *E. coli* ocurre una rápida desinfección de los coliformes totales. Por otra parte, se concluye que para un tamaño de 11.03 nm de diámetro de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y una concentración de 10 ppm de las nanopartículas se produce una inhibición alta de las bacterias *E. coli*, demostrando que la aplicación de la nanotecnología alcanza a desinfectar al agua tratada respecto de los coliformes totales, reflejando que estas aguas tratadas pueden ser empleadas en un segundo momento en fines agrícolas.

**Palabras clave:** nanopartículas, anatasa, sonicación, inoculación.

## ABSTRACT

Contamination by total coliforms present in the discharges of treated wastewater from wastewater treatment plants generates damage to health and the environment, which is why it is necessary to improve the final treatment of these wastewater with new technologies. In the present research work, the evaluation of the contact time of *E. coli* bacteria and the concentration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the disinfection of bacteria from treated municipal wastewater was carried out. The experiments on the TiO<sub>2</sub> nanoparticles and the *E. coli* bacteria, considered as representative of the total coliforms found in the final effluents of a wastewater treatment plant, were carried out by the methodology of the plate count with dilutions of the medium MacConkey agar culture and the ATCC® 25922™ derived *E. coli* bacteria together with TiO<sub>2</sub> nanoparticles. The size of the TiO<sub>2</sub> nanoparticles was determined by the hydrodynamic diameter technique using Dynamic Light Scattering (DLS) the morphology, such as its composition, was carried out by means of the Scanning Electron Microscopy (SEM) imaging technique. As a conclusion of the research, it was determined that for a contact time of 180 minutes between the TiO<sub>2</sub> nanoparticles and the *E. coli* bacteria, a rapid disinfection of the total coliforms occurs. On the other hand, it is concluded that for a size of 11.03 nm in diameter of the TiO<sub>2</sub> nanoparticles and a concentration of 10 ppm of the nanoparticles there is a high inhibition of *E. coli* bacteria, showing that the application of nanotechnology reaches a disinfect treated water with respect to total coliforms, reflecting that these treated water can be used in a second moment for agricultural purposes.

**Keywords:** nanoparticles, anatase, sonication, inoculation.

# INTRODUCCIÓN

La contaminación de los recursos hídricos provocado por las descargas de bacterias patógenas desde los efluentes finales de las plantas de tratamiento de las aguas residuales municipales ocasiona daños irreversibles al ecosistema de los cuerpos receptores y generan mayor propagación de las enfermedades. Existen tratamientos biológicos convencionales para la depuración de los coliformes totales con tecnología de cloración; sin embargo, sigue existiendo problemas de contaminación que aún falta resolverse, entre los métodos de desinfección más empleados se encuentra la cloración, ozonificación, luz ultravioleta, la nanotecnología entre otros. El desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento terciario para las aguas residuales municipales es de interés para la disminución o desinfección de las bacterias *E. coli*.

Entre los avances tecnológicos para el tratamiento de las aguas residuales se encuentra la nanotecnología que proponen alternativas para disminuir la contaminación por patógenos con nanomateriales que inhiben el crecimiento y en algunos casos tienen propiedades antibacterianas que actúan dentro del área superficial que generan las nanopartículas. La efectividad de las inhibiciones de las bacterias *E. coli* están en su mayoría afectadas por el tamaño, tiempo y concentración de las nanopartículas (1).

La presente investigación tiene como objetivo principal evaluar el tiempo de contacto de las bacterias *E. coli* y la concentración de nanopartículas de  $TiO_2$  en la desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas; el desarrollo se complementa en tres capítulos subsiguiente: en el capítulo II se analiza la información bibliográfica de los antecedentes y los trabajos desarrollados sobre el tema de investigación; el capítulo III comprende el desarrollo experimental que incluye los materiales, equipos y los procedimientos, mientras que en el último capítulo se presenta el tratamiento de datos, los resultados y su discusión respectiva. Finalmente se presentan las conclusiones, recomendaciones y anexos de la investigación.

La autora.

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

### 1.1. Planteamiento y formulación del problema

#### 1.1.1. Planteamiento del problema

La operación de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) por parte de las EPS en el Perú según GTZ/PROAGUA, evidencia muchas dificultades en disminuir la carga de coliformes totales generando contaminación de las aguas superficiales. Al no operar adecuadamente una PTAR, no se llega a cumplir con lo vertido en el D.S. N° 004-2017-MINAM: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para agua, que exige un máximo de 1 000 NMP/100ml de coliformes termotolerantes para el uso de las aguas tratadas con fines agrícolas, o más aún si requiere de cumplir con 2 000 NMP/100ml para descargas en los cuerpos receptores.

Por otra parte, en el año 2010 se realizó un diagnóstico de las PTAR municipales de las nueve capitales de las provincias de la región Junín y como resultado se tuvo que dos capitales de provincias tienen sus plantas de tratamiento implementados con lagunas de oxidación (Chupaca y Junín), mientras que en cuatro capitales de provincias (Concepción, Jauja, Chupaca y Yauli) mantienen en ejecución de proyectos con plantas de tratamiento aerobia, finalmente se tienen a las cuatro capitales de provincias restantes (Satipo, Huancayo, Tarma y Chanchamayo) en elaboración de proyectos; por lo tanto, se siguen implementando sistemas

de tratamiento de aguas residuales municipales con tecnologías aerobias, cuando ya se aplican tecnologías innovadoras del tratamiento de aguas residuales municipales utilizando Reactores Anaerobios de Flujo Ascendente (RAFA) que son eficaces para la remoción de materia orgánica.

En la actualidad el proceso de disminución de la carga de los coliformes totales se realiza mediante el tratamiento avanzado y/o tratamiento terciario con la adición de cloro gaseoso, pero este reactivo químico no cumple con disminuir la presencia de coliformes totales, debido a que se opera con un tiempo de contacto de las nanopartículas muy corto de 30 minutos, o por la poca adición del cloro que tiene un costo elevado en una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. El utilizar cloro, que es una tecnología convencional, hasta ahora no ha resuelto el problema de la presencia de bacterias en los efluentes de las PTAR ni en el tratamiento de agua con fines de potabilización.

El problema de las afecciones salubres generadas por los microorganismos patógenos y fecales presente en las aguas residuales municipales, representadas por la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), impactan a la salud de las poblaciones, principalmente donde el estado no interviene por intermedio del Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS) al no implementar nuevas tecnologías en el tratamiento de las aguas residuales municipales. La presencia de las bacterias *E. coli* generan enfermedades como: fiebre tifoidea, meningoencefalitis, amebiasis, cólera, gastroenteritis, entre otras, siendo las causas de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños de la región Junín.

El rápido desarrollo de la nanotecnología ambiental esta cautivado las nuevas investigaciones en las últimas décadas. La utilización de nanomateriales ha avanzado rápida y actualmente se vuelven más efectivas que las tecnologías convencionales, es así como en la actualidad se utilizan las nanopartículas de  $TiO_2$  en el tratamiento de las aguas residuales con fines de disminuir la contaminación por coliformes totales.

Los efluentes finales de las PTAR generan problemas tanto a la flora y fauna de los riachuelos y por ello estas aguas residuales tratadas son difícilmente reutilizables. Aún, cuando las PTAR trabajen bien, estos efluentes siempre



traen consigo los patógenos no removidos en el tratamiento secundario, pues solo disminuyen las cargas orgánicas y nitrogenadas (ver Anexo 03).

La calidad del agua residual tratada debe cumplir con los Límites Máximos Permisibles (LMP) para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales según el D.S. N° 003-2010-MINAM del Ministerio del Ambiente dado el 16 de marzo del 2010. Los LMP representan la medida de la concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, que caracterizan a una emisión, que al ser excedida causa o puede causar daños a la salud, al bienestar humano y al ambiente.

Bajo este contexto es necesario investigar y generar nuevas tecnologías con el uso de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  como antibacterial en el tratamiento de las aguas residuales municipales y cuyas aguas tratadas tengan la finalidad de reutilizarse en fines agrícolas, de modo que se para garantice la sostenibilidad y seguridad alimenticia de las poblaciones. Resolver este problema evidenciaría una gran variedad de modificaciones del uso del agua en el desarrollo futuro y que ofrecería grandes oportunidades seguras para el uso y reuso de las fuentes de agua no convencional.

#### 1.1.2. Formulación del problema

##### a) Problema general:

¿A qué períodos de contacto entre las bacterias *E. coli* y las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se producirá una desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas?

##### b) Problemas específicos:

- ¿Cuál es la cantidad de las bacterias *E. coli* presentes en el efluente final de un agua residual municipal tratada?

- ¿Cuál es el menor tiempo de contacto entre las bacterias *E. coli* y las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  para una mayor desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas?
- ¿A qué concentración de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se producirá una alta eficiencia de la desinfección de las bacterias *E. coli* de las aguas residuales municipales tratadas?

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

Evaluar el tiempo de contacto de las bacterias *E. coli* y la concentración de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en la desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Cuantificar las bacterias *E. coli* que se encuentran en el efluente final de un agua residual municipal tratada.
- Evaluar la mayor desinfección de las bacterias *E. coli* con el menor tiempo de contacto de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en la desinfección de las aguas residuales municipales tratadas.
- Hallar la concentración en que las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  produzcan una alta eficiencia de la desinfección de las bacterias *E. coli* de las aguas residuales municipales tratadas.

## 1.3. Justificación e importancia

### 1.3.1. Justificación e importancia ambiental

El presente proyecto de investigación busca generar el uso de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  como antibacterial para disminuir la contaminación

de bacterias *E. coli* consideradas como el de mayor población dentro de los coliformes totales presente en las aguas residuales tratadas. Esta disminución de la contaminación ambiental de bacterias mejorará la calidad de agua residual tratada para ser utilizada en la agricultura.

#### 1.3.2. Justificación e importancia socioeconómica

La utilización de pequeñas cantidades de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  posibilitan un menor costo de operación en comparación con los costos de gas cloro que se utiliza en el tratamiento terciario de aguas residuales municipales. El uso de nanopartículas, también mejorará la gestión social y económica de las instituciones dedicadas al saneamiento básico como son: EPS, JASS, municipalidades provinciales y distritales, centros poblados y comunidades campesinas por tener las mejores ventajas económicas.

#### 1.3.3. Justificación e importancia en Ciencia y Tecnología

La propiedad antibacterial de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  frente a los coliformes tiene importancia porque genera un área superficial bastante grande con lo cual se reduce el crecimiento de los microorganismos por el efecto inhibitorio de las nanopartículas. Al generar esta nueva tecnología se busca sustituir el uso del cloro en el sistema de tratamiento terciario de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.

### 1.4. Hipótesis y variables

#### 1.4.1. Hipótesis general

$H_1$ : Para un determinado tiempo de contacto y una determinada concentración de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se producirá una desinfección completa de las bacterias *E. coli* de las aguas residuales municipales tratadas.

#### 1.4.2. Hipótesis específicas

- Para un determinado tiempo de contacto entre las bacterias *E. coli* y las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> ocurrirá una mayor o menor desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas.
- Para una determinada concentración de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> ocurrirá una baja o alta eficiencia de desinfección de las bacterias *E. coli* de las aguas residuales municipales tratadas.

#### 1.4.3. Variables

- Variable dependiente:
  - Desinfección de las bacterias *E. coli*.
- Variables independientes:
  - Tiempo de contacto de las nanopartículas:
    - 60 min.
    - 120 min.
    - 180 min.
    - 720 min.
  - Concentración de nanopartículas:
    - 10 ppm.
    - 40 ppm.
    - 70 ppm.
    - 100 ppm.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

##### 2.1.1. Antecedentes nacionales

La exigencia ambiental por ahora permite a las plantas de tratamiento de las aguas residuales municipales cumplir con la normatividad; pero, cuando las exigencias sean mayores se tendrán dificultades con la operación y la calidad de las aguas residuales tratadas y será difícil su reutilización. Por ahora los límites máximos permitidos para la descarga coliformes termotolerantes es de 10 000 NMP/100ml, según el D.S. 003-2010-MINAM.

Tabla 01. *Norma para la calidad del agua residual municipal tratada.*

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA LOS EFLUENTES DE PTAR		
PARÁMETROS	UNIDAD	LMP DE EFLUENTES PARA VERTIDOS A CUERPOS DE AGUAS
Aceites y grasas	mg/l	20
Coliformes termotolerantes	NMP/100ml	10 000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/l	100
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	200
pH	unidad	6.5 – 8.5

Solidos Totales en Suspensión	mg/l	150
Temperatura	°C	< 35

Fuente: D.S. 003-2010-MINAM, Ministerio del Ambiente (2).

La inactivación y el crecimiento de diferentes bacterias con diferentes nanopartículas se vienen investigando con fines de mejorar su depuración de las aguas residuales municipales. Es así que en el trabajo de Barzola (3) se analizó el método de la inactivación de las bacterias *E. coli* con nanopartículas de SiO<sub>2</sub> para concentraciones de 20, 120 y 240 mg/l y un período de contacto de 2 a 6 horas durante el tratamiento de las aguas residuales municipales en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

En nuestra región existen muchas plantas de tratamiento de aguas residuales instaladas con tecnología de lagunas facultativas y lagunas de oxidación. En la mayoría de estas plantas no se instalaron tratamiento terciario para la descontaminación de los coliformes totales y en otras se lograron instalar con dosificación de cloro y que por problemas de los costos de operación están paralizados (ver Anexo 03).

#### 2.1.2. Antecedentes internacionales

Los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales deben ser implementados adecuadamente para favorecer la acción de los nanomateriales y/o nanocompuestos (4, 5). Por un lado, se lograría la disminución de la contaminación de los coliformes totales y no obstante estas aguas tratadas contengan compuestos orgánicos e inorgánicos tendrán gran ventaja de reutilización.

Los contaminantes en las aguas residuales están constituidos de materias orgánicas, bacterias y microorganismos en diferentes cantidades que deterioran la calidad de los cuerpos receptores y consecuentemente los suelos y las aguas subterráneas. Las aguas residuales que ingresan a una planta de tratamiento de aguas residuales tienen variadas composiciones; las de mayor peligrosidad son los microorganismos coliformes con  $1 \times 10^5$  a

$1 \times 10^9$  UFC/ml constituidos por estreptococos, fecales, protozoos y partículas de virus (6).

Para la desinfección de las aguas residuales municipales tratadas se utilizan nanopartículas metálicas por su efecto bactericida. En estos últimos años se vienen realizando investigaciones en el campo de la nanotecnología, que tienen propiedades íntimamente ligadas a su tamaño y morfología. El área de desarrollo es porque las nanopartículas se caracterizan por ser altamente reactivas y tienen una gran área superficial por su tamaño y forma de estos nanomateriales. Los beneficios de la aplicación de las nanopartículas favorecen las soluciones de los problemas ambientales como contaminación, tratamiento de las agua para consumo humano y para el tratamiento de las aguas residuales municipales de gran auge en la actualidad (7).

Los fenómenos del cambio climático están afectando las reservas de las cantidades de agua que se tiene disponible en la actualidad. Una de las alternativas es la reutilización planificada de las aguas residuales tratadas por la escasez de recursos hídricos de otras fuentes, especialmente en el país y en nuestra región. La constante demanda de agua para consumo humano se viene produciendo con frecuencia en los lugares con escasa disponibilidad hídrica. Estos antecedentes motivan a recurrir tecnologías disponibles para tratar los efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales (PTAR) como una fuente alternativa de recursos hídricos. La instalación de procesos biológicos combinados con la reactividad química de las nanopartículas se pueden generar aguas de buena calidad que serían utilizadas para riego agrícola y otros usos (1).

Los costos de operación en una planta de tratamiento de aguas residuales municipales se incrementan cuando el tratamiento terciario se realiza mediante la utilización de cloro. Es así, que la reutilización de los efluentes de las PTAR cuando se trata con cloro tendrían un costo elevado, por consiguiente, se debe buscar alternativas tecnológicas que disminuyen los costos de producción y cuyos precios favorezcan a los usuarios agrícolas y de otros usos, y que contribuyan con la protección ambiental y la recuperación del 80 % de agua residual (8).

## 2.2. Bases teóricas

### 2.2.1. Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales (PTAR)

- Tratamiento final de las aguas residuales municipales tratadas:

El tratamiento de las aguas residuales municipales tiene diferentes etapas de tratamiento de acuerdo a la composición de sus contaminantes. Estas pueden ser desde tratamiento preliminar, primario, secundario y terciario o llamado tratamiento final. Cada uno de estos procesos disminuyen los contaminantes; sin embargo, en algunos casos estos contaminantes llegan hasta al tratamiento final y también salen en los efluentes. También se conoce que a varias plantas de tratamiento de aguas residuales municipales ingresan nanopartículas; pero que en todos los procesos de depuración no interactúan con las cargas orgánicas para formar matrices orgánicas, sino que se separan como iones metálicos solubles y que luego salen en los efluentes finales (8).

En el tratamiento final normalmente se utiliza cloro como desinfectante para disminuir la carga contaminante de los coliformes totales; sin embargo, estos coliformes no son eliminados completamente de los efluentes finales a causa de que los compuestos clorado como el  $\text{ClO}_2$  no eliminan las bacterias presentes en el agua (9), lo que hace es únicamente inducir a las bacterias a pasar al estado llamado Viable No Cultivable (VBNC) y a causa de ello no se desarrollan en algunos medios de cultivo; pero, pueden activarse nuevamente al encontrar nuevos medios de cultivos pues siguen estando vivos. Las bacterias *E. coli*, como representante de las gramnegativas o de los coliformes totales mantienen su integridad celular y por su actividad celular tienen la capacidad de ser cultivables nuevamente. Por las consideraciones anteriores, la acumulación de los cloratos se mantiene en el agua residual tratada y otras están en los tejidos de las bacterias y se transmiten a los cultivos agrícolas al regar con estas aguas semitratadas. Por otra parte, al utilizar el gas cloro en el tratamiento



terciario se logra asegurar la letalidad de las bacterias; pero, por su alto costo resulta de poca aplicabilidad en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales por la no disponibilidad de recursos económicos. Además, se corre el riesgo por su manipulación y requiere de procedimientos y otros recursos para la correcta aplicación y que solo alcanza a las plantas de tratamiento de gran escala y con recursos disponibles.

- Nanotecnología en el tratamiento de aguas residuales municipales:

En la investigación de Cervantes *et. al.* (10) utilizaron nanopartículas de ZnO y TiO<sub>2</sub>, para el tratamiento de las aguas residuales municipales. La adición de nanopartículas fue al reactor biológico de lodos activados, y analizaron la variación de la concentración de 450, 900, 1 500 y 2 000 mg/l de nanopartículas de ZnO y de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> con 500, 1 000, 1 500 y 2 000 mg/l. Los resultados indican que la eficiencia de remoción de materia orgánica disminuye con la adición de nanopartículas de ZnO, en cambio, con la adición de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> decrece la eficiencia de remoción de nitrógeno. No obstante, se confirma que los agregados de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> afectan a las membranas celulares a través de la ruptura de la membrana celular y en consecuencia provoca la lisis celular. Por estos antecedentes resulta bastante atractivo la utilización de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en el tratamiento de aguas residuales municipales.

Con respecto a la toxicidad de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en las bacterias está comprobado según diferentes investigaciones, y además indican que favorecen la remoción de la materia orgánica. Esto significa que la presencia de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en el tratamiento de las aguas residuales no afecta otras características, pues según los estudios de Westerhoff *et. al.* (11) indican que a las plantas de tratamiento de aguas residuales que ingresaron nanopartículas de TiO<sub>2</sub> con tamaños menores a 100 nm y no pudieron separarse en la etapa de sedimentación, porque forman agregados de

titanio por la absorción de la biomasa generando la poca sedimentación. Ellos también indican que en el efluente de las aguas residuales tratadas encontraron partículas de  $\text{TiO}_2$  de tamaños que varían de 4 a 30 nm de diámetro.

- Nanopartículas en suspensión y aguas residuales:

En el tratamiento de aguas residuales municipales se encuentran presentes varios tipos de óxidos metálicos que proviene de diferentes fuentes y principalmente de las descargas pluviales. En el tratamiento biológico de aguas residuales por lodos activados las nanopartículas actúan en suspensión las cuales inhiben el crecimiento bacteriano de la población nitrificante provocando la disminución de las bacterias *nitrosomonas* y *Nitrobacter* (12). Esta toxicidad de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  vienen estudiándose con las bacterias coliformes cuya población microbiana es altamente perjudicial en las aguas residuales tratadas.

Los estudios de la toxicidad de las nanopartículas en suspensión vienen siendo de interés para los investigadores. Por ejemplo, en el trabajo de Yang *et. al.* (4) se estudió un sustrato sintético con características de aguas residuales municipales el efecto del tiempo de contacto entre las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y las bacterias nitrificantes en plantas de tratamiento biológico por humedales. Las características de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  fueron de un tamaño promedio de 20 a 1 nm de diámetro, y con una pureza de 99.5 %, los resultados indican que para una concentración de 1 mg/l de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  ocurre significativamente la funcionalidad de los microorganismos presentes en las aguas residuales.

#### 2.2.2. Caracterización de bacterias coliformes totales en aguas residuales

En las aguas residuales municipales existe una comunidad bacteriana de los cuales la mayor representatividad son del grupo de bacterias coliformes totales. Este grupo perteneciente a las gramnegativas, son también

consideradas como bacterias anaerobias facultativas, lo que quiere decir que pueden desarrollarse tanto en presencia o ausencia de oxígeno.

Las bacterias *E. coli* se caracteriza por poseer bacilos de gramnegativo y su cubierta tiene tres elementos; la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura le otorga a la bacteria su forma y rigidez, la cual le permite resistir a presiones osmóticas relativamente altas. Su crecimiento normalmente se efectúa a la temperatura de entre 35 a 43°C. A temperaturas inferiores a 7°C se puede inhibir su crecimiento favoreciendo su inocuidad. Del mismo a temperaturas superiores a 70°C son muy sensibles y se asegura una buena pasteurización de los alimentos que garantiza su eliminación. El otro parámetro importante es el pH que a 7.2 favorece su crecimiento y desarrollo, y a pH extremos menores a 3.8 y mayores a 9.5 se evita la proliferación de estas bacterias.

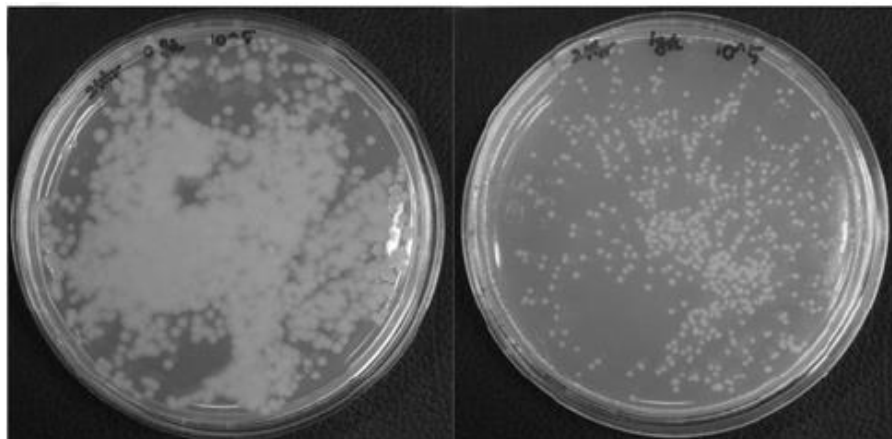


Figura 01. Inoculación de bacterias en placas Petri.

Fuente: Lee *et. al.* (13).

Las bacterias *E. coli* tienen múltiples características y facetas. Algunas de estas características son pocas estudiadas porque fácilmente se adaptan, mutan y constantemente adquieren nuevos genotipos a partir de los plásmidos, bacteriófagos, y otros elementos que llegan a transmitirse a su material genético. Es por ello, que tiene una capacidad de ubicuidad favoreciendo la aparición reiterada de cepas con nuevas propiedades, incluyendo capacidades patógenas no fácilmente reconocibles.

- Patogenicidad de bacterias *E. coli*:

Las bacterias *E. coli* son conocidas como agentes responsables de la gastroenteritis infantil (14), especialmente en países en vías de desarrollo, causando la muerte de niños debido a la deshidratación y a otras complicaciones. Las principales cepas patógenas de las bacterias *E. coli* se presentan en la tabla 2.

Tabla 02. Cepas de *E. coli*.

Cepas de <i>E. coli</i>	Modo de transmisión	Enfermedad
Enterotoxigénico (ETEC)	Alimentos o ingestión de agua	ETEC ocasiona diarrea sin fiebre.
Enteropatógeno (EPEC)	Los alimentos o agua, el contacto humano directo e indirecto	EPEC ocasiona diarrea acuosa, a veces con sangre.
Enterohemorrágico (EHEC)	Alimentos o ingestión, el contacto humano directo o indirecto	EHEC ocasionan diarrea con sangre, a veces pueden dañar los riñones
Enteroinvasivo (EIEC)	La ingestión de alimentos o agua	EIEC provoca disentería, como la diarrea. La fiebre es un síntoma común

Fuente: Prescott *et. al.* (15).

### 2.2.3. Definiciones y clasificación de los nanomateriales

- Definiciones utilizadas en nanotecnología:

Según el British Standards Institution, las siguientes definiciones son utilizadas en nanotecnología (15):

- Nanoescala: rango de tamaño aproximado de 1 a 1000 nm.
- Nanociencia: ciencia y el estudio de la materia a nanoescala que se ocupa de comprender su tamaño y sus propiedades dependientes de la estructura y compara la aparición de átomos

o moléculas individuales o las diferencias relacionadas con el material a granel.

- Nanotecnología: manipulación y control de la materia en la dimensión de nanoescala mediante el uso del conocimiento científico de diversas aplicaciones industriales y biomédicas.
  - Nanomaterial: material con cualquier estructura interna o externa en la dimensión de nanoescala.
  - Nanoobjeto: material que posee una o más dimensiones periféricas a nanoescala.
  - Nanopartículas: nanoobjetos con tres dimensiones externas a nanoescala. Los términos nanorod o nanoplaca se emplean, en lugar de nanopartículas (NP) cuando las longitudes de los ejes más largos y más cortos de un nanoobjeto son diferentes.
  - Nanofobia: cuando dos dimensiones exteriores son similares a nanoescala y una tercera dimensión más grande están presentes en un nanomaterial.
  - Nanocompuesto: estructura multifásica con al menos una fase en la dimensión de nanoescala.
  - Nanoestructura: composición de partes constituyentes interconectadas en la región de nanoescala.
  - Materiales nanoestructurados: materiales que contienen nanoestructura interna o superficial.
- Clasificación de los nanomateriales:

La clasificación mayor utilizada en las ciencias es la descrita por (15):

- Nanomateriales a base de carbono: contienen carbono y se encuentran en morfologías como tubos huecos, elipsoides o esferas. Los fullerenos (C<sub>60</sub>), los nanotubos de carbono (CNT), las nanofibras de carbono, el negro de humo, el grafeno (Gr) y las cebollas de carbono se incluyen en la categoría de nanomateriales a base de carbono.
- Nanomateriales de base inorgánica: incluyen a las nanopartículas y los nanomateriales estructurados de metal y óxido metálico.

Estos nanomateriales pueden sintetizarse en metales como nanopartículas de Au o Ag, óxidos metálicos como nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$ .

- Nanomateriales de base orgánica: incluyen nanomateriales hechos principalmente de materia orgánica, excluyendo los nanomateriales basados en carbono o inorgánicos. La utilización de interacciones no covalentes (débiles) para el autoensamblaje y el diseño de moléculas ayuda a transformar los nanomateriales orgánicos en estructuras deseadas, como dendrímeros, micelas, liposomas y nanopartículas de polímeros.
- Nanomateriales compuestos: son nanopartículas y nanopartículas estructuradas multifásicos con una fase en la dimensión de nanoescala que puede combinar nanopartículas con otras nanopartículas o nanopartículas combinados con materiales de mayor tamaño o con materiales a granel (por ejemplo, nanofibras híbridas) o más complicadas estructuras, tales como estructuras metalorgánicas. Los compuestos pueden ser cualquier combinación de nanomateriales a base de carbono, de metal o de base orgánica con cualquier forma de materiales a granel de metal, cerámica o polímero. Los nanomateriales se sintetizan en diferentes morfologías, dependiendo de las propiedades requeridas para la aplicación deseada.

#### 2.2.4. Caracterización de las nanopartículas $\text{TiO}_2$

Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se encuentra en tres fases cristalinas: la anatasa y el rutilo (ambas tetragonales) y la brookita (romboédrica). El rutilo es un material termodinámicamente muy estable y es la forma más común de  $\text{TiO}_2$  que se encuentra en la naturaleza. En cambio, la brookita y la anatasa son fases metaestables. El  $\text{TiO}_2$  es anfótero, químicamente muy estable y posee un fuerte poder oxidante que no es atacado por la mayoría de los agentes orgánicos e inorgánicos. Además, es un semiconductor sensible a la luz que absorbe radiación electromagnética cerca de la región Ultravioleta Visible (UV).

Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  por lo común es utilizado para inhibir bacterias *E. coli* y células tumorales del cáncer. Los efectos que produce las nanopartículas  $\text{TiO}_2$  en sistemas biológicos es por la reactividad del oxígeno que se generan en la superficie del  $\text{TiO}_2$  durante la actividad fotocatalítica. Este fenómeno se genera a cercanías de las células bacterianas que las destruye fácilmente, causando la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana de las células, con la interrupción de su respiración celular.

Las características morfológicas de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  son de gran interés, que influyen en la mayoría de sus propiedades. Así mismo, sus características estructurales permiten estudiar la composición y la naturaleza de unión de los materiales. Las características de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  con tamaños inferiores a 20 nm se determinan con gran precisión utilizando la técnica de potencial Z con el equipo DLS (16).

La estructura de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  pertenecen al sistema tetragonal y pueden describirse como cadenas de octaedros  $\text{TiO}_6$  en la que cada átomo  $\text{Ti}^{+4}$  están rodeado de un octaedro de seis átomos de  $\text{O}^{-2}$ . La distancia de los enlaces Ti-Ti en la anatasa son mayores, mientras que los enlaces Ti-O son más cortos que los del rutilo (figura 02) y (tabla 03).

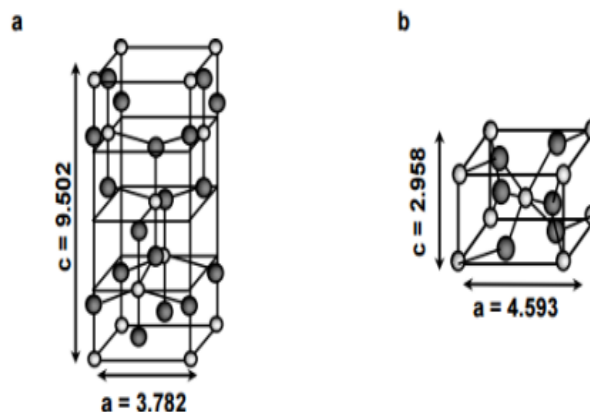


Figura 02. Estructura de las NPs- $\text{TiO}_2$ .

Nota: a) anatasa, b) rutilo.

Fuente: adaptado de Lin *et. al.* (17, 25).

Tabla 03. Comparación de las propiedades físicas y termodinámicas de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

Fase	Anastasa	Rutilo	Brookita
Peso molecular	79.89	79.89	79.89
Estructura cristalina	Tetragonal en el cuerpo	Tetragonal simple	Ortorómbica
Energía de banda prohibida (Eg)	3.20 eV	3.03 eV	-
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	4.06	4.21	4.13
Índice de refracción	2.48 - 2.56	2.61 - 2.89	2.58 - 2.70

Fuente: adaptado de Lin *et. al.* (17, 25).

#### 2.2.5. Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas sobre las bacterias

Los mecanismos de toxicidad de las nanopartículas en las bacterias todavía no están bien estudiados y no se entienden completamente. Sin embargo, la toxicidad de las NPs-TiO<sub>2</sub> en las células es provocado cuando las nanopartículas se unen a la membrana de las bacterias por interacción electrostática interrumpen la integridad de la membrana bacteriana. La nanotoxicidad generalmente se desencadena por la inducción del estrés oxidativo a formar radicales libres, después del contacto con las nanopartículas (figura 03). En la tabla 04 se presentan los mecanismos de toxicidad de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> sobre las bacterias gramnegativas de *E. coli* (18).

Los mecanismos de toxicidad de las nanopartículas dependen mucho de la composición, modificación de la superficie y sus propiedades intrínsecas de las nanopartículas. Esta situación indica que son muy complicados los mecanismos de toxicidad y depende de muchos factores como químicos, físicos y termodinámicos. Las nanopartículas de ZnO y TiO<sub>2</sub> tienen un potencial mutagénico débil hacia las bacterias *Salmonella typhimurium*; pero, para las bacterias *E. coli* son tóxicas bajo la influencia de la iluminación UV y que están disminuyen en un período de tiempo mayores a 60 minutos (18).



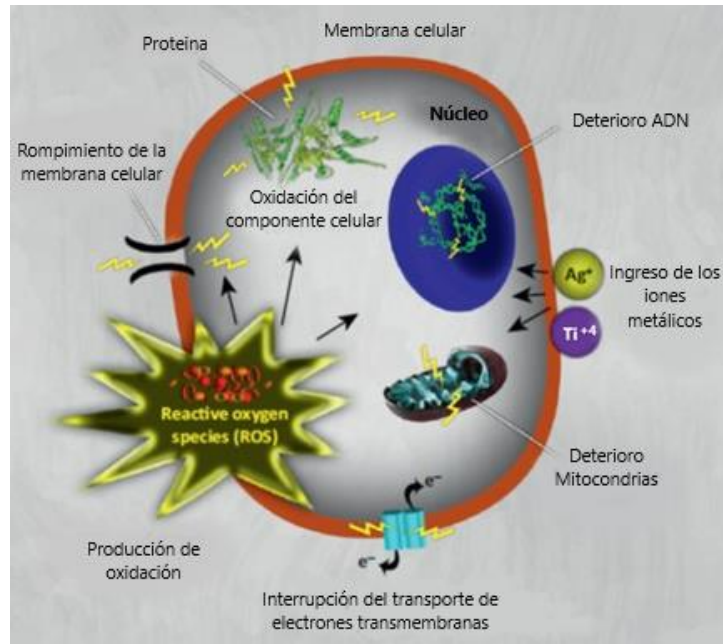


Figura 03. Toxicidad de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ .

Fuente: adaptado de Alikhani *et. al.* (20).

Tabla 04. Efectos tóxicos de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en bacterias *E. coli*.

Propiedad fisicoquímica de la NPs- $\text{TiO}_2$	Dosis de aplicación	Mecanismo de acción de toxicidad
50 nm	20 mg/l	No tóxico en condiciones de oscuridad.
5 – 40 nm (Tamaño definido por SEM).	30 $\mu\text{g/ml}$	Penetración en células hasta provocar el efecto de lysis.
20 nm (ST-01).	10 mg/l	Fotoactivación del efecto bactericida de los promotores de $\text{TiO}_2$ . Peroxidación de los polinsaturados fofolípidos de la membrana con pérdida de actividad respiratoria.
40 60 nm (Tamaño de poro en TEM).	8 y 80 ng/ml	$\text{TiO}_2$ : Ataque celular por generación oxidativa y toxicidad Generación de mutación en sistemas activos.
< 25 nm (tamaño definido por TEM).	<i>C. metallidurans</i> . $\text{TiO}_2$ se internaliza en las bacterias, pero no causa la muerte.	La resistencia de <i>C. metallidurans</i> está relacionada a la sobre expresión de los componentes protectores o por sistemas de flujo.

Fuente: adaptado de Alikhani *et. al.* (20).

- Factores de toxicidad de las nanopartículas:

La toxicidad de las nanopartículas (15), pueden deberse a los siguientes factores:

- Dosis y efecto del tiempo de contacto: el número de nanopartículas que penetran en las células depende directamente de la concentración molar de las nanopartículas en el medio y el tiempo de contacto con las bacterias.
- Efecto de agregación y concentración: el aumento de la concentración de nanopartículas promueve un estado de agregación. La mayoría de los agregados de nanopartículas de tamaños micrométricos no pueden penetrar en las células y de este modo pierden su toxicidad.
- Efecto del tamaño de partícula: las nanopartículas tienen una toxicidad mayor o menor dependiente de su tamaño. Por ejemplo, las nanopartículas de Ag con un diámetro de aproximadamente 10 nm tienen una mayor capacidad de penetrar y perturbar los sistemas celulares de muchos organismos que los iones de Ag<sup>+</sup> y de aquellas nanopartículas que tienen diámetros entre 20 y 100 nm.
- Efecto de forma de partícula: las nanopartículas exhiben toxicidad dependiente de su forma, es decir, tienen diferentes niveles de toxicidad. Por ejemplo, las fibras de asbesto de 10 µm de longitud pueden causar cáncer de pulmón, mientras que las fibras de asbesto más pequeñas de unos 5 a 10 µm pueden causar mesotelioma y las fibras de 2 µm de longitud pueden causar asbestosis.
- Efecto de la superficie: el efecto toxicológico de las nanopartículas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas porque aumenta su área superficial.
- Efecto de la estructura cristalina: basados en la estructura cristalina, las nanopartículas pueden presentar diferentes tipos de absorción celular, mecanismo oxidativo y localización subcelular. Por ejemplo, los dos polimorfos cristalinos de TiO<sub>2</sub> (rutilo y

anatasa) muestran una toxicidad diferente. En la oscuridad, las nanopartículas de rutilo de 200 nm provocan daños en el ADN por oxidación, mientras que las nanopartículas de anatasa de 200 nm no provocan daños en el ADN en condiciones oscuras.

- Efecto de funcionalización de superficie: las propiedades superficiales de las nanopartículas muestran efectos drásticos relacionados con la translocación y los procesos de oxidación posteriores.
  - Efecto de pre exposición: la actividad fagocítica celular puede ser estimulada por un tiempo de exposición más corto o por la exposición previa de concentraciones más bajas de nanopartículas.
- Efectos fotocatalíticos del  $\text{TiO}_2$ :

La fotocatalisis es una técnica utilizada para la purificación y el tratamiento de varios tipos de aguas residuales. El efecto de la fotocatalisis tiene una capacidad eficiente para inactivar el organismo patógeno, como las bacterias, presentes en las aguas residuales. Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  son utilizadas ampliamente por su poder fotocatalizador y su alto poder antimicrobiano. El uso de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en polvo generan dificultades para su separación posterior. Pero, si a estas nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  son modificadas con otros materiales aumentan su área superficial, entonces estas nanopartículas modificadas mejoran la actividad antimicrobiana (1). Se ha demostrado que el grafeno, los nanotubos de carbono y otros nanomateriales carbonosos poseen una buena capacidad de adsorción para la erradicación de contaminantes del agua residual, y que además tienen estructuras y propiedades únicas para optimizar a los fotocatalizadores de  $\text{TiO}_2$  (19). Por otro lado, si las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se utilizan en concentraciones menores a 0.1 ml en solución se facilita el proceso antibacterial de las bacterias *E. coli* para un período de tiempo de contacto de 30 minutos a 3 horas (13).

### 2.2.6. Nanopartículas y poblaciones bacterianas

En los lechos bacterianos de los tratamientos biológicos de humedales el contacto de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  con poblaciones microbianas donde ocurre la inhibición se da en períodos de 5 a 60 días, para concentraciones menores a 50 mg/l (4). Sin embargo, a medida que la concentración de  $\text{TiO}_2$  disminuye de 10, 5 hasta 1 mg/l la supervivencia de las bacterias *E. coli* aumentan hasta un 36 %, sin embargo, cuando el tiempo de contacto disminuye y la concentración de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  aumenta hasta 1 g/l la inhibición bacteriana llega a un 50 % provocando el cambio morfológico celular dando lugar a la contracción y fragmentación de las células (13). Estos antecedentes nos permiten estudiar la concentración de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y el tiempo de contacto con las bacterias *E. coli*.

### 2.3. Definición de términos

- Contaminación del agua: incorporación al agua de materias extrañas, como microorganismos, productos químicos, residuos industriales y de otros tipos, o aguas residuales. Estas materias deterioran la calidad del agua y la hacen inútil para otros usos (13).
- Desinfección de agua: es la eliminación de microorganismos patógenos que no han sido exterminados en fases iniciales del tratamiento de agua (13).
- *E. coli*: es un bacilo gramnegativo de la familia de las enterobacterias que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente (13).
- Membranas: son las barreras delgadas entre dos fases, a través de las cuales, bajo la acción de una fuerza (normalmente una diferencia de presión o de concentración) tiene lugar un transporte (20).
- Nanocompuestos: son materiales compuestos por dos o más componentes, en los cuales, al que se encuentra en mayor porcentaje, se le llama matriz y al de menor porcentaje, carga. La carga debe tener tamaño nanométrico (13).
- Nanopartícula: es una partícula con una dimensión menor a 100 nm (13).

- Nanotecnología: es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala (13).
- Purificación de agua: dependiendo del origen del agua a tratar, se implementan procesos de purificación de agua. Algunos de ellos pueden ser sedimentación, filtración, desalinización, ósmosis inversa, etc. (19, 28).
- pH: es el logaritmo de la recíproca de la concentración de ion hidrógeno en una sustancia o medio y que puede ser medida en un rango de 1-14, si su valor se encuentra entre 1-6 el pH es ácido, si se encuentra entre 8-14, su pH es básico (13).
- Toxicidad bactericida: es aquel que produce la muerte de una bacteria (19, 26).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### 3.1. Método, tipo y nivel de la investigación

##### 3.1.1. Métodos de la investigación

El método general de investigación es científico (13) y en el desarrollo de la investigación se explica la ocurrencia del fenómeno de inhibición de las bacterias *E. coli* para las variables del tiempo de contacto y la concentración de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Es así que se buscó explicar a qué período de contacto se produce la propiedad antibacterial de las nanopartículas y en que rango de concentración ocurre esta inhibición bacteriana de la bacteria *E. coli* que es la más representativa de los coliformes totales los cuales se encuentran en los efluentes finales de las plantas de tratamiento de las aguas residuales municipales. La descripción de los hechos de inhibición se explica y comparan con las investigaciones desarrolladas por otros investigadores.

##### 3.1.2. Tipo de la investigación

El tipo de Investigación es aplicado, que busca la generación de conocimiento con aplicación directa al tratamiento de aguas residuales municipales tratadas. Esta investigación se fundamenta en los hallazgos

tecnológicos de la investigación básica, la cual contribuye con el proceso de enlace entre la teoría y los resultados de la presente investigación (13).

### 3.1.3. Nivel de la investigación

El nivel de Investigación es explicativo, mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto. El interés es explicar cómo las variables del tiempo de contacto y la concentración de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  contribuyen con la desinfección de las bacterias *E. coli* presentes en las aguas residuales tratadas (13).

## 3.2. Diseño de la investigación

Para determinar el porcentaje de desinfección de las bacterias *E. coli*, se utilizó el diseño experimental factorial:  $N^\circ$  de pruebas =  $2^k$ .

Donde:

- 2: representa el número de niveles.
- k: representa el número de variables independientes.

Para el proyecto se utilizaron dos variables independientes con cuatro niveles como se muestra en la tabla 05.

Tabla 05. *Diseño experimental factorial.*

Concentración de NPs- $\text{TiO}_2$ (ppm)	Tiempo de contacto de NPs- $\text{TiO}_2$ (min)	Desinfección de las bacterias <i>E. coli</i> (UFC)
10	60	Y <sub>111</sub>
10	120	Y <sub>121</sub>
10	180	Y <sub>131</sub>
10	720	Y <sub>141</sub>
40	60	Y <sub>211</sub>
40	120	Y <sub>221</sub>

40	180	Y <sub>231</sub>
40	720	Y <sub>241</sub>
70	60	Y <sub>311</sub>
70	120	Y <sub>321</sub>
70	180	Y <sub>331</sub>
70	720	Y <sub>341</sub>
100	60	Y <sub>411</sub>
100	120	Y <sub>421</sub>
100	180	Y <sub>431</sub>
100	720	Y <sub>441</sub>

Fuente: elaboración propia.

### 3.3. Población y muestra

#### 3.3.1. Población

La población fue el efluente final de la planta de tratamiento de las aguas residuales municipales de nombre Alcas que pertenece al distrito de Sicaya, provincia de Huancayo.

#### 3.3.2. Muestra

La muestra estuvo constituida por 5 litros de aguas residuales de la PTAR que se utilizó para el análisis de las bacterias *E. coli* presentes en el agua residual. La unidad de análisis se complementó con 15 ml del medio de cultivo agar MacConkey.

### 3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### 3.4.1. Materiales, reactivos y equipos



- Materiales:
  - Micropipetas.
  - Placas Petri.
  - Tubos de ensayo.
  - Matraz Erlenmeyer.
  - Asa de siembra.
  - Vasos de precipitación.
  - Fiola.
  - Piseta.
  - Lunas de reloj.
  - Varilla.
  - Mangueras.
  - Bolsas negras.
  - Buretas.
  - Ganchos.
  - Soportes.
  - Cronómetro.
  - Papel aluminio.
  - Máscara de seguridad.
  - Tijeras.
  - Algodón.
  - Pabilo.
  - Papel kraft.
  - Papel filtro.
  - Pinzas.
  - Mechero de Bunsen.
  
- Reactivos:
  - *Escherichia coli* derivado de ATCC® 25922™.
  - Nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>).
  - Agar MacConkey.
  - Alcohol.
  - Etanol.

- Equipos e instrumentos:
  - Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (SEM): marca TESCAN, modelo MIRA3-LMU del Centro de Investigación de Nanotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Centro del Perú (fecha del protocolo de instalación: 09 mayo 2019 - ver Anexo 10).
  - Analizador de Nanopartículas y Analizador de Potencial Z (DLS): marca NICOMP PSS Z3000, del Centro de Investigación de Nanotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Centro del Perú (fecha de la certificación de análisis: 18 diciembre 2019 - ver Anexo 10).
  - Sonicador: marca BRANSON, Modelo SFX250 y con tensión en línea de 100 a 120 V, a 50/60 Hz. Incluye 3 tipos de disruptor/homogeneizador (calibración: 04 octubre 2019).
  - pHmetro digital: con agitador magnético, marca EZODO, modelo: PL-700ALS (calibración: 06 enero 2020).
  - Termómetro digital: tipo lapicero, marca BOECO, modelo TP101.
  - Autoclave horizontal: marca STURDY, modelo SA-232 de 16 litros, con una temperatura de esterilización hasta 120 °C (calibración: 26 noviembre 2019).
  - Mufla Horno de Cámara: marca PROTHERM, modelo ECO 110/15 con capacidad de 15 litros, temperatura máxima 1100°C (calibración: 05 diciembre 2019).
  - Balanza: de precisión modelo 400. 400 g/0.001 g, marca VWR americana (calibración: 24 setiembre 2019).
  - Contador de colonias digital: marca LKB 2002.

### 3.5. Técnicas de análisis y procesamiento de datos

- Método de análisis:
  - Protocolo para el traslado de las muestras al laboratorio:

La metodología seguida para el registro de datos de campo, toma de muestra, la conservación y preservación de la misma (agua residual tratada de la PTAR de Alcas del distrito de Sicaya) se realizó mediante el “Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales” aprobado por la Resolución Jefatural N° 010-2016-ANA de la Autoridad Nacional del Agua del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Los anexos que corresponden al protocolo para el traslado de las muestras al laboratorio de nanotecnología de la Universidad Nacional del Centro del Perú se presentan en el Anexo 11; los procedimientos principales fueron:

- Para la toma de las muestras se utilizaron los materiales y equipos de monitoreo que recomienda el protocolo.
  - La toma de muestra se realizó a las 9:00 horas del día 11 de diciembre del año 2019.
  - Las muestras se tomaron según el registro del anexo I del protocolo y ésta se realizó a una profundidad aproximadamente de 30 cm.
  - Durante la toma de muestra para el análisis del parámetro microbiológico de la bacteria *E. coli* se utilizaron dos recipientes de vidrio estéril con capacidad de 500 ml del cual se dejó un volumen de 166.7 ml para la aireación respectiva.
  - El rotulado y etiquetado de la muestra se realizó de acuerdo al anexo VII del protocolo.
  - Una vez que la muestra llegó al laboratorio se preservó a 4°C en un refrigerador.
  - Los análisis de las muestras se realizaron el mismo día 11 de diciembre del año 2019 a partir de las 11 a.m.
- Método de recuento en placa para la caracterización de las bacterias *E. coli* de la PTAR de Sicaya:

La preparación del medio de cultivo se realizó después de esterilizar los materiales en la mufla horno a 160°C por el espacio de 30 minutos. Las pruebas se realizaron con 4 pipetas de 1 ml y 12 placas Petri, todos ellos debidamente envueltos en papel kraft. La preparación del agar MacConkey

se realizó utilizando 150 ml de agua destilada y 7.5 g de agar MacConkey que fueron mezclados en un matraz de 250 ml para luego aforar en una fiola de 500 ml. La muestra de agua residual rotulado como AS-01 procedente de la PTAR Alcas del distrito de Sicaya se filtró y se diluyó en concentraciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Con las pipetas graduadas se tomaron disoluciones de 1 ml de cada dilución y se puso a las placas Petri conjuntamente con el agar MacConkey preparado anteriormente. Se esperó a que se solidifique, configurando la mezcla, y seguidamente se puso a la incubadora a 37°C por un tiempo de 48 horas. Finalmente, se realizó la lectura de las placas para determinar las colonias formadas de color rojo/rosado de cada placa con el agar MacConkey, siempre teniendo en cuenta la dilución que se tuvo al inicio de la preparación de la muestra.

- Activación de las bacterias *E. coli*:

Las cepas bacterias puras de *E. coli* adquiridas del laboratorio especializado Gen Lab del Perú S.A.C. de la ciudad de Lima, se llegó a activar con el siguiente procedimiento (20):

- El cultivo inicial de las bacterias *E. coli* se realizó en el medio de cultivo Luria Bertani a un pH de 7.4 las cuales fueron incubados a 37°C durante 24 horas.
- Las bacterias *E. coli* fueron recolectadas en pellets desde su fase de crecimiento exponencial y luego se centrifugaron a 500 rpm con una solución buffer salina de fosfato durante 10 minutos.
- Los pellets de las bacterias *E. coli* recolectados y centrifugados nuevamente se suspenden en solución buffer salina de fosfato a un pH de 7.2.
- Finalmente, estos pellets de bacterias en suspensión se diluyen en agua Milli-Q en celdas de vidrio Pírex para obtener una densidad de  $1 \times 10^5$  UFC/ml.

- Preparación del agar MacConkey:

Antes de iniciar la preparación del agar MacConkey, se pusieron a esterilizar todos los materiales en la mufla horno a 150°C por el espacio de 30 minutos. La preparación del agar MacConkey se realizó con 150 ml de agua destilada y un peso de 7.5 g de agar MacConkey para luego mezclar en un matraz de 250 ml; se llevó a calentamiento agitando constantemente. Tan pronto se presenta la ebullición se cierra el matraz con algodón, se forra con papel kraft y se ata con pabilo. Una vez logrado la dilución y una mezcla homogénea se procedió a esterilizar el matraz en la autoclave a 121°C por el tiempo de 15 minutos.



Figura 04. Autoclavado de los materiales para la preparación del agar MacConkey.

Fuente: propia.

- Preparación del medio de cultivo:

Antes de preparar el medio de cultivo, toda el área de trabajo se desinfecto con alcohol para luego prender el mechero Bunsen. Una vez prendido el mechero se procede a sacar el agar MacConkey y tomando una alícuota de 15 ml del agar se coloca en 6 placas Petri (una de ellas para control sin la presencia de la bacteria *E. coli*). Seguidamente se toman 5 colonias uniformes de las bacterias *E. coli* haciendo uso de las asas de siembra y se adiciona a las placas Petri. Esta operación se realizó lo más rápido

posible antes de que se produzca la solidificación de la solución. El medio de cultivo de las 6 placas Petri fueron puestas en la incubadora por el período de 24 horas y a 37°C.

- Preparación de la solución de TiO<sub>2</sub>:

La preparación de la solución de TiO<sub>2</sub> se hizo para las concentraciones de 10, 40, 70 y 100 ppm. El procedimiento fue el siguiente:

- Se pesó 1 g de NPs-TiO<sub>2</sub>-A015 comercial de marca mKNANO.
- En un vaso de precipitación de 250 ml se adicionó 100 ml de agua ultra pura y el peso de las NPs-TiO<sub>2</sub>.
- La solución preparada se agitó en un agitador magnético a 800 rpm durante 15 minutos.
- Posteriormente se realizó la dilución de la solución en una fiola de 100 ml para la concentración deseada.
- Las diluciones de las soluciones acuosas preparadas anteriormente se llevan a un baño ultrasónico por el espacio de 30 minutos a 24 kHz, para lograr la dispersión de las nanopartículas

- Inoculación de las bacterias *E. coli* y las NPs-TiO<sub>2</sub>:

Con el medio de cultivo y la solución de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se procedieron a la incubación siguiendo los siguientes pasos:

- Para la inoculación se toma 1 ml del medio de cultivo y se inocula en una placa Petri que contiene agar MacConkey.
- Seguidamente se adiciona 1 gota de NPs-TiO<sub>2</sub> en la zona central de la placa.
- Una vez inoculada en la placa Petri se lleva a la incubadora por el tiempo de 24 horas a 37°C.
- Se realiza el mismo procedimiento para las diferentes concentraciones NPs-TiO<sub>2</sub>.
- Al mismo tiempo se trabaja con muestras control al cual no se adiciona las NPs-TiO<sub>2</sub>, estas muestras son en número de tres.

- Recuento de colonias en placa:
  - Después del periodo de incubación se retira la placa Petri inoculada y mediante el contador de colonias se procede al conteo y el registro de los datos.
  - El conteo de las colonias se realizó a cada hora en forma periódica hasta la tercera hora y luego se dejó de contar hasta las 12 horas posteriores.
  - Después del conteo de las colonias de color rojo/rosado de cada placa se aplica el factor de dilución.
  - Cada lectura se va comparando con las tres muestras control.
  - Los resultados del conteo de tres muestras se promedian y comparan con las tres muestras control.
  - Se repite el procedimiento para cada experimento.
  
- Caracterización de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>:

La caracterización de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se ha realizado utilizando la técnica del diámetro hidrodinámico mediante la Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y también se realizó mediante la técnica de imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las nanopartículas de óxido de titanio fueron adquiridas de la empresa MK Impex Corporation, Div. mkNANO de Canadá quienes utilizaron el método de síntesis industrial el de Sol-Gel anatasa.

- Dispersión de Luz Dinámica (DLS):

En la determinación del tamaño de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se utilizó 0.01 g de las nanopartículas la cuál fue adicionado a 100 ml de agua destilada, esta solución fue agitada por un espacio de 10 minutos en el sonicador Branson para lograr la dispersión de las nanopartículas. La muestra de 1 ml de solución, antes de ser colocado a la celda del equipo DLS, se filtró con una membrana de 0.24 µm. La prueba se realizó a 25°C en modo "Sizing" del equipo DLS NICOMP PSS Z300.



Figura 05. Equipo DLS NICOMP PSS Z3000 utilizado para la determinación del tamaño de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

Fuente: propia.

○ Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):

La determinación de la morfología y composición de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se realizó en el equipo de Microscopía Electrónica de Barrido de Campo marca TESCAN, modelo MIRA3-LMU del Centro de Investigación de Nanotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Centro del Perú. El detector SE trabajó a 10 kV, 15 mm y 50 μm. La preparación de la muestra se realizó de la siguiente manera (21):

- Se prepararon soluciones acuosas de NPs-TiO<sub>2</sub> a 100 ppm.
- La solución preparada anteriormente se llegó a homogenizar en el sonicador Branson a 40 KHz por 10 minutos.
- La filtración de la solución se realizó en equipo de filtración al vacío en membranas de 0.44 micrómetros.
- Las membranas se colocaron sobre crisoles y se secaron en el horno a 150°C durante 5 horas.
- En las portas muestras del SEM o llamados “stubs” se colocaron cintas de carbono y sobre ellas se puso las muestras secas de las nanopartículas del TiO<sub>2</sub>.



- Los “stubs” con las muestras de las NPs-TiO<sub>2</sub> se metalizaron con el equipo DENTON VACUUM Desk V, por un período de 10 minutos utilizando el metalizador de oro.
- Las muestras preparadas y metalizadas fueron colocadas en las portamuestras del equipo SEM para su análisis respectivo.



*Figura 06.* Equipo de Microscopia Electrónica de Barrido utilizado para la caracterización de la morfología y composición de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

Fuente: propia.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Resultados del tratamiento y análisis de información

##### 4.1.1. Resultados de la cuantificación de las bacterias *E. coli* del efluente final de la PTAR de Sicaya

Los resultados de la tabla 06 indican la cuantificación de las bacterias *E. coli* presentes en el efluente final de la PTAR Alcas del distrito de Sicaya que se realizó mediante el recuento de placas. La caracterización del agua residual se ha realizado solamente para el parámetro de bacterias y no una caracterización completa (2). El resultado promedio de 710 UFC/ml de bacterias *E. coli* presentes en las aguas tratadas de la PTAR nos indica que todavía existe contaminación y es necesario tratar estas aguas para el reuso. La normatividad vigente para los efluentes finales de las PTAR permite 10 000 NMP/100ml de coliformes termotolerantes como límite máximo permisible.

Tabla 06. *Resultados del conteo de las bacterias E. coli en placas Petri.*

Nº de muestra	UFC/ml	
	A	B
1	710	750
2	680	820

3	610	720
Promedio	710	

Fuente: elaboración propia.

El análisis de las bacterias *E. coli* que se realizó a las muestras de aguas residuales del efluente final de la PTAR de Alcas ha seguido la metodología del conteo en placas Petri.

En la investigación de Haq *et. al.* (30) utilizaron el medio de cultivo agar Muller-Hinton para analizar el efecto de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en la bacteria *E. coli*, en cambio en el presente trabajo se hizo con el medio de cultivo de agar MacConkey, el cual fue pesado (figura 07), para luego proceder a la inoculación (figura 08) y finalmente se realizó el recuento de placas (figura 09).



Figura 07. Pesado del agar MacConkey para para la preparación del medio de cultivo.

Fuente: propia.



Figura 08. Muestras de inoculación forradas con papel kraft y atadas con pabilo.

Fuente: propia.

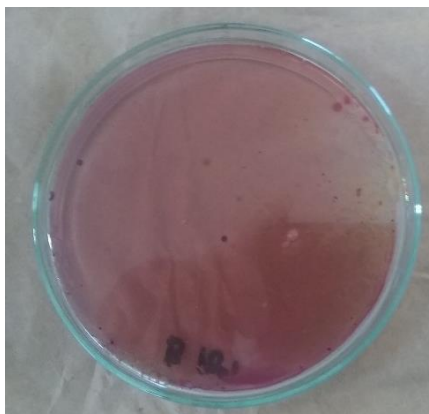


Figura 09. Recuento de las colonias de *E. coli* del efluente final de las aguas residuales de la PTAR - Alcas - Sicaya.

Fuente: propia.

#### 4.1.2. Inoculación de las bacterias *E. coli* y las NTPs-TiO<sub>2</sub> y recuento de colonias en placa

El medio de cultivo de agar MacConkey con una concentración inicial constante de  $1 \times 10^5$  UFC/ml de bacterias *E. coli* derivadas ATCC® 25922™ se ha inoculado con diferentes soluciones de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> desde 10 hasta 100 ppm. La experimentación se realizó con dos replicas para tener los resultados consistentes. Antes de los experimentos, la inoculación se mantuvo constante durante las primeras 48 horas a una temperatura de 37°C. Una vez iniciado los experimentos se varió el tiempo de contacto inicialmente y luego la concentración de las NPs-TiO<sub>2</sub>, en ambos casos se han cuantificado las bacterias *E. coli* por conteo de las placas (figura 10). El procedimiento experimental se realizó de acuerdo a Lee *et. al.* (13) que utilizaron nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en polvo y que la cuantificación se hizo mediante la densidad óptica con el equipo UV-Visible. Los resultados del conteo de colonias se procesaron teniendo en cuenta las diluciones preparadas que variaron desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-4}$ . Experimento similar realizaron M. Sadiq *et. al.* (21) con concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> que variaron entre 50 y 100 ppm para un período de contacto de 4 a 6 horas, asimismo se utilizaron concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> desde 9.7 hasta 19.5 ppm de TiO<sub>2</sub> que se encuentran dentro del rango de concentraciones de nanopartículas realizadas en la presente investigación.



Figura 10. Conteo de colonias de bacterias *E. coli* y NPs-TiO<sub>2</sub> (tras el experimento).

Fuente: propia.

#### 4.1.3. Resultados de la caracterización de nanopartículas

- Resultados de la caracterización de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> por DLS:

La caracterización del diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se realizó mediante el equipo de DLS. En las figuras 11, 12 y 13 se presentan los histogramas de la distribución de las nanopartículas según su intensidad, número y volumen de muestra. Se hicieron tres corridas a diferentes diluciones de muestra.

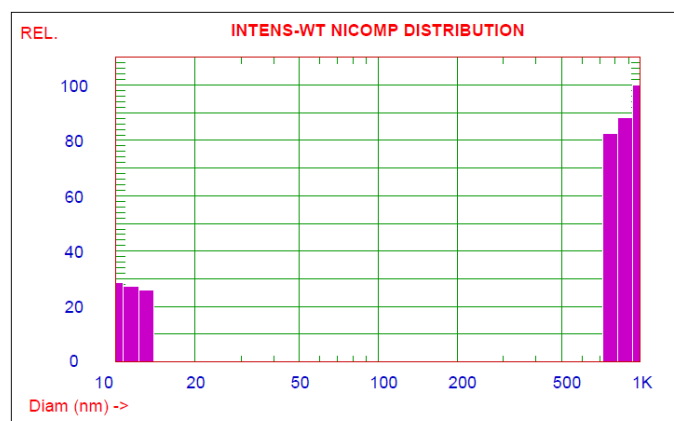


Figura 11. Histograma de Intensidad de la distribución de las NPs-TiO<sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS.

Fuente: elaboración propia.

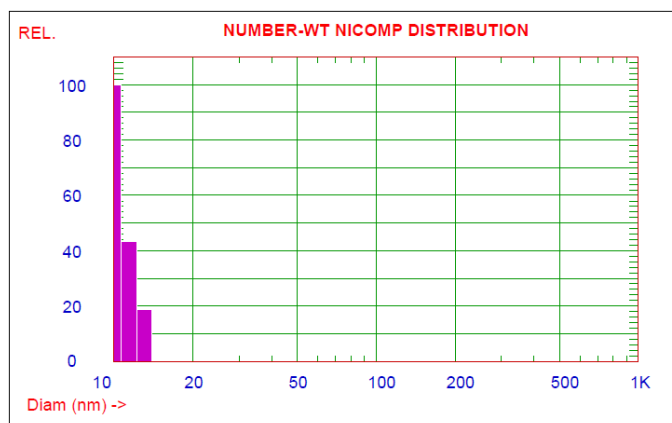


Figura 12. Histograma de números de distribución de las NPs-TiO<sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS.

Fuente: elaboración propia.

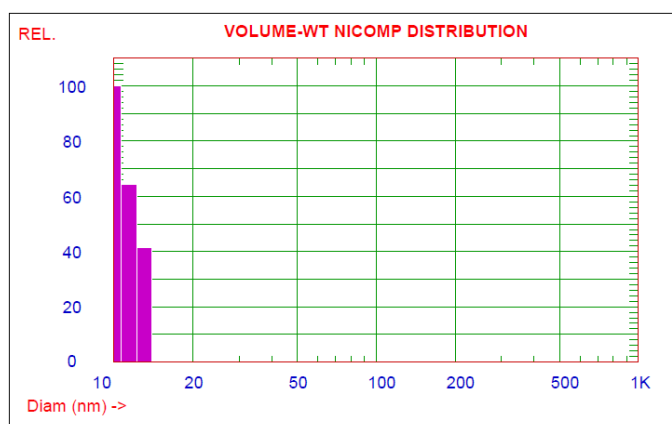


Figura 13. Histograma de Volumen de las NPs-TiO<sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS.

Fuente: elaboración propia.

En la tabla 07, se presentan los diámetros de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> que predominan de acuerdo a la intensidad, número y volumen de la muestra. El promedio del diámetro hidrodinámico da como resultado  $11.03 \pm 1.23$  nm (ver complemento en el Anexo 06).

Tabla 07. Resumen de datos de las mediciones del diámetro hidrodinámico de las NPs-TiO<sub>2</sub>.

Medida de diámetro (nm)	Desviación estándar	% Volumen
11.40	1.60	100

Intensidad - Pico 1	11.00	1.00	100
Volumen - Pico 1	10.70	1.10	100
Número - Pico 1	11.03	1.23	100

Fuente: elaboración propia.

Estos resultados concuerdan con la información proporcionada por los fabricantes, pues indican que el tamaño es menor a 15 nm del producto MKN-TiO<sub>2</sub>-A015; se debe considerar que la técnica utilizada por los fabricantes es diferente al DLS. Una primera determinación del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas resultó de 112.0 nm, con una desviación de 14.5 nm (figura 14). Esta primera aproximación concuerda con los determinados por Ochoa *et. al.* (23), quienes trabajaron en su investigación con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> anatasa del tamaño comprendido entre 20 nm y 769 nm.

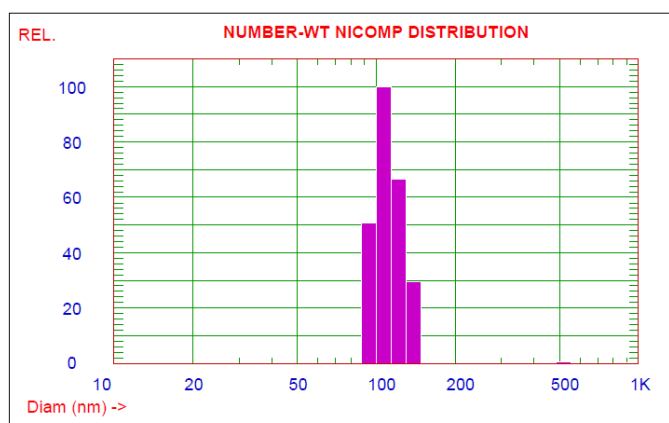


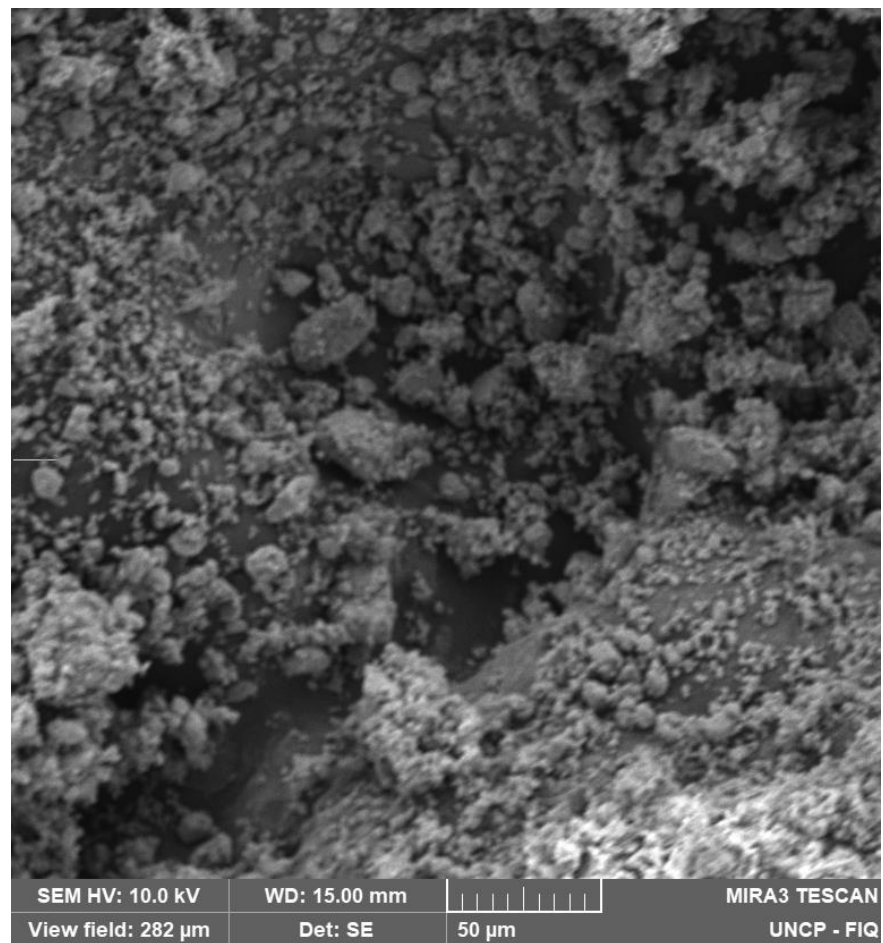
Figura 14. Histograma de números de distribución de las NPs-TiO<sub>2</sub> obtenido en el equipo DLS (2).

Fuente: elaboración propia.

- Resultados de la caracterización de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> por SEM:

La caracterización morfológica, estructura y composición de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se realizaron por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). De los resultados de las imágenes, que se presentan en las figuras 15 y 16, se afirma que las NPs-TiO<sub>2</sub> están aglomeradas

en gran parte toxicidad (9), sin embargo, estas nanopartículas tienen diámetros menores a 200 nm. En la figura 15 se aprecia que las nanopartículas tienen una morfología semiesférica. El espectro de las muestras de nanopartículas se produjo para una fuerte intensidad máxima de titanio a 10.0 keV, según las especificaciones de la estructura y propiedad física de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (figura 02 y tabla 03).



*Figura 15.* Geometría y tamaño de las NPs- $\text{TiO}_2$  en el equipo SEM.

Fuente: elaboración propia.



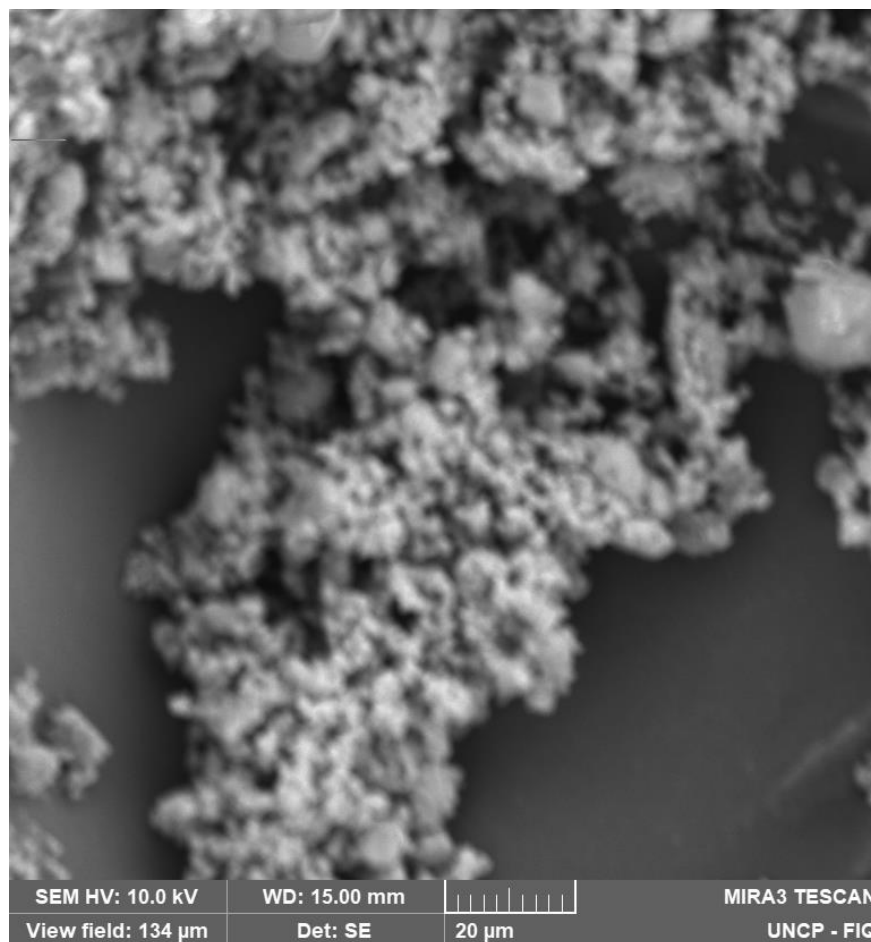


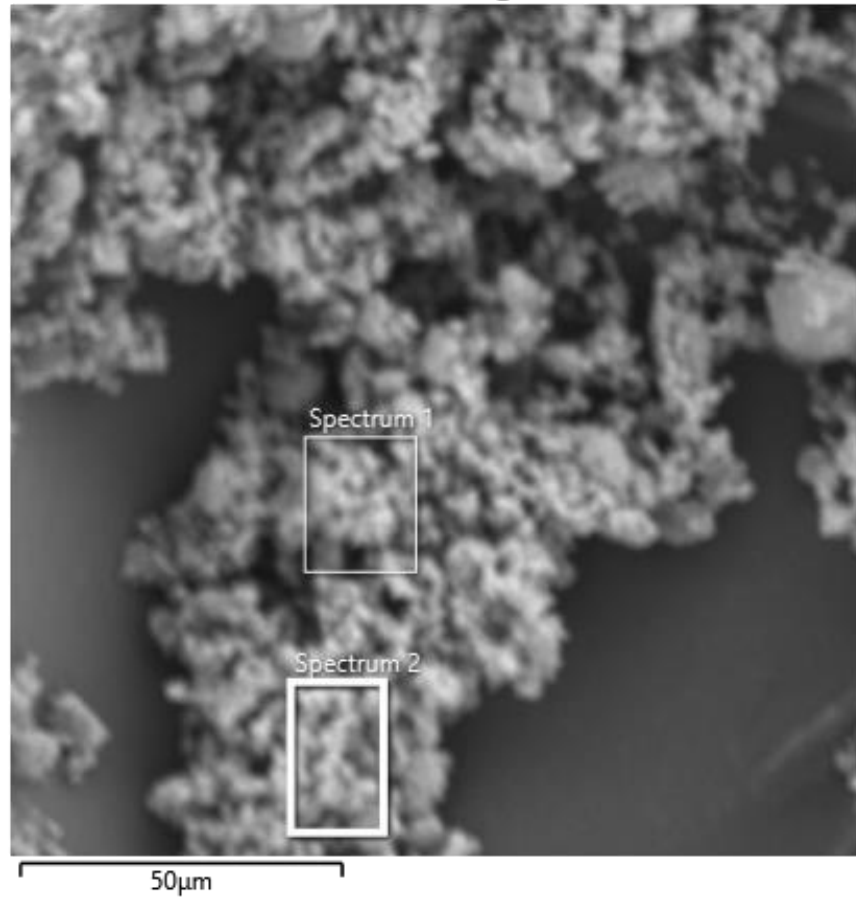
Figura 16. Conglomerado de las NPs-TiO<sub>2</sub> en el equipo SEM.

Fuente: elaboración propia.

Esta característica morfológica de semiesfera de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> van a influenciar en las propiedades de toxicidad (16).

- Resultados de la composición de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> por EDS del SEM:

Se realizó el análisis de composición semicuantitativa de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en el equipo de microscopía electrónica de barrido (24). Las imágenes se obtuvieron con el software Aztec del detector de EDS de la empresa Oxford Instruments (figura 17).



*Figura 17.* Imágenes del detector EDS con diferentes espectros en la determinación de la composición NPs-TiO<sub>2</sub> del equipo SEM.

Fuente: elaboración propia.

El análisis de composición semicuantitativa de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se realizó con diferentes espectros (figuras 18 y 19) de la muestra. Los resultados de composición pueden tener variación dependiendo de los espectros, es por ello que se realizó varios espectros con la finalidad de disponer una información exacta de la composición de las nanopartículas similar a lo realizado por Tombini *et. al.* (9).

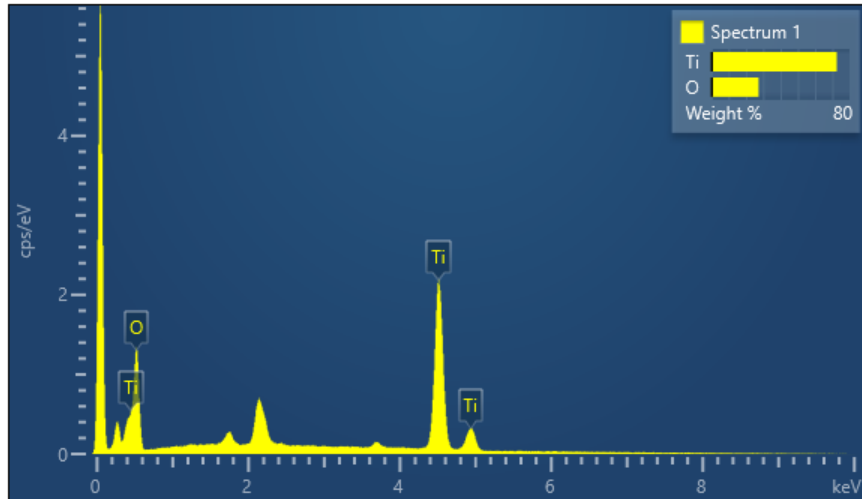


Figura 18. Composición de las NPs-TiO<sub>2</sub> en el primer espectro del equipo SEM con el detector EDS.

Fuente: elaboración propia.

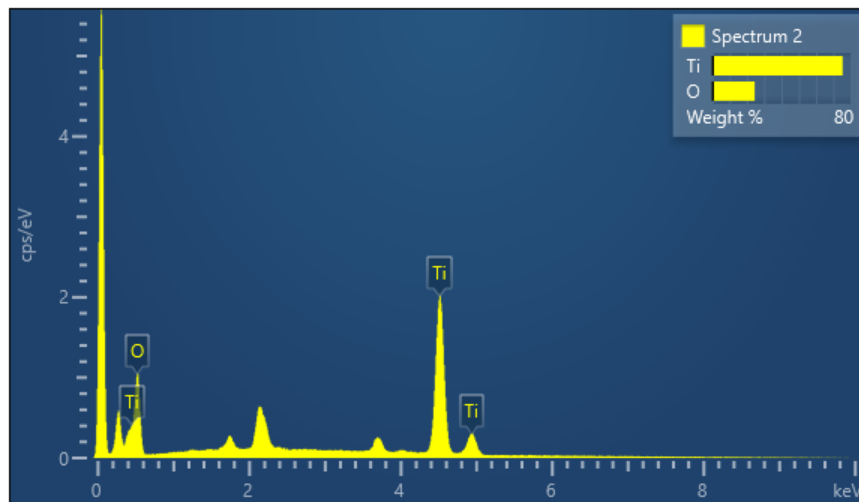


Figura 19. Composición de las NPs-TiO<sub>2</sub> en el segundo espectro del equipo SEM con el detector EDS.

Fuente: elaboración propia.

El reporte final de la composición de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> de acuerdo al software del detector del EDS nos indica una pureza de 99 % que certifica las especificaciones técnicas del producto MKN-TiO<sub>2</sub>-A015 (catálogo del producto).

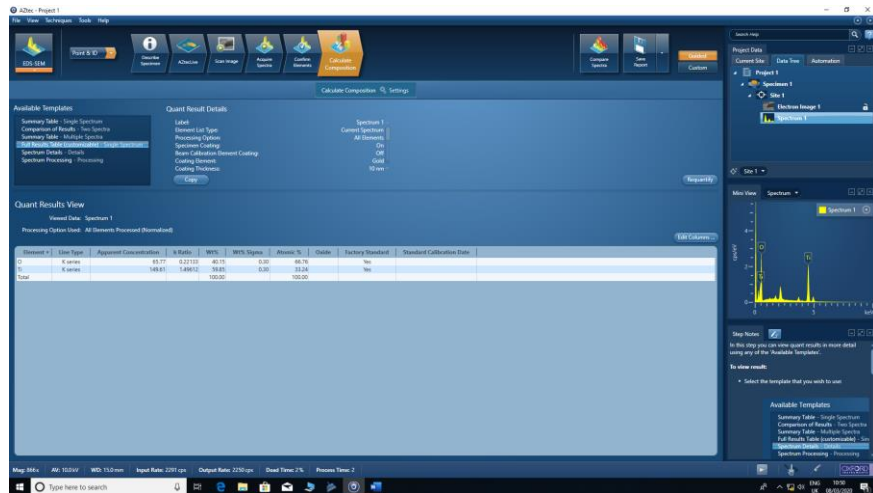


Figura 20. Reporte de la composición de las NPs-TiO<sub>2</sub> del equipo SEM con el detector EDS.

Fuente: elaboración propia.

#### 4.1.4. Resultados del tiempo de contacto y las concentraciones de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>

Los experimentos para la comprobación del tiempo de contacto entre las NPs-TiO<sub>2</sub> y las bacterias *E. coli* se realizaron por un período de 24 horas y estos fueron para cada uno de los experimentos, a diferencia de la investigación que realizó Alhadrami *et. al.* (28) por un espacio de 48 horas. En una primera etapa se realizaron los conteos de las unidades formadoras de colonias a cada hora. El conteo de cada experimento se inició a las 7 a.m. hasta las 10 a.m., luego se realizó el último conteo a las 10 p.m. de la noche. En cada experimento se varió las concentraciones de 10, 40, 70 y 100 ppm de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

Tabla 08. *Tiempo de contacto y concentraciones las NPs-TiO<sub>2</sub> con las bacterias E. coli.*

Tiempo (min)	Concentraciones TiO <sub>2</sub> (ppm)			
	10	40	70	100
	<i>E. coli</i> (UFC/ml)			
0	100 000	100 000	100 000	100 000

60	83 400	87 200	94 900	99 600
120	65 000	76 200	81 200	89 500
180	39 300	49 700	64 300	75 600
720	840	4 700	7 600	11 200

Fuente: elaboración propia.

Estos resultados de la tabla anterior indican que las nanopartículas sí actúan con inhibidoras del crecimiento bacteriano de las *E. coli*, pues disminuyen considerablemente su cantidad. Las pruebas se realizaron a diferentes tiempos de contacto para identificar la mayor eficacia de toxicidad con diferentes concentraciones de nanopartículas que variaron desde 10 a 100 ppm NPs-TiO<sub>2</sub>, a diferencia del trabajo de Haghi *et. al.* (31) que realizaron sus experimentos hasta una concentración de 400 ppm. Antes de poner en contacto la solución de nanopartículas y el medio de cultivo con las bacterias *E. coli* se tuvieron que sonicar las muestras de nanopartículas hasta lograr una adecuada dispersión y no formar los aglomerados de NPs-TiO<sub>2</sub>. Este procedimiento facilitó la inoculación en la parte central de la placa Petri. La concentración inicial de 10<sup>5</sup> UFC/ml han sido constantes para todos los experimentos. Esta única concentración de bacterias fue con fines de comprobar la efectividad de la inhibición de las bacterias *E. coli* para las variables del tiempo de contacto y concentración de las NPs-TiO<sub>2</sub>.

#### 4.2. Discusión de resultados

- Discusión de los resultados de la inoculación y conteo de las bacterias *E. coli*:

El período de incubación para los experimentos del tiempo de contacto y la concentración de las NPs-TiO<sub>2</sub> se mantuvieron en 24 horas antes de realizar los conteos de las colonias de células de *E. coli*. En el trabajo de M. Sadiq *et. al.* (21) se realizaron incubaciones de 48 horas que fue aplicada para la cuantificación de las bacterias *E. coli* presentes en las aguas residuales municipales. El menor período de inoculación de las bacterias *E. coli* de 24 horas es muy posible que afectó la actividad microbiana porque solamente

durante las primeras horas han disminuido las colonias entre un 10 a 20 % de las bacterias iniciales inoculadas (tabla 08). Esto se produjo al comparar los resultados del conteo con las muestras control, pues teníamos que incluir controles positivos (inoculo con nanopartículas y medios nutritivos, sin bacterias) y por otro lado control negativo (inoculo con medios nutritivos sin nanopartículas) como lo recomiendan los autores citados (21).

En el trabajo de Sen *et. al.* (24) realizaron el experimento con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> que tenían modificaciones con grupos sulfonados hasta un 3 % con la finalidad de modificar la superficie y mejorar sus propiedades para una alta estabilidad coloidal, baja viscosidad y aumento de la conductividad térmica y electroquímica. En el presente trabajo solamente se utilizó nanopartículas de TiO<sub>2</sub> sin modificación alguno, por ello existe una baja eficiencia de inhibición a diferencia de Khan *et. al.* (16) que adicionaron alizarina para conseguir terminales hidroxilos de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> anatasa lo cual favorece la inhibición de bacterias a temperaturas ambiente.

Los resultados de las imágenes del SEM que muestran la aglomeración (figura 16) de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> deben haber influenciado en una poca toxicidad sobre las bacterias *E. coli* (16), y por consiguiente, un bajo rendimiento principalmente para aquellas concentraciones de nanopartículas mayores a 40 ppm pues llegaron a disminuir hasta un  $4 \times 10^3$  UFC/ml que resulta muy desfavorable.

La variedad de los tamaños de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> utilizadas estuvieron probablemente entre 10 y 100 nm según los resultados de la primera y última evaluación de la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). El tamaño promedio de 11.03 de diámetro de las nanopartículas deben haber sido afectado por la heterogeneidad y la aglomeración que existió de acuerdo a los análisis de imágenes del SEM. Esta diferencia de tamaños ha perjudicado una alta toxicidad de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en las bacterias *E. coli*. Este efecto de antibacteriano de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> también se produjeron en los trabajos de Ochoa *et. al.* (23) y Lin *et. al.* (25) para diámetros menores de 25 nm de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

Las concentraciones de nanopartículas utilizadas en los experimentos estuvieron dentro del rango de 10 a 100 ppm. Con la concentración de 10 ppm de  $\text{TiO}_2$  se ha conseguido disminuir las bacterias *E. coli* desde  $1 \times 10^5$  UFC/ml hasta 840 UFC/ml durante el período de contacto de 24 horas, este resultado se compara con lo realizado por Moura y Van Houten (26) que realizaron los experimentos en 48 horas con concentraciones de 10 y 40 ppm de  $\text{TiO}_2$  logrando una alta toxicidad de las bacterias *E. coli*.

- Discusión de los resultados del tiempo de contacto y la concentración de las nanopartículas  $\text{TiO}_2$  con las bacterias *E. coli*:

La inhibición del crecimiento bacteriano tiene relación con el tiempo de contacto y la concentración de las nanopartículas. Para una concentración de 10 ppm de NPs- $\text{TiO}_2$  y un período de contacto de 180 minutos (figura 21) se logra inhibir la cantidad de 16 600 UFC/ml que resulta muy bajo a comparación de lo estudiado por Planchon *et. al.* (27), que, con esa misma concentración, logra generar toxicidad de las bacterias *E. coli* hasta en un 63 % de UFC/ml. Esta baja inhibición se debe a la poca dispersión de las NPs- $\text{TiO}_2$  lo cual hizo que la toxicidad disminuya, pues se tiene entendido que a menores concentraciones de nanopartículas se genera gran área superficial que provoca mayor toxicidad; a diferencia de que a mayor concentración de las nanopartículas la actividad antibacteriana se demora e inclusive ya no genera inhibición bacteriana la cual puede durar varios días (21).

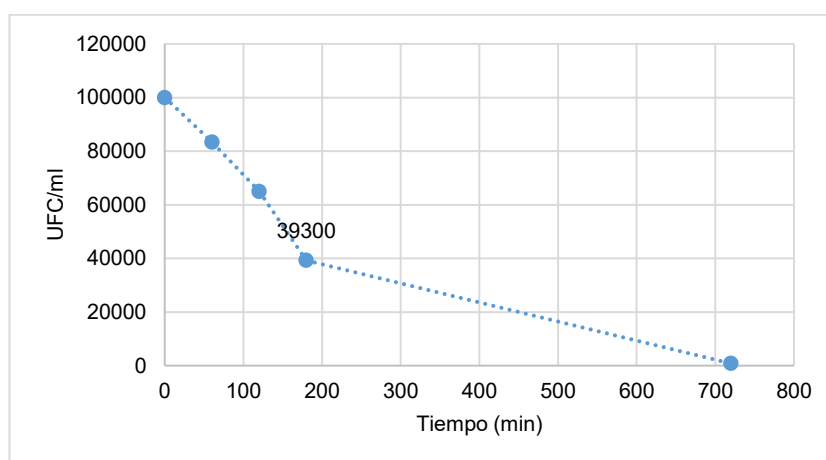


Figura 21. Inhibición de las bacterias *E. coli* a concentración de 10 ppm de NPs- $\text{TiO}_2$ .

Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, está demostrado que la actividad fotocatalítica de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  son eficaces para la inhibición de las bacterias *E. coli* para concentraciones menores a  $1 \times 10^4$  UFC/ml que se producen inclusive en 20 minutos de contacto (26).

La letalidad de la toxicidad de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  sobre las bacterias *E. coli* suceden en aproximadamente 60 minutos (27) cuando se genera un área superficial grande, a concentraciones menores de 100 ppm de  $\text{TiO}_2$ , la causa de esta toxicidad es por el principio de adsorción de las nanopartículas a la pared celular bacteriana. La poca inhibición lograda en los experimentos se debe al tamaño de las nanopartículas utilizadas que variaron de 11.03 hasta 100 nm y a la poca dispersión de las nanopartículas que generaron pequeños agregados en suspensión (27). El otro factor es no haber controlado el pH, porque las bacterias a bajos pH tienen mayor resistencia a los tóxicos.

La inhibición para todos los casos de estudio con concentraciones de 10, 40, 70 y 100 ppm de  $\text{TiO}_2$  ocurrieron en forma gradual durante los primeros minutos hasta llegar a los 180 minutos (figura 22). Esta baja inhibición también sucede en la investigación de Alhadrami *et. al.* (28). quienes utilizan concentraciones de 100, 200, 400, 600 y 800 ppm de  $\text{TiO}_2$ . Por otra parte, para períodos de contacto mayores a 180 minutos, la inhibición de las bacterias *E. coli* con las partículas  $\text{TiO}_2$  disminuyen gradualmente hasta los 720 minutos de contacto.

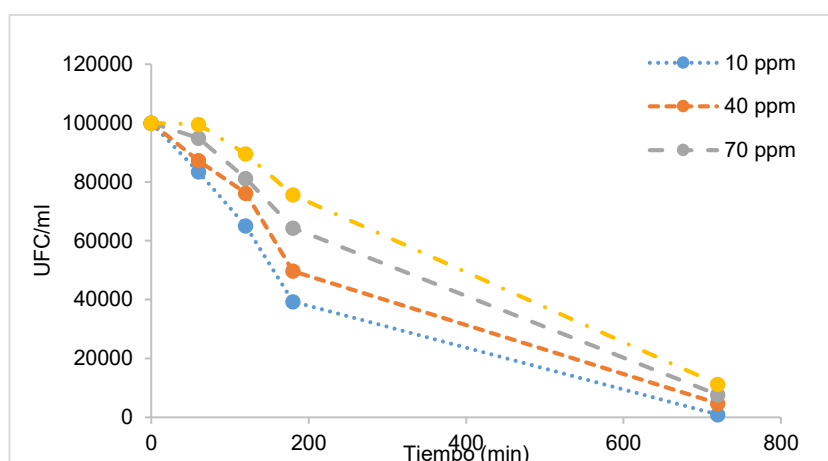


Figura 22. Inhibición de las bacterias *E. coli* con concentraciones de 10, 40, 70 y 100 ppm de NPs- $\text{TiO}_2$  para 720 minutos.

Fuente: elaboración propia.



Para una concentración de 40 ppm de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  el efecto de la inhibición sobre las bacterias *E. coli* desciende muy lentamente hasta los 120 minutos llegando a una concentración de 762 00 UFC/ml de bacterias *E. coli*. Sin embargo, después de ese período de contacto ocurre una rápida inhibición hasta los 49 700 UFC/ml de bacterias (figura 22 y 23).

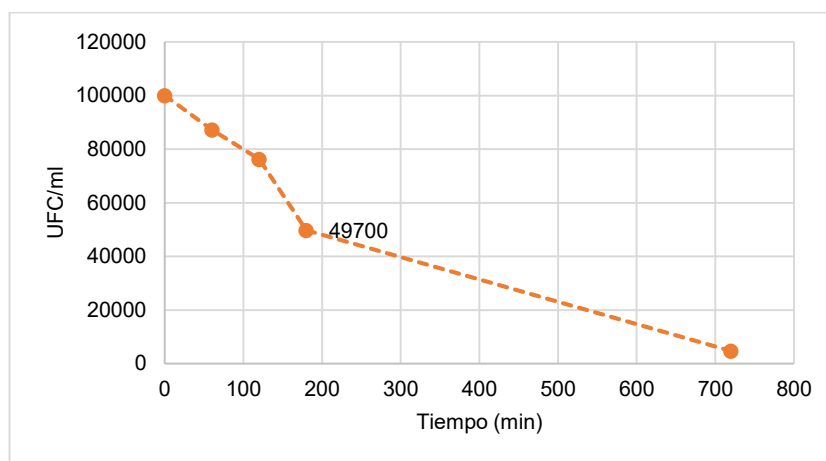


Figura 23. Inhibición de las bacterias *E. coli* a concentración de 40 ppm de NPs- $\text{TiO}_2$ .

Fuente: elaboración propia.

Para las concentraciones superiores a 40 ppm de NPs- $\text{TiO}_2$  la inhibición de las bacterias *E. coli* siguen la misma tendencia de disminución rápida hasta llegar a los 180 minutos (figura 22). En cambio, para el período de contacto de 720 minutos con una concentración de 40 ppm de las NPS- $\text{TiO}_2$  terminan por debajo de los 11 200 UFC/ml (figura 23) indicándonos que llega a su máxima inhibición las bacterias *E. coli*. Estos resultados nos proporcionan información de que es posible controlar la inhibición o crecimiento de las bacterias *E. coli* utilizando las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  para cumplir con los requerimientos de la normatividad que indican como límite máximo de 10 000 NMP/ml de coliformes termotolerantes en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Una baja eficiencia de inactivación de las bacterias *E. coli* puede ser atribuido a la utilización del medio de cultivo de agar MacConkey que fueron puesto en contacto directo con las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y no se adicionó una fuente de materia orgánica que poseen las aguas residuales que aceleran la actividad fotocatalítica (29). Cuando en el medio existe fuente de carbono se logra

disminuir tanto la materia orgánica y los coliformes totales (6) solo que la eficiencia de remoción se prolonga por un período de 14 horas para la materia orgánica y en 50 minutos para la inhibición del 23 % de los coliformes totales. La fotocatalisis y fotolisis pueden tener mayor eficiencia de inhibición para los coliformes totales llegando inclusive a un 80 % en tan solo 20 minutos; pero, esto es para concentraciones bajas de  $1 \times 10^2$  UFC/ml de bacterias *E. coli* y que para una mayor concentración bacteriana de  $1 \times 10^7$  UFC/ml se logra inhibir en un período de contacto de 120 minutos. El efecto de la fotocatalisis se confirma en los estudios de Haq *et. al.* (30) quienes trabajaron con una concentración de 100 mg/l de  $\text{TiO}_2$  en 24 horas con una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  logrando una inhibición de las bacterias *E. coli*.

Los factores de toxicidad del  $\text{TiO}_2$  que influyeron en la desinfección de las bacterias *E. coli* fueron principalmente la concentración y el tamaño de las nanopartículas. Según los resultados la mayor efectividad de desinfección se produjo para una concentración de 10 ppm de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y cuando aumentan las concentraciones disminuyen la eficiencia de desinfección (31). El poco efecto de toxicidad a mayor concentración de nanopartículas es porque se forman agregados de nanopartículas cuyos tamaños micrométricos no penetran en las células para provocar la toxicidad, y que además el efecto toxicológico disminuye por una mayor área superficial del agregado. Estas aglomeraciones de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  modifican el tamaño inicial que en algunos caso posiblemente han llegado a los 100 nm (figura 16) de la microscopia electrónica de barrido (27).

La toxicidad también está relacionada con las concentraciones de las nanopartículas y su composición. La adición de vanadio a las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  anatasa generan una mayor toxicidad; pues, en la oscuridad aumentan su poder fotocatalítico que inhiben las bacterias *E. coli* (32); esto sucede para concentraciones mayores de 17 mg/l y para un período de contacto menor a 3 horas. El efecto tóxico de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se atribuye a la descomposición de las membranas externas de las bacterias por la reactividad del oxígeno, principalmente por los radicales hidroxilos (OH), que conduce a la peroxidación de fosfolípidos y finalmente a la muerte celular (22).

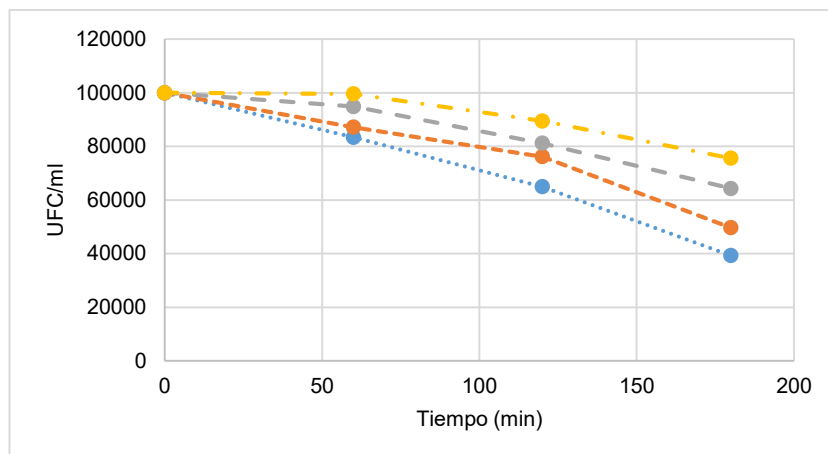


Figura 24. Inhibición de las bacterias *E. coli* a concentraciones de 10, 40, 70 y 100 ppm de NPs-TiO<sub>2</sub> para 180 minutos.

Fuente: elaboración propia.

Existen una gran cantidad de bacterias que pertenecen al grupo de coliformes que se encuentran en las aguas residuales municipales, algunos de los cuales tienen crecimientos diferentes que varían en función del tiempo, y que otras bacterias sobreviven a las condiciones fotocatalíticas del TiO<sub>2</sub> e inclusive algunas se inhibirán inmediatamente (29). Como las bacterias *E. coli* están consideradas como patogénicas y son las más representativas de este grupo, las cuales se inhiben como máximo hasta los 720 minutos; las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se pueden considerar como una alternativa para el tratamiento final de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (figura 24).

## CONCLUSIONES

1. La mayor desinfección de las bacterias *E. coli* de las aguas residuales municipales tratadas se producen para tiempos de contacto menores de 60 minutos para las concentraciones de 10 y 40 ppm de NPs-TiO<sub>2</sub>.
2. La cuantificación de las bacterias *E. coli* del efluente final del agua residual municipal tratada de la PTAR de Alcas del distrito de Sicaya que tienen instalado dos lagunas facultativas primarias y dos lagunas secundarias fue de 710 UFC/ml.
3. La mayor desinfección de las bacterias *E. coli* de las aguas residuales municipales tratadas se produce a los 180 minutos del tiempo de contacto con las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.
4. Una alta eficiencia de desinfección de las bacterias *E. coli* de las aguas residuales municipales tratadas ocurre para una concentración de 10 ppm de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> con un tamaño de partículas de 11.03 nm.
5. Al utilizar nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en el tratamiento final de las aguas residuales municipales se logra disminuciones menores a 1 000 NMP/ml de las bacterias *E. coli* cumpliéndose con el Estándar de Calidad Ambiental para agua de riego de vegetales.

## RECOMENDACIONES

1. La caracterización de las bacterias *E. coli* se debe realizar con otros métodos para mejorar los resultados y también incluir los análisis de las otras bacterias que están presentes en los coliformes totales.
2. El tamaño de las nanopartículas influye en la desinfección de las bacterias *E. coli*, por lo que se recomienda utilizar nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  menores a 30 nm para darle mayor poder fotocatalítico.
3. Para mejorar el tiempo de contacto de las bacterias *E. coli* se recomienda utilizar nanomateriales compuestos, modificados o aquellos nanomateriales a base de carbono.
4. Se recomienda mejorar la sonicación de la muestra de nanopartículas que se analizan en el SEM para lograr una mayor dispersión y la identificación de la estructura morfológica de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ .
5. Por el período de contacto de 180 minutos de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y las bacterias *E. coli* es necesario mejorar estos resultados modificando la utilización de otro tipo de inoculaciones y las recomendaciones anteriores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANJUM, M., MIANDAD, M., WAQAS, F., GEHANY, M. y BARAKAT. Remediation of wastewater using various nano-materials. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2016. ISSN 18785352: doi:10.1016/j.arabjc.2016.10.004
2. MINISTERIO DEL AMBIENTE. Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM. Aprueban Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales. *Normas Legales El Peruano* [online]. 2010, 1-2: [http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds\\_003-2010-minam.pdf](http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds_003-2010-minam.pdf)
3. BARZOLA, M. Universidad Nacional del Centro del Perú. *Universidad Nacional del Centro del Perú - Centro de Posgrado*. 2004, 10-11.
4. YANG, X., Yi CHEN, X., LIU, F., GUO, X., SU y HE, Q. Influence of titanium dioxide nanoparticles on functionalities of constructed wetlands for wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2018, **352**, 655–663. ISSN 13858947: doi:10.1016/j.cej.2018.07.068
5. ZHANG, Y., WU, B., XU, H., LIU, H., WANG, M., HE, Y. y PAN, B. Nanomaterials-enabled water and wastewater treatment. *NanoImpact* [online]. 2016, **3-4**, 22–39. ISSN 24520748: doi:10.1016/j.impact.2016.09.004
6. FERNÁNDEZ, J., CARDOZO, M., CARRASCAL, A., SALCEDO, J., PEDROZA, A. y DAZA, C. Microbiology cell-staining wastewater treatment using TiO<sub>2</sub> thin films tratamiento de agua residual de microbiología usando películas delgadas de TiO<sub>2</sub>. 2015, **17(1)**, 35-48.
7. SÁNCHEZ, M., ELPIDIO, J., JASSO, C., EUGENIA, M. y NORIEGA-TREVIÑO, C. Desinfección y purificación de agua mediante nanopartículas metálicas y membranas compósitas. *Tecnología y Ciencias del Agua*. 2012, **III**, 87-100. ISSN 0187-8336.
8. CHOI, S., JOHNSTON, M., WANG, G. y HUANG, C. Looking for engineered nanoparticles (ENPs) in wastewater treatment systems: Qualification and quantification aspects. *Science of the Total Environment* [online]. 2017, **590-591**, 809-817. ISSN 18791026: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.061

9. TOMBINI, L., LÓPEZ-GÁLVEZ, F., TRUCHADO, P., TONDO, E., GIL, M. y ALLENDE, A. Suitability of chlorine dioxide as a tertiary treatment for municipal wastewater and use of reclaimed water for overhead irrigation of baby lettuce. *Food Control* [online]. 2019, **96**, 186-193. ISSN 09567135: doi:10.1016/j.foodcont.2018.08.036
10. CERVANTES-AVILÉS, P., DÍAZ, E., PALMA-TIRADO, L. y CUEVAS-RODRÍGUEZ, G. Interactions and effects of metal oxide nanoparticles on microorganisms involved in biological wastewater treatment. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2017, **80**(10), 1103-1112. ISSN 10970029: doi:10.1002/jemt.22907
11. WESTERHOFF, P., SONG, G., HRISTOVSKI, K. y KISER, M. Occurrence and removal of titanium at full scale wastewater treatment plants: Implications for TiO<sub>2</sub> nanomaterials. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2011, **13**(5), 1195-1203. ISSN 14640325: doi:10.1039/c1em10017c
12. KAPOOR, V., PHAN, D. y PASHA, T. Effects of metal oxide nanoparticles on nitrification in wastewater treatment systems: A systematic review. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* [online]. 2018, **53**(7), 659-668. ISSN 15324117: doi:10.1080/10934529.2018.1438825
13. LEE, J., PARK, S., LEE, S., KIM, B., LEE, S., LEI, J., SIM, S., GU, M. y YI, J. Toxic effects of titanium dioxide nanoparticles on microbial activity and metabolic flux. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. 2012, **17**(2), 276-282. ISSN 12268372: doi:10.1007/s12257-010-0251-4
14. PRESCOTT, HARLEY y KLEIN. *Microbiología Industrial y Biotecnología*. 2002. ISBN 844860525X.
15. JEEVANANDAM, J., BARHOUM, A., CHAN, Y., DUFRESNE, A. y DANQUAH, M. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* [online]. 2018, **9**(1), 1050-1074. ISSN 21904286: doi:10.3762/bjnano.9.98
16. KHAN, I., SAEED, K. y KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, **12**(7), 908-931. ISSN 18785352: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011

17. TAYADE, R. y GANDHI, V. Solar energy conversion, carbon dioxide reduction, hydrogen generation, silver phosphate, cerium oxide, zinc oxide a zinc sulfide. *Photocatalytic Nanomaterials for Environmental Applications*. nedatováno. ISBN 9781945291586.
18. HAJIPOUR, M., FROMM, K., AKBAR, A., JIMÉNEZ, D., RUIZ, I., ROJO, T., SERPOOSHAN, V., PARAK, W. y MAHMOUDI, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, **30**(10), 499-511. ISSN 01677799: doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.004
19. WEI, Y., ZHU, J., GAN, Y. y CHENG, G. Titanium glycolate-derived TiO<sub>2</sub> nanomaterials: Synthesis and applications. *Advanced Powder Technology* [online]. 2018, **29**(10), 2289-2311. ISSN 15685527: doi:10.1016/j.appt.2018.05.016
20. ALIKHANI, M., LEE, S., YANG, J., SHIRZAD-SIBONI, M., PEERI-DOGAHEH, H., KHORASANI, M., NOOSHAK, M. y SAMARGHANDI, M. Photocatalytic removal of *Escherichia coli* from aquatic solutions using synthesized ZnO nanoparticles: A kinetic study. *Water Science and Technology* [online]. 2013, **67**(3), 557-563. ISSN 02731223: doi:10.2166/wst.2012.593
21. SADIQ, I., CHANDRASEKARAN, N. y MUKHERJEE, A. Studies on Effect of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Growth and Membrane Permeability of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus subtilis*. *Current Nanoscience* [online]. 2010, **6**(4), 381-387. ISSN 15734137: doi:10.2174/157341310791658973
22. NANOPARTICLES, T. Antimicrobial Activity of Synthesized TiO<sub>2</sub> Nanoparticles [online]. 2013, (Atcc 8739), 8-11: doi:10.15242/IIIE.E1213004
23. OCHOA, Y., ORTEGÓN, Y. y PÁEZ, J. Síntesis de TiO<sub>2</sub>, fase anatasa, por el método solgel: Estudio del efecto de la presencia de AcacH en el sistema. *Revista Facultad de Ingeniería*. 2010, (52), 29-40. ISSN 01206230.
24. SEN, S., GOVINDARAJAN, V., PELLICCIONE, C., WANG, J., MILLER, D. y TIMOFEEVA, E. Surface Modification Approach to TiO<sub>2</sub> Nanofluids with High Particle Concentration, Low Viscosity, and Electrochemical Activity. *ACS Applied Materials and Interfaces* [online]. 2015, **7**(37), 20538-20547. ISSN 19448252: doi:10.1021/acsami.5b05864



25. LIN, X., LI, J., MA, S., LIU, G., YANG, K., TONG, M. a LIN, D. Toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of particle size, crystal phase and water chemistry. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(10), 1-8. ISSN 19326203: doi:10.1371/journal.pone.0110247
26. MOURA, M. y VAN HOUTEN, B. Review Article. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2010, **405**(April), 391-405: doi:10.1002/em
27. PLANCHON, M., FERRARI, R., GUYOT, F., GÉLABERT, A., MENGUY, N., CHANÉAC, C., THILL, A., BENEDETTI, M. y SPALLA, O. Interaction between *Escherichia coli* and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in natural and artificial waters. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2013, **102**, 158-164. ISSN 09277765: doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.034
28. ALHADRAMI, H., BAQASI, A., IQBAL, J., SHOUDRI, R., MOHAMMAD, A., AZHAR, E., AL-HAZMI, F., AL-GHAMDI, A. a WAGEH, S. Antibacterial Applications of Anatase TiO<sub>2</sub> Nanoparticle. *American Journal of Nanomaterials* [online]. 2017, **5**(1), 31-42. ISSN 2372-3114: doi:10.12691/ajn-5-1-5
29. RINCÓN, A. y PULGARÍN, C. Bactericidal action of illuminated TiO<sub>2</sub> on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: Post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Applied Catalysis B: Environmental* [online]. 2004, **49**(2), 99-112. ISSN 09263373: doi:10.1016/j.apcatb.2003.11.013
30. HAQ, S., REHMAN, W., WASEEM, M., JAVED, R., MAHFOOZ-UR-REHMAN y SHAHID, M. Effect of heating on the structural and optical properties of TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Antibacterial activity. *Applied Nanoscience (Switzerland)* [online]. 2018, **8**(1-2), 11-18. ISSN 21905517: doi:10.1007/s13204-018-0647-6
31. HAGHI, M., HEKMATAFSHAR, M., JANIPOUR, M., SEYYED, S., FARAZ, M., SAYYADIFAR, F. y GHAEDI, M. Antimicrobial effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on pathogenic straine of *E. coli*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 2012, **3**(3), 621-624.
32. SUTRISNO, H., ARISWAN, A. y PURWANINGSIH, D. THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF VANADIUM-AND CHROMIUM DOPED TiO<sub>2</sub> -ANATASE. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia* [online]. 2016, **12**(2), 112-127: doi:10.20961/alchemy.v12i2.1744

## **ANEXOS**

## Anexo 01. Matriz de consistencia.

Problema general	Objetivo general	Hipótesis general
¿A qué períodos de contacto entre las bacterias <i>E. coli</i> y las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> se producirá una completa desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas?	Evaluar el tiempo de contacto de las bacterias <i>E. coli</i> y la concentración de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> en la desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas.	Para un determinado tiempo de contacto y una determinada concentración de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> se producirán una desinfección completa de las bacterias <i>E. coli</i> de las aguas residuales municipales tratadas.
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas
¿Cuál es la cantidad de las bacterias <i>E. coli</i> presentes en el efluente final de un agua residual municipal tratada?	Cuantificar las bacterias <i>E. coli</i> que se encuentran en el efluente final de un agua residual municipal tratada.	Para un determinado tiempo de contacto entre las bacterias <i>E. coli</i> y las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> ocurrirá una mayor o menor desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas.
¿Cuál es el menor tiempo de contacto entre las bacterias <i>E. coli</i> y las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> para una mayor desinfección de las bacterias de las aguas residuales municipales tratadas?	Evaluar la mayor desinfección de las bacterias <i>E. coli</i> con el menor tiempo de contacto de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> en la desinfección de las aguas residuales municipales tratadas.	Para una determinada concentración de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> ocurrirá una baja o alta eficiencia de desinfección de las bacterias <i>E. coli</i> de las aguas residuales municipales tratadas.
¿A qué concentración de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> se producirá una alta eficiencia de la desinfección de las bacterias <i>E. coli</i> de las aguas residuales municipales tratadas?	Hallar la concentración en que las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> produzcan una alta eficiencia de la desinfección de las bacterias <i>E. coli</i> de las aguas residuales municipales tratadas.	

Fuente: elaboración propia.

## Anexo 02. Operacionalización de las variables.

Tipo de variables	Denominación de la variable	Descripción de la variable	Dimensión	Indicadores	Instrumentos
Independiente (X <sub>1</sub> )	Tiempo de contacto de las nanopartículas.	Tiempo que permanecen las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> en un volumen de aguas residuales hasta que las bacterias <i>E. coli</i> sean desinfectadas	Tiempo	minutos	Cronómetro
Independiente (X <sub>2</sub> )	Concentración de nanopartículas.	Cantidad de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> en miligramos que produce efecto en las bacterias <i>E. coli</i> en un litro del efluente final de las aguas residuales tratadas	Cantidad	ppm (partes por millón)	Balanza
Dependiente (Y)	Desinfección de las bacterias <i>E. coli</i> .	Número de bacterias <i>E. coli</i> que mueren a consecuencia de actividad antimicrobial de las nanopartículas de TiO <sub>2</sub> .	Número	UFC (Unidades Formadoras de colonias)	Contador de colonias

Fuente: elaboración propia.

**Anexo 03.** Panel fotográfico - Planteamiento del problema.



*Fotografía 01. Contaminación de los efluentes de PTAR Alcas - Sicaya, antes de la mejora de la operación de la planta.*



*Fotografía 02. Efluente final de la PTAR Alcas - Sicaya después de la mejora de la operación.*





*Fotografía 03. Planta de tratamiento de aguas residuales municipales de Quiullacocha, Sicaya - Huancayo.*



*Fotografía 04. Efluente final de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales de Quiullacocha, Sicaya - Huancayo.*



*Fotografía 05. Planta de tratamiento de aguas residuales municipales de Chupaca - Junín.*



*Fotografía 06. Sistema de tratamiento terciario con cloro de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales de Chupaca - Junín.*







*Fotografía 07. Alimentación del cloro en el tratamiento terciario de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales de Chupaca - Junín.*



**Anexo 04.** Resultados del análisis de coliformes termotolerantes de la PTAR Alcas - Sicaya por la empresa SAG S.A.C.



**LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL-DA CON REGISTRO N° LE-047**

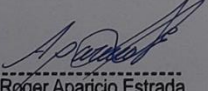


**INFORME DE ENSAYO N° 113992-2017  
CON VALOR OFICIAL**


**II. RESULTADOS:**

Producto declarado		Efluente Industrial
Matriz analizada		Agua residual
Fecha de muestreo		2017-07-16
Hora de inicio de muestreo (h)		09:30
Coordenadas UTM WGS 84		0470621E 8672127N
Altitud (msnm)		3232
Descripción del punto de muestreo		Efluente de PTAR Alcas
Condiciones de la muestra		Refrigerada / preservada
Código del Cliente		EF-01
Código del Laboratorio		17071648
Ensayos	Unidades	Resultados
Aceites y grasas (HEM)	mg/L	3.0
Demanda Química de oxígeno (DQO)	O <sub>2</sub> mg/L	61.6
Sólidos suspendidos totales (TSS)	mg/L	6.30
pH (medición en campo)	Unid. pH	7.13
Temperatura (medición en campo)	° C	11.5
Numeración de Coliformes Fecales <sup>(2)</sup>	NMP/100mL	170 x 10 <sup>4</sup>

Medición de pH realizada a 25°C.  
(2) Coliformes Fecales es lo mismo que coliformes termotolerantes.



**Bigo. Roger Aparicio Estrada**  
C.B.P. N° 7403  
Asesor Técnico Biológico



**Quim. Belbeth Y. Fajardo León**  
C.Q.P. N° 648  
Asesor Técnico Químico

EXPERTS  
WORKING  
FOR YOU

\* El método indicado no ha sido acreditado por INACAL-DA.  
SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (SMEWW)-APHA-AWWA-WEF. 22nd. Edition 2012. EPA: U.S. Environmental Protection Agency. ASTM: American Society for Testing and Materials. NTP: Norma Técnica Peruana.  
**OBSERVACIONES:** Está prohibida la reproducción parcial o total del presente documento a menos que sea bajo la autorización escrita de Servicios Analíticos Generales S.A.C. Sólo es válido para las muestras referidas en el presente informe.  
Las muestras serán conservadas de acuerdo al periodo de perecibilidad del parámetro analizado con un máximo de 30 días calendario de haber ingresado la muestra al laboratorio.  
**NOTA:** Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

**SERVICIOS ANALÍTICOS GENERALES S.A.C.**  
Laboratorio Av. Naciones Unidas N° 1565 - Urb. Chacra Ríos Norte - Lima 01 - Perú. Central Telefónica (511) 425-7227 - 425-6885 - 425-5564 - 425 - 6047 | MÓVIL 994 976 442  
Website www.sagperu.com Contacto Electrónico sagperu@sagperu.com | laboratorio@sagperu.com

Cod. FI-02/Revisión: 06/FE/09/2015 Página 3 de 4

**Anexo 05.** Panel fotográfico - Caracterización y análisis de las aguas residuales de la PTAR de Alcas - Sicaya.

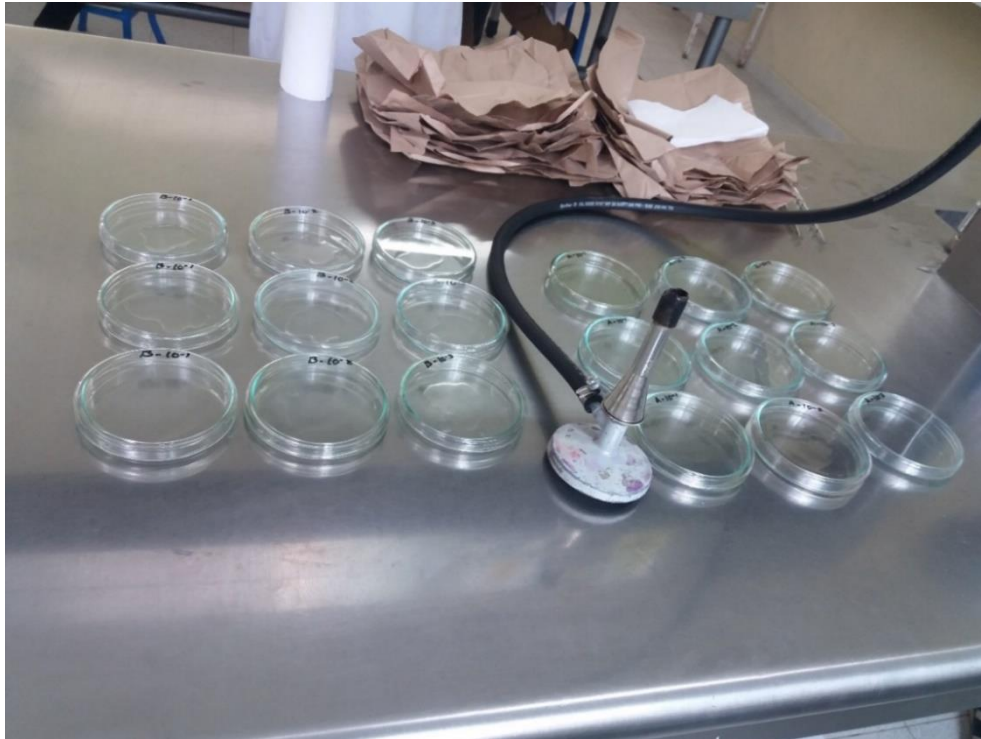


*Fotografía 08. Punto de toma de muestra del efluente final de la PTAR Alcas - Sicaya realizado por la empresa SAG S.A.C.*

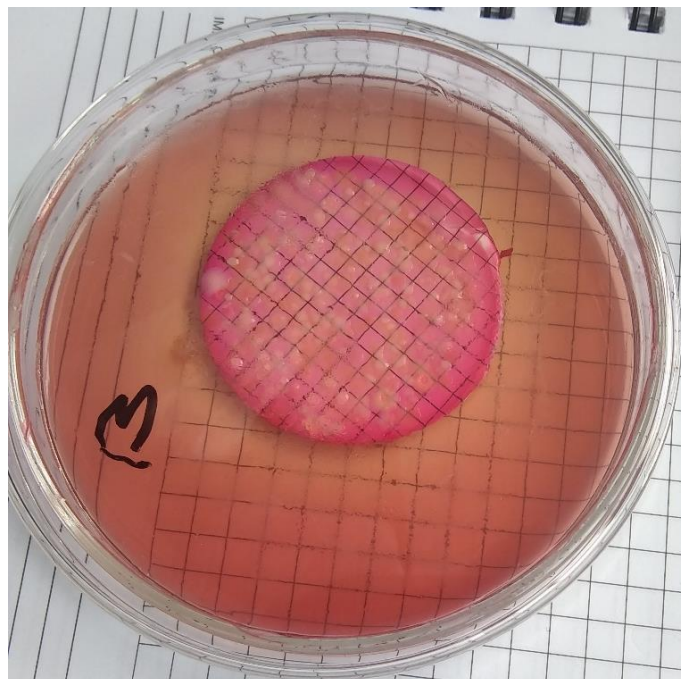


*Fotografía 09. Punto de toma de muestra del efluente final de la PTAR Alcas - Sicaya para la realización del análisis de E. coli.*





*Fotografía 10. Mechero Bunsen y la preparación del medio de cultivo.*



*Fotografía 11. Recuento de colonias durante la caracterización de las aguas residuales de la PTAR de Alcas - Sicaya.*

**Anexo 06.** Resultados de la caracterización del tamaño de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> con el equipo DLS.

**Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA**

NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

-Run time-	-Data Ch 1-	-Avg Intensity-	-Sensitivity-						
0Hr 6Min 10Sec	1.8K	47.0kHz	150						
Gaussian Analysis — Solid Particle — NICOMP Analysis									
Mean Dia	Std Dev	Chi Sq	Base Adj	Peak 1	Peak 2	Peak 3			
VOL: 94.3 nm	285.7 nm	5.04	0.00 %	11.0	881.8	—	Fit Error		
	302.9 %			99.9 %	0.1 %	—	3513.970		
INT: 316.1 nm	957.5 nm	5.04	0.00 %	11.4	889.4	—	Residual		
	302.9 %			22.2 %	77.8 %	—	36.600		
NUM: 35.4 nm	107.3 nm	5.04	0.00 %	10.7	—	—			
	302.9 %			100.0 %	—	—			

Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

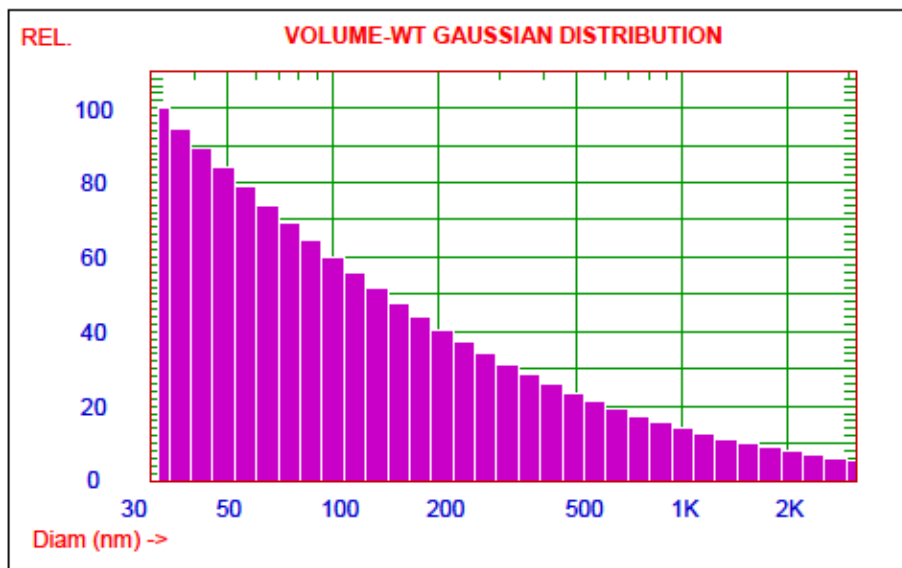
Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

**VOLUME-Weighted GAUSSIAN DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter	= 94.3 nm	Variance (P.I.)	= 9.175
Std. Deviation	= 285.7 nm (302.9%)	Chi Squared	= 5.037
Norm. Std. Dev.	= 3.029	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Var'n)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 1.47E-008 cm <sup>2</sup> /s



test.227

**Cumulative Result:**

25 % of distribution < 24.8 nm  
50 % of distribution < 94.3 nm  
75 % of distribution < 202.9 nm  
90 % of distribution < 410.3 nm  
99 % of distribution < 795.4 nm  
80 % of distribution < 248.4 nm

Run Time	= 0 Hr 6 Min 10 Sec	Wavelength	= 632.8 nm
Count Rate	= 47 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 1.8 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 5.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333

Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

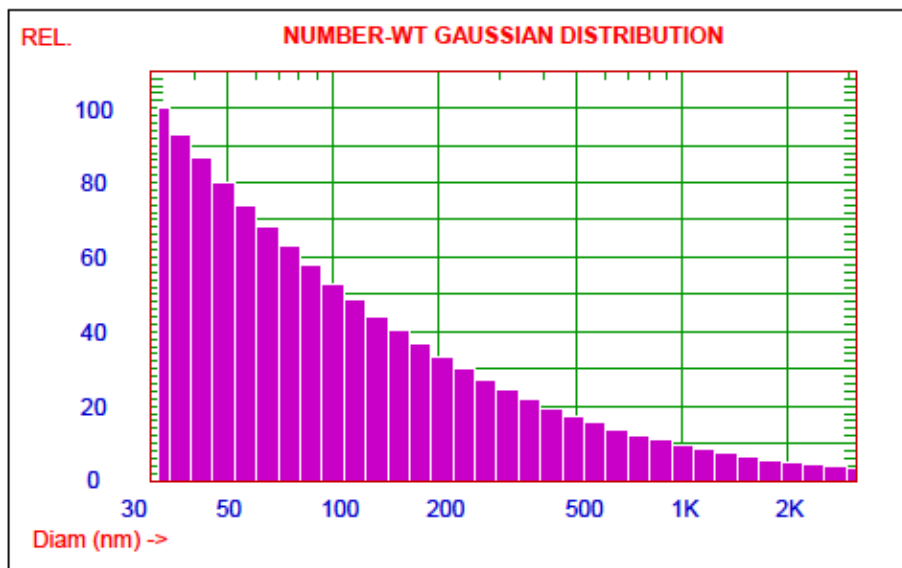
Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

**NUMBER-Weighted GAUSSIAN DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter	= 35.4 nm	Variance (P.I.)	= 9.175
Std. Deviation	= 107.3 nm (302.9%)	Chi Squared	= 5.037
Norm. Std. Dev.	= 3.029	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Var'n)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 1.47E-008 cm <sup>2</sup> /s



test.227

**Cumulative Result:**

25 % of distribution < 9.3 nm  
50 % of distribution < 35.4 nm  
75 % of distribution < 76.2 nm  
90 % of distribution < 154.1 nm  
99 % of distribution < 298.7 nm  
80 % of distribution < 93.3 nm

Run Time	= 0 Hr 6 Min 10 Sec	Wavelength	= 632.8 nm
Count Rate	= 47 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 1.8 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 5.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333

**Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA**

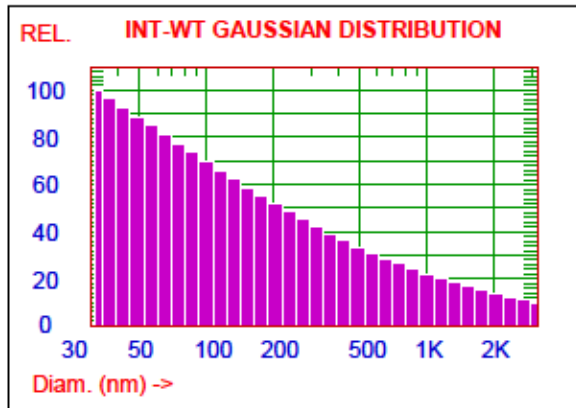
NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

**INT/VOL-Weighted GAUSSIAN DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

<i>Fit Error</i>	= 3513.97	<i>Residual</i>	= 36.60
<i>Chi Squared</i>	= 5.04	<i>Baseline Adj.</i>	= 0.00 %
<i>Run Time</i>	= 0 Hr 6 Min 10 Sec	<i>Wavelength</i>	= 632.8 nm
<i>Count Rate</i>	= 47 KHz	<i>Temperature</i>	= 23 deg C
<i>Channel #1</i>	= 1.8 K	<i>Viscosity</i>	= 0.933 cp
<i>Channel Width</i>	= 5.0 uSec	<i>Index of Ref.</i>	= 1.333

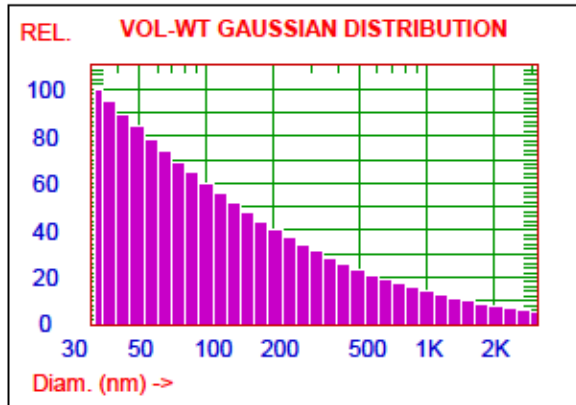


**Intensity Weighting:**

*Mean Diameter* = 316.1 nm  
*Std Deviation* = 957.5 nm (302.90 %)

**Cumulative Result:**

25 % of distribution < 83.0 nm  
50 % of distribution < 316.1 nm  
75 % of distribution < 680.1 nm  
90 % of distribution < 1375.2 nm  
99 % of distribution < 2666.3 nm  
80 % of distribution < 832.8 nm



**Volume Weighting:**

*Mean Diameter* = 94.3 nm  
*Std Deviation* = 285.7 nm (302.90 %)

**Cumulative Result:**

25 % of distribution < 24.8 nm  
50 % of distribution < 94.3 nm  
75 % of distribution < 202.9 nm  
90 % of distribution < 410.3 nm  
99 % of distribution < 795.4 nm  
80 % of distribution < 248.4 nm

Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

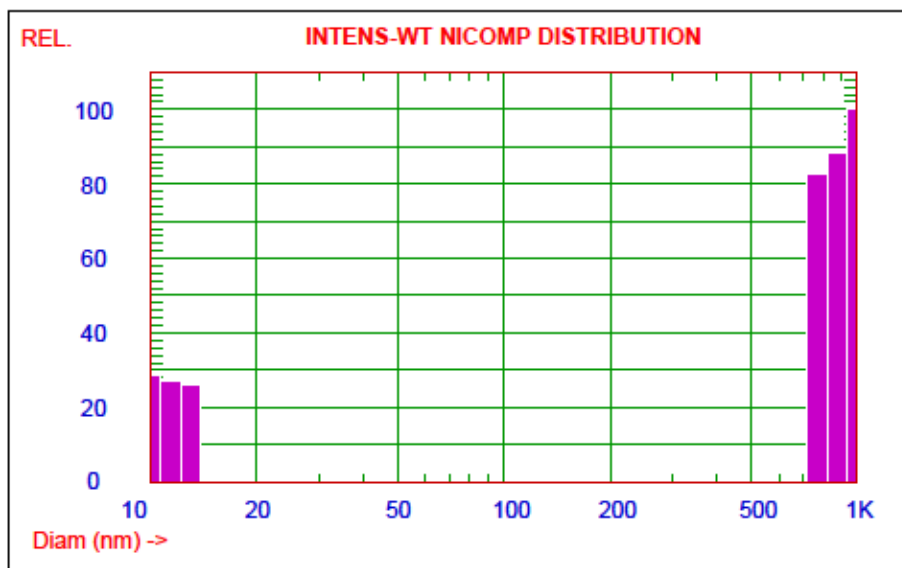
Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

**INTENSITY-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam.= 11.4 nm, S.Dev.= 1.6 nm (13.9%) Intens.= 22.2 %

Peak #2: Mean Diam.= 889.4 nm, S.Dev.= 99.4 nm (11.2%) Intens.= 77.8 %



test.227

Mean Diameter = 685.4 nm Fit Error = 3513.970 Residual = 36.600

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 36  
Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter	= 316.1 nm	Variance (P.I.)	= 9.175
Std. Deviation	= 957.5 nm (302.9%)	Chi Squared	= 5.037
Norm. Std. Dev.	= 3.029	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Var'n)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 1.47E-008 cm <sup>2</sup> /s
Run Time	= 0 Hr 6 Min 10 Sec	Wavelength	= 632.8 nm
Count Rate	= 47 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 1.8 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 5.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333



Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

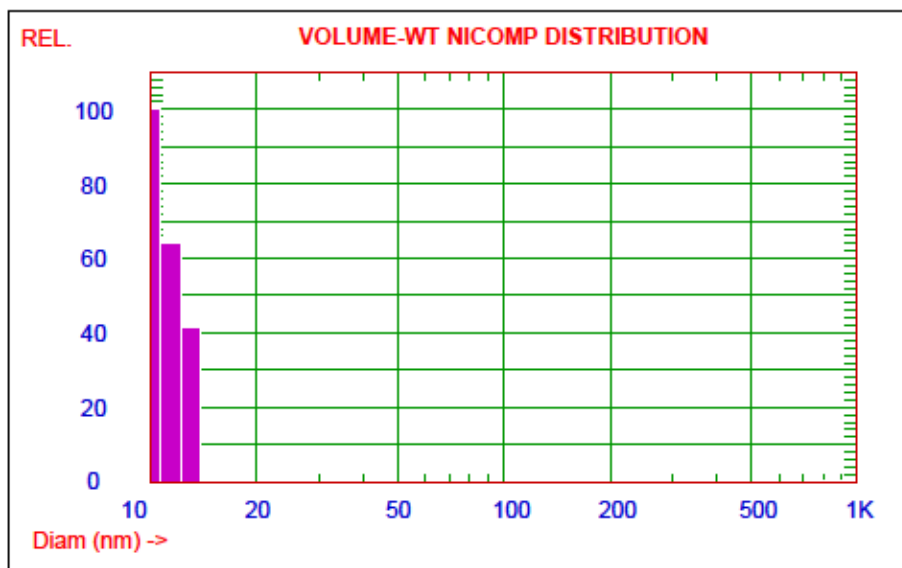
Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

**VOLUME-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam.= 11.0 nm, S.Dev.= 1.0 nm (9.2%) Vol= 99.9 %

Peak #2: Mean Diam.= 881.8 nm, S.Dev.= 101.0 nm (11.5%) Vol= 0.1 %



test.227

Mean Diameter = 12.3 nm Fit Error = 3513.970 Residual = 36.600

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 36

Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter = 94.3 nm

Std. Deviation = 285.7 nm (302.9%)

Norm. Std. Dev. = 3.029

(Coeff. of Var'n)

Run Time = 0 Hr 6 Min 10 Sec

Count Rate = 47 KHz

Channel #1 = 1.8 K

Channel Width = 5.0 uSec

Variance (P.I.) = 9.175

Chi Squared = 5.037

Baseline Adj. = 0.000 %

Z-Avg. Diff. Coeff. = 1.47E-008 cm<sup>2</sup>/s

Wavelength = 632.8 nm

Temperature = 23 deg C

Viscosity = 0.933 cp

Index of Ref. = 1.333

Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

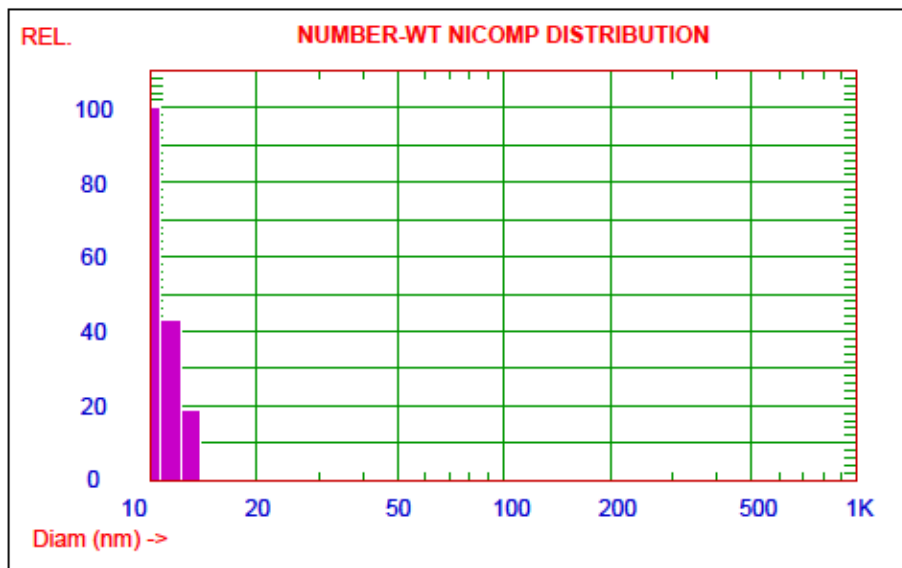
Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

**NUMBER-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**NICOMP SUMMARY:**

Peak #1: Mean Diam.= 10.7 nm, S.Dev.= 1.1 nm (10.7%) Num= 100.0 %



test.227

Mean Diameter = 10.7 nm Fit Error = 3513.970 Residual = 36.600

**NICOMP SCALE PARAMETERS:**

Min. Diam. = 10 nm Plot Size = 36

Smoothing = 3 Plot Range = 100

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter = 35.4 nm

Std. Deviation = 107.3 nm (302.9%)

Norm. Std. Dev. = 3.029

(Coeff. of Var'n)

Run Time = 0 Hr 6 Min 10 Sec

Count Rate = 47 KHz

Channel #1 = 1.8 K

Channel Width = 5.0 uSec

Variance (P.I.) = 9.175

Chi Squared = 5.037

Baseline Adj. = 0.000 %

Z-Avg. Diff. Coeff. = 1.47E-008 cm<sup>2</sup>/s

Wavelength = 632.8 nm

Temperature = 23 deg C

Viscosity = 0.933 cp

Index of Ref. = 1.333

**Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA**

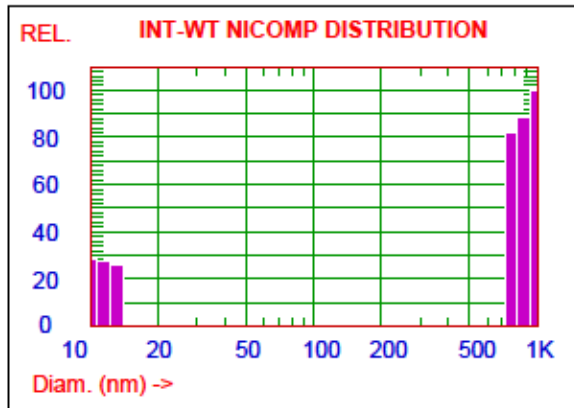
NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

**INT/VOL-Weighted NICOMP DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

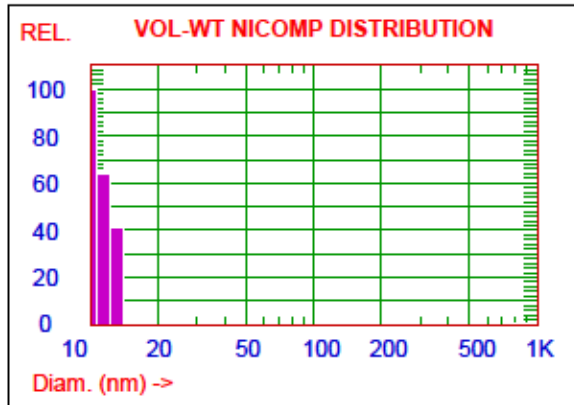
<i>Fit Error</i>	= 3513.97	<i>Residual</i>	= 36.60
<i>Chi Squared</i>	= 5.04	<i>Baseline Adj.</i>	= 0.00 %
<i>Run Time</i>	= 0 Hr 6 Min 10 Sec	<i>Wavelength</i>	= 632.8 nm
<i>Count Rate</i>	= 47 KHz	<i>Temperature</i>	= 23 deg C
<i>Channel #1</i>	= 1.8 K	<i>Viscosity</i>	= 0.933 cp
<i>Channel Width</i>	= 5.0 uSec	<i>Index of Ref.</i>	= 1.333



**Intensity Weighting:**

	Peak 1	Peak 2	Peak 3
<i>Mean Diam.(nm)</i>	11.4	889.4	---
<i>Std Dev. (nm)</i>	1.6	99.4	---
<i>C. V.(%)</i>	13.88	11.18	---
<i>Percent (%)</i>	22.24	77.76	---

*Min. Diam. = 10 Plot Size = 36*  
*Smoothing = 3 Plot Range = 100*



**Volume Weighting:**

	Peak 1	Peak 2	Peak 3
<i>Mean Diam.(nm)</i>	11.0	881.8	---
<i>Std Dev. (nm)</i>	1.0	101.0	---
<i>C. V.(%)</i>	9.23	11.45	---
<i>Percent (%)</i>	99.90	0.10	---

**Anexo 07.** Fotografías de la caracterización de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  con el SEM.



*Fotografía 12. NPs-TiO<sub>2</sub>-A015 marca mKNANO adquiridas de la empresa M.K Impex Corporation, Div. mKNANO de Canadá.*



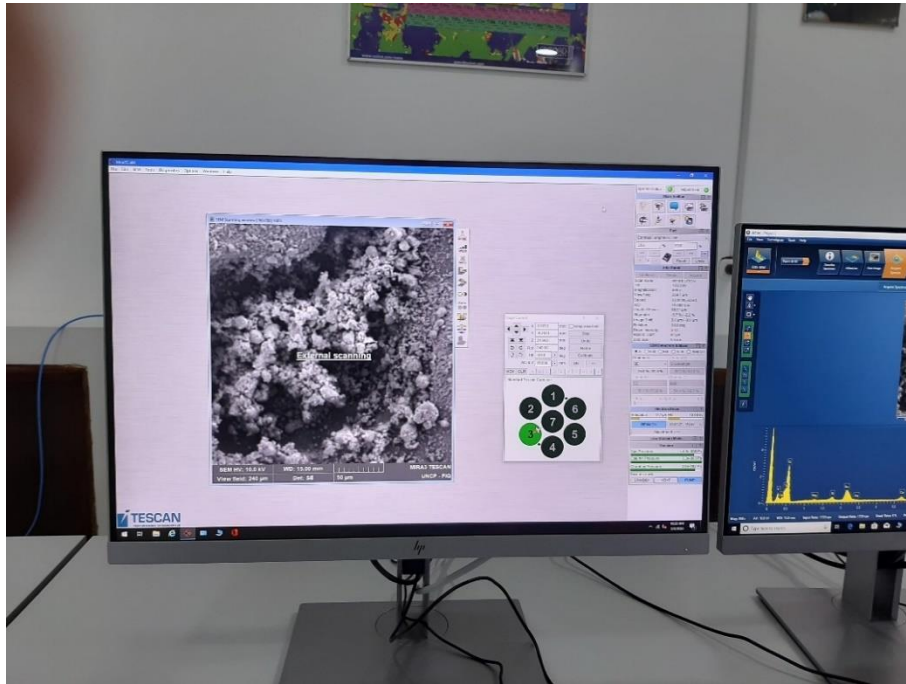
*Fotografía 13. Metalización de las muestras de NPs-TiO<sub>2</sub> para el análisis en el SEM.*



Fotografía 14. Muestras preparadas para el análisis de morfología, estructura y composición en el SEM.



Fotografía 15. Ingreso de las muestras al equipo SEM.



Fotografía 16. Mapeo para la determinación de la morfología y estructura del  $\text{TiO}_2$  en el equipo SEM.



Fotografía 17. Mapeo de la muestra para la determinación de la composición de la muestra de  $\text{TiO}_2$  en el equipo SEM.



**Anexo 08.** Resultados del tiempo de contacto y concentración de NPs-TiO<sub>2</sub> con las bacterias *E. coli*.

Resultados para la concentración de nanopartículas de 10 ppm

Tiempo (min)	Concentración TiO <sub>2</sub> (ppm)	Primer conteo	Segundo conteo	Promedio del conteo
		Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)
0	10	100 000	100 000	100 000
60	10	84 250	82 550	83 400
120	10	65 480	64 520	65 000
180	10	36 300	42 300	39 300
720	10	1 240	440	840

Fuente: elaboración propia.

Resultados para la concentración de nanopartículas de 40 ppm

Tiempo (min)	Concentración TiO <sub>2</sub> (ppm)	Primer conteo	Segundo conteo	Promedio del conteo
		Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)
0	40	100 000	100 000	100 000
60	40	86 990	87 410	87 200
120	40	77 120	75 280	76 200
180	40	48 600	50 800	49 700
720	40	4 950	4 450	4 700

Fuente: elaboración propia.

### Resultados para la concentración de nanopartículas de 70 ppm

Tiempo (min)	Concentración TiO <sub>2</sub> (ppm)	Primer conteo	Segundo conteo	Promedio del conteo
		Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)
0	70	100 000	100 000	100 000
60	70	95 230	94 570	94 900
120	70	82 700	79 700	81 200
180	70	63 410	65 190	64 300
720	70	7 530	7 670	7 600

Fuente: elaboración propia.

### Resultados para la concentración de nanopartículas de 100 ppm

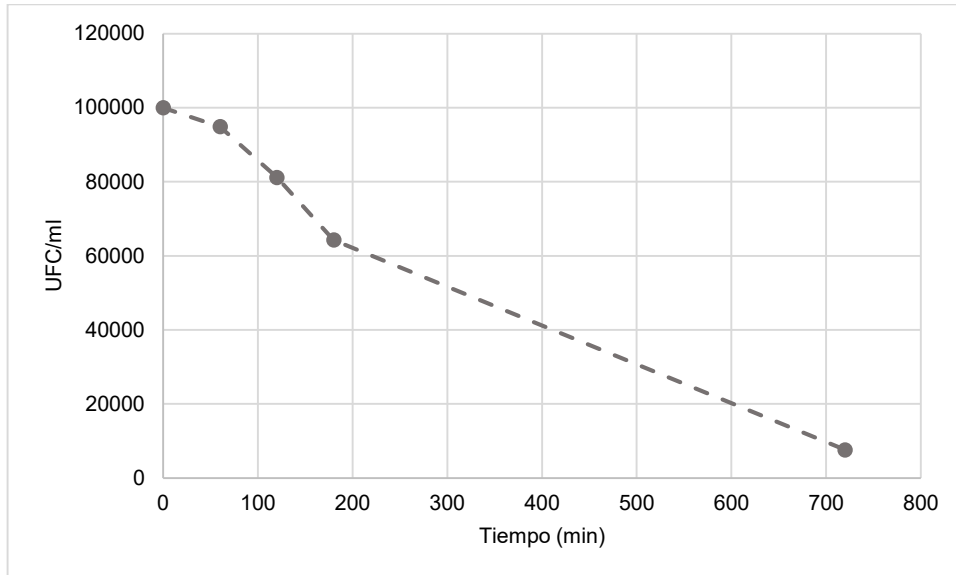
Tiempo (min)	Concentración TiO <sub>2</sub> (ppm)	Primer conteo	Segundo conteo	Promedio del conteo
		Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)	Bacterias <i>E. coli</i> (UFC/ml)
0	100	100 000	100 000	100 000
60	100	99 110	100 090	99 600
120	100	90 560	88 440	89 500
180	100	76 910	74 290	75 600
720	100	9 480	12 920	11 200

Fuente: elaboración propia.



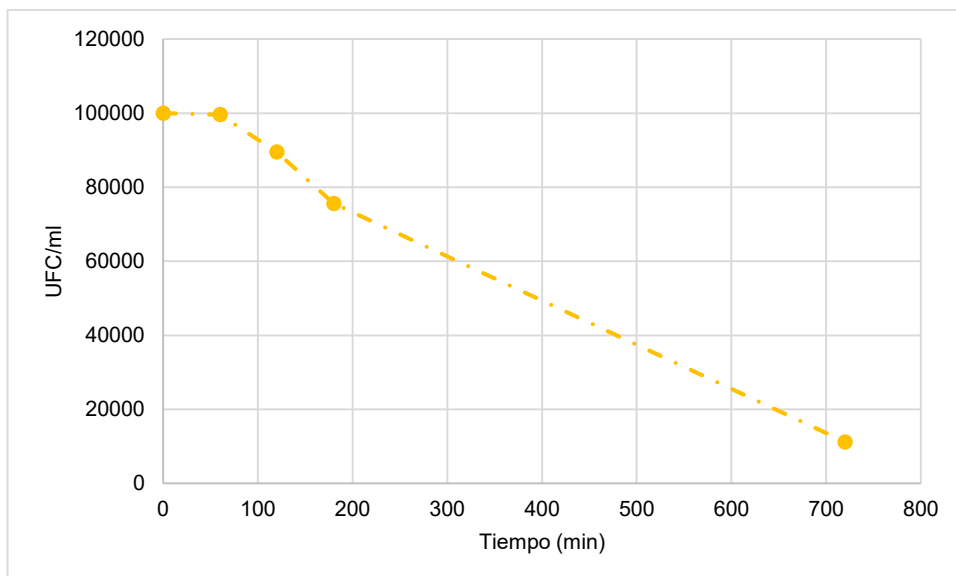
**Anexo 09.** Gráficas del tiempo de contacto y concentración de NPs-TiO<sub>2</sub> con las bacterias *E. coli*.

**Gráfico 01.** Comportamiento de la toxicidad de la concentración de 70 ppm de NPs-TiO<sub>2</sub>.



Fuente: elaboración propia.

**Gráfico 02.** Comportamiento de la toxicidad de la concentración de 100 ppm de NPs-TiO<sub>2</sub>.



Fuente: elaboración propia.

**Anexo 10.** Certificados y constancias de calibración de los instrumentos.

*Certificado de análisis del equipo DLS.*

Certified reference value  
Mean value = -57 +/- 10 mV  
or -51 to -62 mV  
IEP = 4.2



Particle Sizing Systems  
An Entegris Company



## Certificate of Analysis Zeta Reference Standard (ZRS)

### Description of Material

Powder substance that contains corn syrup solids, partially hydrogenated soybean, coconut, or palm kernel oil, sodium caseinate, mono- and diglycerides, dipotassium phosphate, and sodium aluminosilicate

**Batch/Lot Number**  
080995

### Intended Use

Used as a Zeta Potential reference standard for validating the Nicomp Zeta Potential line of analytical instrumentation.

### Instruction for CRM Use

Place 0.05g of the ZRS sample in 100 mL DI water and stir for 3 minutes. Measure the pH of the prepared sample to verify that the pH is between about 6-7. Note: this sample is an emulsion and will only be stable enough for use in verification for ~3 hours. After this time a new standard should be prepared.

Inject about 3 mL of sample into a standard disposable cell. Insert the zeta potential electrode and wipe any liquid that drips onto the external cell windows. Assure there are no bubbles between the electrodes. Connect the standard cable (not HV) to the electrode and place the cell in the instrument so that the cable is on the back side of the instrument.

### Instrument Settings

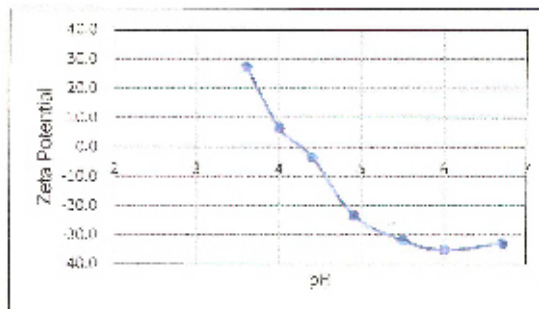
Configure the software for zeta potential measurements. Set up the zeta potential control menu as shown below:

Temperature	23 C
Viscosity	0.933 CP
Refractive index	1.333
External fiber angle	-19 deg
Scattering angle	-14.1366 deg
Phase Analysis (PALS)	checked on
Dielectric constant	78.5
Electrode spacing	0.4 cm
E-Field strength	4 V/cm
Smoluchowski Limit	checked on

Make at least three five minute measurements and print each run. Calculate the average of the three runs.

### Certified Values and Uncertainties

Mean value = -40 +/- 10 mV  
or -30 to -60 mV  
Isoelectric point (IEP): pH 4.2



Particle Sizing Systems – an Entegris Company

8203 Kristel Circle  
Port Richey, FL 34668  
T: 727.346.0865  
F: 727.346.0835  
[www.psssi.com/p.com](http://www.psssi.com/p.com)



**Date of Certification**  
July 2019

**Period of Validity**  
Until February 2021

**MSDS Information**

The Particle Sizing Systems Zeta Reference Standard (ZRS) is a food product originally packaged to be sold in a retail environment. For this reason, the ZRS sample does not require a Material Safety Data Sheet (MSDS). Please see this reference:

Title: 04-07-1998 - The HCS does not apply to food items in a retail establishment.	
Record Type: Interpretation	Standard Number: 1910.1200; 1926.59
Title: 04-07-1998 - The HCS does not apply to food items in a retail establishment.	
Record Type: Interpretation	Standard Number: 1910.1200; 1926.59

**Exemptions**

\*Food or alcoholic beverages which are sold, used or prepared in a retail establishment (e.g., a grocery store, restaurant or drinking places) are exempt from the provisions of the HCS. Food items such as peanut butter or nutmeg therefore are not covered under the Hazard Communication Standards (HCS). Furthermore, MSDGs are not required by the HCS if the "chemical" is not hazardous as defined by the standard.\*

In addition, the quantity used is too small (0.05 g) to pose any risk to a chemist following the preparation procedure.

**Names and Signatures of Certifying Officers**

---

**Name of Certifying Officer**      **Mark R. Bumiller**

---

**Signature of Certifying Officer**      *Mark R. Bumiller*

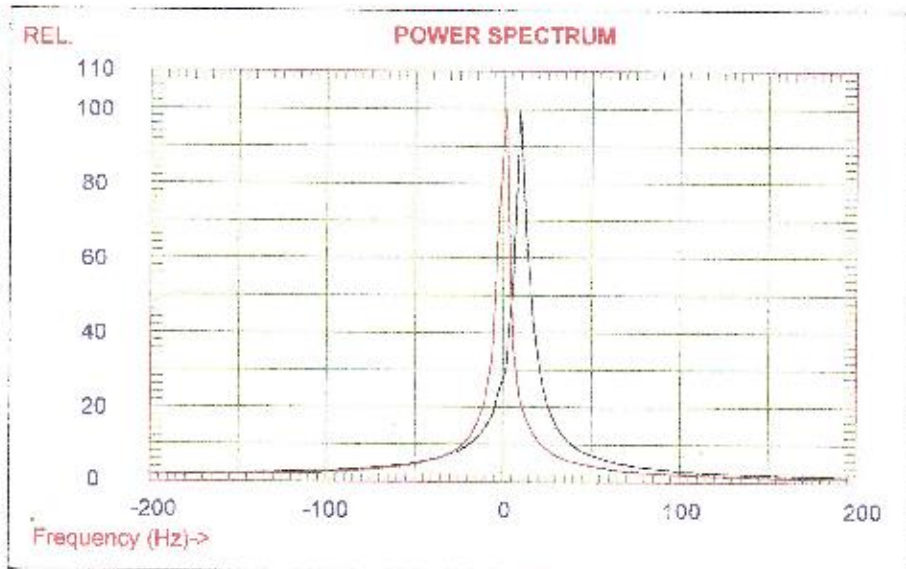
---

Particle Sizing Systems – an Entegris Company  
8203 Kristel Circle  
Port Richey, FL 34688  
T: 727-846-0866  
F: 727-846-0865  
[www.pszinc.com](http://www.pszinc.com)

Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

#1912305, ZRS Freq Mode

Data File: C:\Nicomp Test Data\ZRS Freq.401 10:13:3 12/18/2019



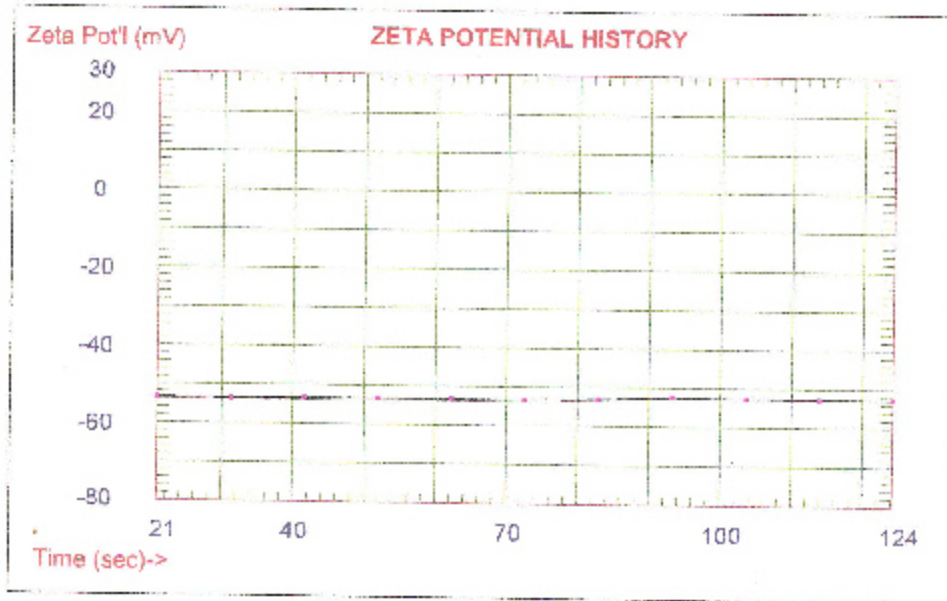
— Sample      - - - Reference

Sample Frequency:	271.06 Hz
Reference Frequency:	260.08 Hz
Cell Current:	0.10 mA (Cond. Factor = 1.87)
Frequency Shift:	10.98 Hz
Avg. Mobility:	-5.17 M.U.
Half-Width Mobility Dist.	----
Avg. Zeta Potential:	-69.35 mV
Half-Width Zeta Pot'l Dist.	----
Sample Temperature:	23 C
Liquid Viscosity:	0.933 cPoise
Index of Refraction:	1.333
Dielectric Constant:	78.500
Laser Wavelength:	639.0 nm
Scattering Angle:	-14.1 deg.
E-Field Strength:	8.00 V/CM
Channel Width:	500.0 uSec.
Run Time:	00:02:07

Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

#1912305, ZRS PALS Mode

Data File: C:\Nicomp Test Data\ZRS PALS.402 10:13:3 12/18/2019



Sample Frequency:	---
Reference Frequency:	---
Cell Current:	0.07 mA (Cond.Factor = 1.12)
Avg. Phase Shift:	43.64 rad/sec.
Avg. Mobility:	-3.93 M.U.
Half-Width Mobility Dist.	---
Avg. Zeta Potential:	-52.71 mV
Half-Width Zeta Pot'l Dist.	---

Sample Temperature:	23 C
Liquid Viscosity:	0.933 cPoise
Index of Refraction:	1.333
Dielectric Constant:	78.500
Laser Wavelength:	639.0 nm
Scattering Angle:	-14.1 deg.
E-Field Strength:	4.00 V/CM
Channel Width:	500.0 uSec.
Run Time:	00:02:04



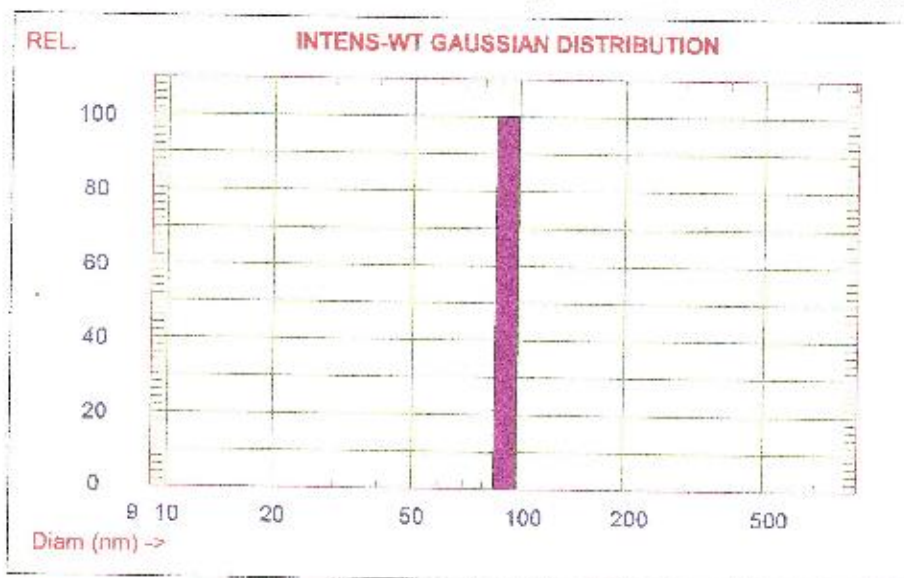
Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

Z3000 #1912305, 92nm NIST, 10mmol NaCl, Cuvette  
Data File: C:\Nicomp Test Data\Cuvette 92nm NaCl 170 Deg.301 16.41:21 12/17/2019

**INTENSITY-Weighted GAUSSIAN DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter	= 92.5 nm	Variance (P.I.)	= 0.001
Std. Deviation	= 2.8 nm (3.0 %)	Chi Squared	= 0.561
Norm. Std. Dev.	= 0.030	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Var'n)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 5.02E-008 cm <sup>2</sup> /s



Cuvette 92nm NaCl 170 Deg.301

**Cumulative Result:**

25 % of distribution <	90.6 nm
50 % of distribution <	92.5 nm
75 % of distribution <	94.4 nm
90 % of distribution <	96.1 nm
99 % of distribution <	99.1 nm
80 % of distribution <	94.8 nm

Run Time	= 0 Hr 5 Min 2 Sec	Wavelength	= 639.0 nm
Count Rate	= 325 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 85.2 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 5.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333

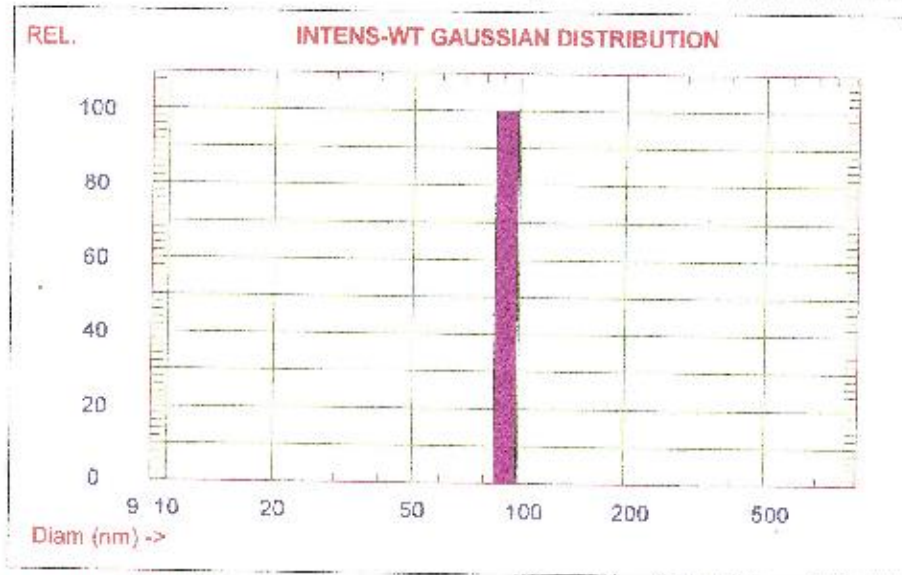
Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

Z3000 #1912305, 92nm NIST, 10mmol NaCl, Round  
Data File: C:\Nicom Test Data\Round 92nm NaCl.302 17:26.8 12/16/2019

**INTENSITY-Weighted GAUSSIAN DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter	= 92.0 nm	Variance (P.I.)	= 0.000
Std. Deviation	= 1.7 nm (1.9 %)	Chi Squared	= 0.376
Norm. Std. Dev.	= 0.019	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Var'n)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 5.05E-008 cm <sup>2</sup> /s



Round 92nm NaCl.302

**Cumulative Result:**

25 % of distribution < 90.8 nm  
50 % of distribution < 92.0 nm  
75 % of distribution < 93.1 nm  
90 % of distribution < 94.2 nm  
99 % of distribution < 96.1 nm  
80 % of distribution < 93.4 nm

Run Time	= 0 Hr 5 Min 3 Sec	Wavelength	= 639.0 nm
Count Rate	= 318 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 179.9 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 10.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333



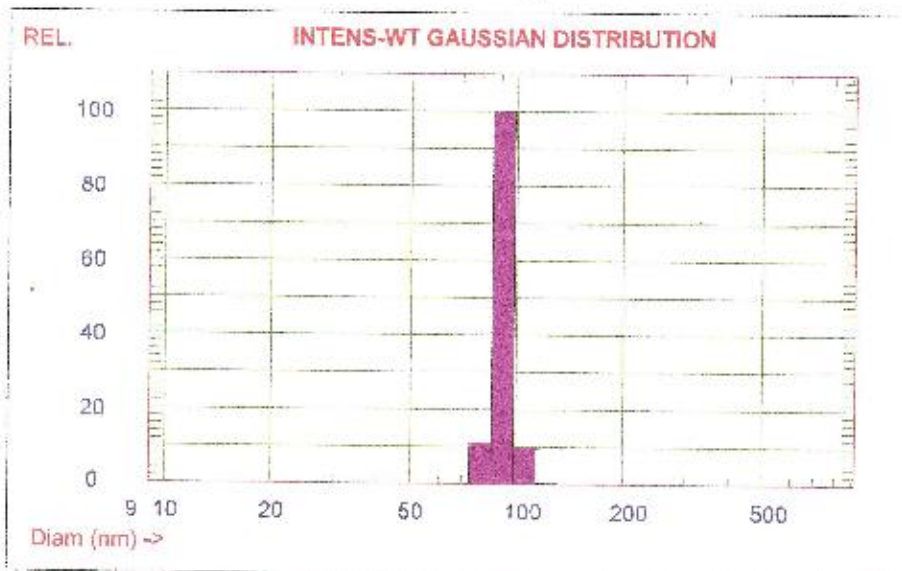
Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA

Z3000 #1912305, 92nm NIST, 10mmol NaCl, Cuvette  
Data File: C:\Nicom Test Data\Cuvette 92nm NaCl 90 Deg.302 15:55:10 12/17/2019

**INTENSITY-Weighted GAUSSIAN DISTRIBUTION Analysis (Solid Particle)**

**GAUSSIAN SUMMARY:**

Mean Diameter	= 91.7 nm	Variance (P.I.)	= 0.004
Strid. Deviation	= 6.1 nm (6.7 %)	Chi Squared	= 0.411
Norm. Stnd. Dev.	= 0.067	Baseline Adj.	= 0.000 %
(Coeff. of Varn)		Z-Avg. Diff. Coeff.	= 5.07E-008 cm <sup>2</sup> /s



Cuvette 92nm NaCl 90 Deg.302

**Cumulative Result:**

25 % of distribution < 87.6 nm  
50 % of distribution < 91.7 nm  
75 % of distribution < 95.8 nm  
90 % of distribution < 99.8 nm  
99 % of distribution < 107.0 nm  
80 % of distribution < 96.9 nm

Run Time	= 0 Hr 5 Min 2 Sec	Wavelength	= 639.0 nm
Count Rate	= 299 KHz	Temperature	= 23 deg C
Channel #1	= 158.0 K	Viscosity	= 0.933 cp
Channel Width	= 10.0 uSec	Index of Ref.	= 1.333

*Protocolo de instalación SEM y EDS.*

## INSTALLATION AND CUSTOMER ACCEPTANCE PROTOCOL

---

### MIRA3

Installed at (Company): Universidad Nacional del Centro del Perú

Customer contact name: Ingeniero Ever Ingaruca

Contact tel./email: [eingaruca@uncp.edu.pe](mailto:eingaruca@uncp.edu.pe) +51964585621

Installation dates (start/end): 04/30/2019 – 05/09/2019

Microscope type (and other installed devices): Mira 3 LMU

Microscope serial number (and other installed devices): SN 118-0191

Installation engineer: Daniel Richter / Tescan do Brasil

#### After delivery check, installation, performance checks:

1. Microscope and other installed devices are delivered complete according to the order and without visible damage (shock detectors not activated).....[X]
2. Microscope accessories is complete: .....[X]
3. Microscope vacuum level after delivery: .....4000 Pa
4. Visual check of the sample stage and calibration test: .....[X]
5. Set PC correct time and time zone: .....[X]
6. Disconnect UPS and check UPS status in the Health Status Panel: .....[X]
7. Bake-out and emission start performed according to the Service Manual:.....[X]

#### Performance status after installation:

8. Microscope suspension adjusted (once all 3<sup>rd</sup> party products have been installed) .....[X]
9. N2 and pneumatic suspension leak test: .....[X]
10. RBSE alignment check (vertical, horizontal etc.): .....[N/A]
11. Vacuum leak test of the system (Average overnight pressures while microscope was off): .....70Pa
12. Switching between HiVac/UniVac mode operation tested: .....[X]
13. LVSTD functionality (LVSTD Ready) check: .....[X]
14. SEMresolution test .....[X]
15. SEM magnification calibration test .....[X]
16. List of tested detectors:
  - Detector name: SE [X]
  - Detector name: InbeamSE [X]
  - Detector name: BSE [X]
  - Detector name: LVSTD [X]
  - Detector name: STEM [X]
17. Automated/Manual loadlock loads/unloads sample on air and vacuum as well: .....[X]

## INSTALLATION AND CUSTOMER ACCEPTANCE PROTOCOL

---

### MIRA3

Installed at (Company): Universidad Nacional del Centro del Perú

Customer contact name: Ingeniero Ever Ingaruca

Contact tel./email: [eingaruca@uncp.edu.pe](mailto:eingaruca@uncp.edu.pe) +51964585621

Installation dates (start/end): 04/30/2019 – 05/09/2019

Microscope type (and other installed devices): Mira 3 LMU

Microscope serial number (and other installed devices): SN 118-0191

Installation engineer: Daniel Richter / Tescan do Brasil

#### After delivery check, installation, performance checks:

1. Microscope and other installed devices are delivered complete according to the order and without visible damage (shock detectors not activated).....[X]
2. Microscope accessories is complete: .....[X]
3. Microscope vacuum level after delivery: .....4000 Pa
4. Visual check of the sample stage and calibration test: .....[X]
5. Set PC correct time and time zone: .....[X]
6. Disconnect UPS and check UPS status in the Health Status Panel: .....[X]
7. Bake-out and emission start performed according to the Service Manual:.....[X]

#### Performance status after installation:

8. Microscope suspension adjusted (once all 3<sup>rd</sup> party products have been installed) .....[X]
9. N2 and pneumatic suspension leak test: .....[X]
10. RBSE alignment check (vertical, horizontal etc.): .....[N/A]
11. Vacuum leak test of the system (Average overnight pressures while microscope was off): .....70Pa
12. Switching between HiVac/UniVac mode operation tested: .....[X]
13. LVSTD functionality (LVSTD Ready) check: .....[X]
14. SEMresolution test .....[X]
15. SEM magnification calibration test .....[X]
16. List of tested detectors:
  - Detector name: SE [X]
  - Detector name: InbeamSE [X]
  - Detector name: BSE [X]
  - Detector name: LVSTD [X]
  - Detector name: STEM [X]
17. Automated/Manual loadlock loads/unloads sample on air and vacuum as well: .....[X]

**Particle Sizing Systems, Inc.  
Santa Barbara, Calif., USA**

NPs TiO 0.01 PRUEBA 2

Menu File: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\zpw388.tbl 18:42:8 2/18/2020

Data Saved: C:\Particle Sizing Systems\ZPW388-V2.18\s\_data\test.227

-Run time-	-Data Ch 1-	-Avg Intensity-	-Sensitivity-					
0Hr 6Min 10Sec	1.8K	47.0kHz	150					
Gaussian Analysis — Solid Particle — NICOMP Analysis								
Mean Dia	Std Dev	Chi Sq	Base Adj	Peak 1	Peak 2	Peak 3		
VOL: 94.3 nm	285.7 nm	5.04	0.00 %	11.0	881.8	—	Fit Error	
	302.9 %			99.9 %	0.1 %	—	3513.970	
INT: 316.1 nm	957.5 nm	5.04	0.00 %	11.4	889.4	—	Residual	
	302.9 %			22.2 %	77.8 %	—	36.600	
NUM: 35.4 nm	107.3 nm	5.04	0.00 %	10.7	—	—		
	302.9 %			100.0 %	—	—		

**Anexo 11.** Documentos utilizados para el traslado de las muestras al laboratorio.



ANEXO I  
REGISTRO DE DATOS DE CAMPO

CUENCA: HIDROGRAFICA MAJABO REALIZADO POR: KATHERINE GARCIA INCAHUA 1030

AAA/ALA: MAJABO RESPONSABLE: \_\_\_\_\_

Punto de monitoreo	Descripción Origen/ubicación	Localidad	Distrito	Provincia	Departamento	Coordenadas		Altura mnm	Fecha	Hora	pH	T °C	OD mg/L	COND µS/cm	Caudal/Pro fundidad m <sup>3</sup> /s o m	Observaciones
						Norte/Sur	Este/Oeste									
MS-01	SALIDA - PISAR	ALCAS	SIAYA	HUANUCO	SIAYA	8670127	0970621	3232	11-12-19	9:00	7.10	12	3.6			

ANEXO II  
ETIQUETA PARA MUESTRA DE AGUA



Solicitante/cliente: <i>KATHERINE GUDIA INIGARUCA LAZO</i>		Solicitante/cliente:	
Nombre del laboratorio: <i>HANDELASOLDETA - UNCF</i>		Nombre del laboratorio:	
Código punto de monitoreo: <i>AS-01</i>		Código punto de monitoreo:	
Tipo de cuerpo de agua: <i>AGUA RESIDUAL TRATADA</i>		Tipo de cuerpo de agua:	
Fecha de monitoreo: <i>11/12/19</i>	Hora: <i>9:00</i>	Fecha de monitoreo:	Hora:
Muestreado por: <i>KATHERINE GUDIA INIGARUCA LAZO</i>		Muestreado por:	
Parámetro requerido: <i>MICROBIOLOGIA</i>		Parámetro requerido:	
Preservada:	SI	NO	Tipo reactivo:





ANEXO VII  
**CONSERVACIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRA DE AGUA EN FUNCIÓN DEL  
 PARÁMETRO EVALUADO**



PARÁMETRO	TIPO DE RECIPIENTE	CONDICIONES DE PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO	TIEMPO MÁXIMO DE ALMACENAMIENTO
<b>Microbiológicos</b>			
Coliformes Termotolerantes	Vidrio estéril	Dejar un espacio para aireación y mezcla de 1/3 del frasco de muestreo. Almacenar a $\leq 6^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad	24 horas
Coliformes Totales			
Enterococos			
Fecales			
Escherichia Coli			
Giardia Duodenalis			
Salmonella sp.			
Vibrio Cholerae			
Formas parasitarias	Plástico, con boca ancha	Almacenar a $\leq 6^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad	24 horas
Huevos de helmintos			

**Anexo 12.** Costo del tratamiento con nanopartículas de dióxido de titanio en la desinfección de bacterias *E. coli* para aguas residuales municipales tratadas.

Costos totales anualizados del tratamiento con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

Caudal (mg/d)		Costos estimados de inversión (dólares)					
PPTS	MPLL	Dosis de TiO <sub>2</sub> (mg/l)	Desinfección	Descloración	Tratamiento de sólidos	Total	Estimado de O/M
1	2.25	2	180 000		60 000	280 000	13 100

Nota: mg/d = miligramos por día; PPTS = promedio de períodos de tiempo seco; MPLL = máximos de períodos de lluvia.

Fuente: elaboración propia.