



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ingeniería

Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

“Eliminación de *Escherichia coli* en sistemas de captación de agua estancada a partir de geomembranas impregnadas con nanopartículas metálicas”

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en Tecnología y Gestión del Agua

Presenta:

Ing. Karla Lucely Sánchez Alvarez

Asesor:

Dra. Marisol Gallegos García



Agradecimientos

A mi familia, pareja, profesores y amigos por apoyarme en este proceso.

Gracias a la Dra. Marisol Gallegos García y a la Dra. Zoe Quiñones Jurado por guiarme en este proceso y compartir conmigo sus conocimientos así como sus experiencias.

Al Ing. Héctor Isidoro Solís Torres, encargado de los análisis de Espectroscopia de Absorción Atómica en el laboratorio de Análisis de Agua de la UASLP.

Al Técnico Académico. M.C. Claudia Gpe. Elías Alfaro, encargada del laboratorio Microscopía de Transmisión, del Instituto de Metalurgia de la UASLP.

A la Dra. María Elena García Arreola, encargada del Laboratorio de Análisis de Agua de Ciencias de la Tierra de la UASLP.

A la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado coordinadora de LINAN, división de materiales avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

A la empresa Polynnova, Centro de Innovación y Desarrollo de Estudios Avanzados, por el apoyo durante la realización de este proyecto.

Al Ing. Fernando Rodríguez Juárez, responsable del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) en el Instituto de Metalurgia de la UASLP.

Finalmente, gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada bajo el folio 791179, para realizar mis estudios en la Maestría de Tecnología y Gestión de Agua.

Resumen

La desinfección, es esencial en el proceso de potabilización del agua, para eliminar microorganismos patógenos y evitar infecciones de origen hídrico. Entre los principales microorganismos a eliminar se encuentra *Escherichia coli*, el cual es el principal causante de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA), y de la muerte de seis millones de habitantes al año. Actualmente, existen diferentes técnicas de desinfección, entre las cuales se ha identificado el uso de nanopartículas (Nps) de óxido de zinc (ZnO) y plata (Ag) soportadas en membranas o geomembranas poliméricas para el tratamiento de aguas. Estas nanopartículas poseen propiedades bactericidas frente a *E. coli* a bajas concentraciones, y tienen un efecto residual prolongado si se aplican en diferentes materiales. Con base a lo anterior, surge el presente estudio, el cual tiene como objetivo evaluar la desinfección de *E. coli* en sistemas de captación de agua, a partir de geomembranas impregnadas con Nps metálicas. En primera instancia, se analizó la eficiencia bactericida frente a *E. coli*, de cinco geomembranas de polietileno impregnadas con Nps de ZnO y Ag. La geomembranas fueron Silver plus 200 2E, Silver Plus 200 2PP, Silver Plus 500 PP, Silver Plus 1000 PP y PE4F2 400. La cuantificación del crecimiento se realizó con la escala de Mc Farland, se determinaron los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Se evaluó el desempeño bactericida de la geomembrana a 30°C, 40°C y 50°C simulando un agua estancada en diferentes ambientes. La liberación de ZnO y Ag se analizó mediante espectroscopia de absorción atómica (EAA). Finalmente, se evaluó por microscopio óptico y microscopía electrónica de barrido (MEB) la adherencia de *E. coli* sobre la geomembrana. Los resultados muestran que la geomembrana Silver Plus 200 2E fue la mejor, al eliminar el 99% de *E. coli* a una concentración de 60.93 mg/L de ZnO y 2.61 mg/L de Ag. El valor de CMI se identificó a 15 mg/L de ZnO y 0.37 mg/L de Ag, mientras que el valor de CMB se identificó a 60 mg/L ZnO y 2.61 mg/l de Ag. La variación de la temperatura indica que la geomembrana mantiene el efecto bactericida a las tres condiciones evaluadas. El estudio de EAA arroja un desprendimiento promedio de 0.2675 mg/L de ZnO y 0.005 mg/L de Ag durante ocho semanas de estudio, con lo cual se presume el efecto bactericida de las Nps puede durar hasta cinco años. Los análisis en el microscopio muestran la adherencia de *E. coli* en la geomembrana después de 40 días de tratamiento. El presente trabajo muestra que el uso de Nps metálicas soportadas en geomembranas, ejerce un efecto bactericida sobre *E. coli* a concentraciones menores reportadas a la literatura, por lo cual la aplicación de estos materiales es viable como método de desinfección de agua.

Abstract

Disinfection is essential in the process of purification of water, to eliminate pathogenic microorganisms and to avoid infections of water origin. Among the main microorganisms is *Escherichia coli*, which is the main cause of Acute Diarrheal Disease (ADD), and the death of six million inhabitants per year. Currently, there are different disinfection techniques, among which has been identified the use of nanoparticles (Nps) of zinc oxide (ZnO) and silver (Ag), supported in membranes or polymeric geomembranes for water treatment. These nanoparticles have bactericidal properties against *E. coli* at low concentrations, and have a prolonged residual effect if applied in different materials. Based on the above, the present study arises, which aims to evaluate the disinfection of *E. coli* in water collection systems, from geomembranes impregnated with metallic Nps. In the first instance, bactericidal efficiency was analyzed against *E. coli*, of five polyethylene geomembranes impregnated with Nps of ZnO and Ag. The geomembranes were Silver plus 200 2E, Silver plus 200 2PP, Silver plus 500 PP, Silver plus 1000 PP and PE4F2 400. The quantification of the growth was done with the Mc Farland scale, determined the values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The bactericidal performance of the geomembrane was evaluated at 30 ° C, 40 ° C and 50 ° C simulating standing water in different environments. The release of ZnO and Ag was analyzed by atomic absorption spectroscopy (EAA). Finally, the adhesion of *E. coli* on the geomembrane was evaluated by light microscopy and scanning electron microscopy (SEM).

The results show that Silver Plus 200 2E geomembrane was the best, eliminating 99% of *E. coli* at a concentration of 60.93 mg / L of ZnO and 2.61 mg / L of Ag. The MIC value was identified at 15 mg / L of ZnO and 0.37 mg / L of Ag, while the MBC value was identified at 60 mg / L ZnO and 2.61 mg / l of Ag. The variation in temperature indicates that the geomembrane maintains the bactericidal effect at three evaluated conditions. The EAA study shows an average release of 0.2675 mg / L of ZnO and 0.005 mg / L of Ag during eight weeks of study, which presumes the bactericidal effect of the Nps can last up to five years. The microscopic analysis shows the adherence of *E. coli* in the geomembrane after 40 days of treatment. The present work shows that the use of metal Nps supported in geomembranes, exerts a bactericidal effect on *E. coli* at lower concentrations reported in the literature, so the application of these materials is viable as a method of disinfection of water.

Índice

| | |
|--|----|
| Introducción | 11 |
| 1. Antecedentes de la problemática de <i>Escherichia coli</i> en agua..... | 14 |
| 1.1 Problemática de agua | 14 |
| 1.2 Primeras observaciones de enfermedades transmitidas por el agua..... | 16 |
| 1.3 <i>E. coli</i> característica generales | 17 |
| 1.4 Desinfección de agua | 22 |
| 1.5 Nanotecnología como un método de desinfección..... | 28 |
| 1.6 Nanomateriales antimicrobianos | 32 |
| 1.7 Membranas en la desinfección de agua..... | 40 |
| 1.8 Geomembranas, usos y aplicaciones en sistemas de captación de agua | 41 |
| 1.9 Estudios previos | 47 |
| 2. Materiales y métodos para evaluar la eliminación de <i>Escherichia coli</i> en agua estancada y la caracterización de geomembranas impregnadas con nanopartículas metálicas | 51 |
| 2.1 Propiedades y características de las geomembranas | 51 |
| 2.2 Análisis de la concentración inicial de nanopartículas de Ag y Zn en las geomembranas | 53 |
| 2.3 Cinéticas de crecimiento de <i>E. coli</i> | 55 |
| 2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida | 56 |
| 2.5 Adaptabilidad de las geomembranas a diferentes temperaturas..... | 57 |
| 2.6 Resonancia superficial de plasmones (RSP) | 57 |
| 2.7 Liberación de nanopartículas de zinc y plata | 58 |
| 2.8 Formación de biofilm..... | 58 |
| 3. Resultados del efecto bactericida de las geomembranas impregnadas con nanopartículas metálicas sobre <i>Escherichia coli</i> en agua estancada | 60 |
| 3.1 Concentración inicial de plata y zinc en las geomembranas | 60 |
| 3.2 Resultados de la cinética de crecimiento..... | 61 |
| 3.3 Resultados concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida con Silver | |

Plus 200 2E. 64

3.4 Resultados de la adaptabilidad de las geomembranas a diferentes temperaturas..... 66

3.5 Resultados resonancia superficial de plasmones..... 69

3.6 Resultados de la liberación de zinc y plata..... 71

3.7 Formación de biofilm por microscopio óptico 73

Referencias 80

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Número relativo de bacterias coliformes fecales y no fecales en diversas sustancias | 18 |
| Tabla 2: Características de los patotipos de <i>E. coli</i> diarrogénica para el humano | 21 |
| Tabla 3. Patógenos comunes en agua..... | 22 |
| Tabla 4: Técnicas de desinfección en el tratamiento de agua, ventajas y desventajas..... | 25 |
| Tabla 5. Aplicaciones actuales y potenciales de la nanotecnología | 29 |
| Tabla 6: Eficacia antibacteriana de superficies duras de poliéster..... | 48 |
| Tabla 7: Eliminación de <i>E. coli</i> con Nps de Zinc y Plata..... | 49 |
| Tabla 8. Geomembranas utilizadas para la eliminación de <i>E. coli</i> | 52 |
| Tabla 9. Equipos utilizados durante el estudio..... | 53 |
| Tabla 10. Concentraciones empleadas para evaluar CMI y CMB | 56 |
| Tabla 11. Concentración de Nps Ag y ZnO en cada geomembrana | 60 |
| Tabla 12. Porcentajes de eliminación de <i>E. coli</i> obtenidos con cada geomembrana. | 62 |
| Tabla 13. Comparativo de la eliminación de <i>E. coli</i> con estudios previos..... | 64 |
| Tabla 14. Resultados de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.. | 65 |
| Tabla 15. Efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a diferentes temperaturas..... | 69 |
| Tabla 16. Análisis de Zn y Ag desprendidos de la geomembrana Silver Plus 200 2E..... | 71 |
| Tabla 17: Comparativo de la durabilidad de diferentes superficies poliméricas impregnadas con Nps de Ag y ZnO..... | 73 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrés hídrico en los próximos 40 años..... | 15 |
| Figura 2. Diversos mecanismos de actividades antimicrobianas. | 32 |
| Figura 3. Efecto de las nanopartículas de plata sobre <i>E. coli</i> | 33 |
| Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido 10, 000X de células nativas de <i>E. coli</i> | 36 |
| Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión de células de <i>E. coli</i> | 37 |
| Figura 6. Variación de la longitud de onda absorbida con la forma de las Nps | 38 |
| Figura 7. Variación de la longitud de onda absorbida | 39 |
| Figura 8. Relación entre la variación de longitud de onda y la morfología de Nps de Ag..... | 40 |
| Figura 9. Tipos de geomembranas utilizadas en proyectos de presas | 44 |
| Figura 10. Efecto del sistema de liberación controlada..... | 45 |
| Figura 11. Superficies duras de poliéster impregnadas con Nps de Ag y ZnO..... | 47 |
| Figura 12. Pellets impregnados de Nps de plata y zinc..... | 49 |
| Figura 13. Esquema de fabricación de la capa de plástico con carácter antimicrobiano | 51 |
| Figura 14. Preparación de muestras para el estudio de espectroscopia de absorción atómica | 54 |
| Figura 15. Corte y montaje de las geomembranas en los tubos de ensaye..... | 55 |
| Figura 16. Análisis de Plasmón Superficial | 57 |
| Figura 17. Preparación de muestras para analizar Zn y Ag desprendidos..... | 58 |
| Figura 18. Identificación de <i>E. coli</i> en la geomembrana Silver Plus 200 2E | 59 |
| Figura 19. Efecto bactericida de las cinco geomembranas frente a <i>E. coli</i> | 61 |
| Figura 20. Distribución de Nps en la geomembrana Silver Plus 200 2E. | 63 |
| Figura 21. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida | 65 |
| Figura 22. Crecimiento de <i>E. coli</i> bajo el efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a 30° C y 0 rpm. | 67 |
| Figura 23. Crecimiento de <i>E. coli</i> bajo el efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a 40° C y 0 rpm. | 67 |
| Figura 24. Crecimiento de <i>E. coli</i> bajo el efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a 50° C y 0 rpm. | 68 |
| Figura 25. Análisis en el espectrofotómetro de la solución control sin Nps. | 70 |
| Figura 26. Plasmón identificado en la solución con Nps, de la geomembrana Silver Plus 200 2E. | 70 |
| Figura 27. Liberación controlada de ZnO y Ag de la geomembrana Silver Plus 200 2E | 72 |
| Figura 28. Análisis en microscopio óptico a 100x de la adherencia de <i>E. coli</i> | 75 |

Figura 29. Análisis en microscopio óptico a 100x de la adherencia de *E. coli* en la geomembrana con Nps, posterior a la tinción para bacterias gram negativas (a) día 20, (b) día 40 y (c) día 60. 76

Figura 30. Micrografía de la geomembrana Silver Plus 200 2E antes del tratamiento con *E. coli* (a), geomembrana después de 40 días de tratamiento con *E. coli* en agua peptonada (b). 77

Abreviaturas

Ag Nps: Nanopartículas de plata
CMB: Concentración mínima bactericida
CMI: Concentración mínima inhibitoria
CPE: Polietileno clorado
CSPE: Polietileno clorosulfonado
D.O: Densidad óptica
EAA: Espectroscopia de absorción atómica
EDA: Enfermedad diarreica aguda
EPA: Agencia de protección ambiental
EPDM: Caucho de etileno propileno
GPM: Galones por minuto
HDPE: Polietileno de alta densidad
LLDPE: Polietileno lineal de baja densidad
MDPE: Polietileno de densidad media
Nps: Nanopartículas
NSF: National sanitation foundation
OMS: Organización mundial de la salud
PP: Polipropileno
PVC: Cloruro de polivinilo
ROS: Especies de oxígeno reactivo
RPS : Resonancia superficial de plasmones
SPD: Subproductos de la desinfección del agua
THM : Trihalometanos
TiO₂: Óxido de titanio
TiO₂Nps: Nanopartículas de óxido de titanio
UNT: Unidad nefelométrica de turbidez
UV: Ultra violeta
WRI : World resources institute
WWT : World wide technology
ZnO : Óxido de zinc

Introducción

La disponibilidad de agua potable es una de las prioridades en todas las sociedades humanas, además de la cantidad suficiente para cubrir las necesidades básicas, el agua debe tener una calidad que garantice su inocuidad para la salud. La desinfección es una etapa esencial en el proceso de potabilización del agua para eliminar microorganismos patógenos y evitar infecciones de origen hídrico (Villanueva *et al.*, 2011). Entre los principales microorganismos a eliminar se encuentra *E. coli*, el cual fue elegido en 1890 como el indicador biológico de la seguridad del tratamiento del agua (Edberg *et al.*, 2000). *E. coli* se identificó en la mayoría de eventos de contaminación de agua potable, lo que implicó directamente una amenaza a la salud pública (Clesceri *et al.*, 1998). Una de las principales enfermedades causadas por éste microorganismo es la EDA, la cual es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en el mundo. De acuerdo con estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) las EDA son un problema de salud de la población infantil, principalmente en los países en desarrollo donde se producen anualmente entre 5 a 6 millones de muertes, constituyendo la segunda causa global de mortalidad infantil (Molina, 2015). Desde principios del siglo XX el cloro ha sido utilizado como el desinfectante del agua potable más extendido, sin embargo, a pesar del beneficio de la desinfección del agua mediante la cloración, el cloro se caracteriza por ser altamente reactivo y producir subproductos indeseados al reaccionar con la materia orgánica natural del agua. Los subproductos de la cloración así como la de otros tratamientos tienen propiedades mutágenas y cancerígenas, por lo que han sido extensamente estudiados desde que se detectaron por primera vez, en 1974 (Villanueva *et al.*, 2011). Lo anterior ha llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías las cuales cumplan con el objetivo de la desinfección y no generen subproductos dañinos para la salud humana.

Actualmente la rama de la nanotecnología se ha identificado como una solución a la desinfección de agua debido a la existencia de Nps metálicas que presentan efectos en la inactivación de microorganismos (Li *et al.*, 2008). En estudios previos se ha identificado que las Nps antibacterianas interactúan con las células microbianas a través de una variedad de mecanismos. Las Nps pueden interactuar directamente con las células microbianas y provocar la lisis de la misma. Sin embargo, uno de los grandes retos es prolongar el efecto bactericida de las Nps, por lo cual se ha optado en soportarlas en diferentes materiales para mantener el efecto residual durante un largo periodo y prolongar la vida útil del material ya que una desventaja adicional es la inherente es la emisión de cantidades relativamente grandes de biocidas en el medio ambiente (Eversdijk *et al.*, 2012). La selección de un sistema de liberación adecuado permite mantener la concentración del agente activo por encima de la concentración de inhibición mínima efectiva (CIM), al mismo

tiempo que disminuye la liberación inicial y la cantidad total de biocida necesaria.

Entre los materiales que se han propuesto para impregnar estas Nps, se encuentran geomembranas comerciales elaboradas a base de poliolefinas. Las geomembranas son materiales impermeables empleados en sistemas de captación de agua, pueden ser de polietileno u polipropileno, tienen una durabilidad de vida de aproximadamente 450 años, y son económicas. Con base a lo anterior surge la presente investigación que tiene como objetivo el desarrollo de nuevas técnicas para la desinfección y purificación de aguas, mediante la aplicación de nanomateriales compósitos, utilizando como base geomembranas de polietileno impregnadas con Nps de zinc y plata a diferentes concentraciones. El análisis radica en evaluar el efecto bactericida de la geomembrana sobre *E. coli* y apreciar el efecto de liberación controlada para poder establecer el tiempo de vida útil del material.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la eliminación de *Escherichia coli* de agua estancada a partir de geomembranas impregnadas con nanopartículas de plata y zinc, con la finalidad de proponer un proceso viable para la desinfección del agua.

Objetivos específicos

1. Cuantificar el contenido del activo antimicrobiano de cinco geomembranas impregnadas con diferentes concentraciones de Nps metálicas de ZnO y Ag, por espectroscopia de absorción atómica.
2. Analizar la eficacia antimicrobiana de las geomembranas mediante cinéticas de crecimiento, determinar CMI y CMB, así como evaluar el efecto bactericida de la geomembrana a diferentes temperaturas.
3. Evaluar la vida útil de la geomembrana mediante la liberación del activo antimicrobiano, observar la formación de biofilm en la geomembrana mediante el microscopio óptico y microscopia de barrido, así como, evaluar la morfología de las nanopartículas mediante resonancia superficial de plasmón.

1. Antecedentes de la problemática de *Escherichia coli* en agua

1.1 Problemática de agua

Las aguas dulces del mundo constituyen un recurso escaso, amenazado y en peligro. De acuerdo con los estudios sobre los balances hídricos del planeta solamente el 0.007% de las aguas dulces se encuentran realmente disponibles para todos los usos humanos directos. Según las más recientes evaluaciones de especialistas y organizaciones internacionales conectadas con los problemas del agua, se sugiere que para el año 2025 más de las dos terceras partes de la humanidad sufrirá algún estrés por la falta de este líquido (L'vovich *et al.*, 1995, Simonovic, 2000). Se considera el hecho de que el suministro de agua dulce del cual dispone la humanidad se está reduciendo a raíz de la creciente contaminación de los recursos hídricos. En algunos países los lagos y ríos se han transformado en receptáculos de una variedad abominable de desechos, inclusive aguas negras municipales parcialmente tratadas, efluentes industriales tóxicos y sustancias químicas de las actividades agrícolas lixiviadas, lo cual contamina las aguas de superficie y freáticas.

El encontrarse entre suministros de agua limitados, contaminados, así como la demanda del crecimiento demográfico y el desarrollo industrial, hacen que muchos países en desarrollo enfrenten problemáticas en cuanto a este recurso (Crossette, 1995). Otro de los factores que influyen a nivel global en la escasez del agua, es su distribución geográfica, ya que la distribución del agua dulce es desigual entre las regiones naturales y económicas del planeta., por ejemplo, cerca del 75% de la población humana se concentra en países y regiones donde sólo existe el 20% de la disponibilidad de agua (L'vovich *et al.*, 1995, Simonovic, 2000).

Para darnos una idea de la problemática a nivel mundial, en el siguiente mapa se muestra el estrés hídrico que presentara cada país en los próximos 40 años (Figura 1), en él se identifican países con una escasez extremadamente alta como Israel, Palestina, Irán, entre otros, no obstante México se encuentra entre los países que podrán presentar un estrés hídrico alto (WRI, 2013), por lo cual es necesario considerar nuevas tecnologías para hacer frente este fenómeno en los próximos años.

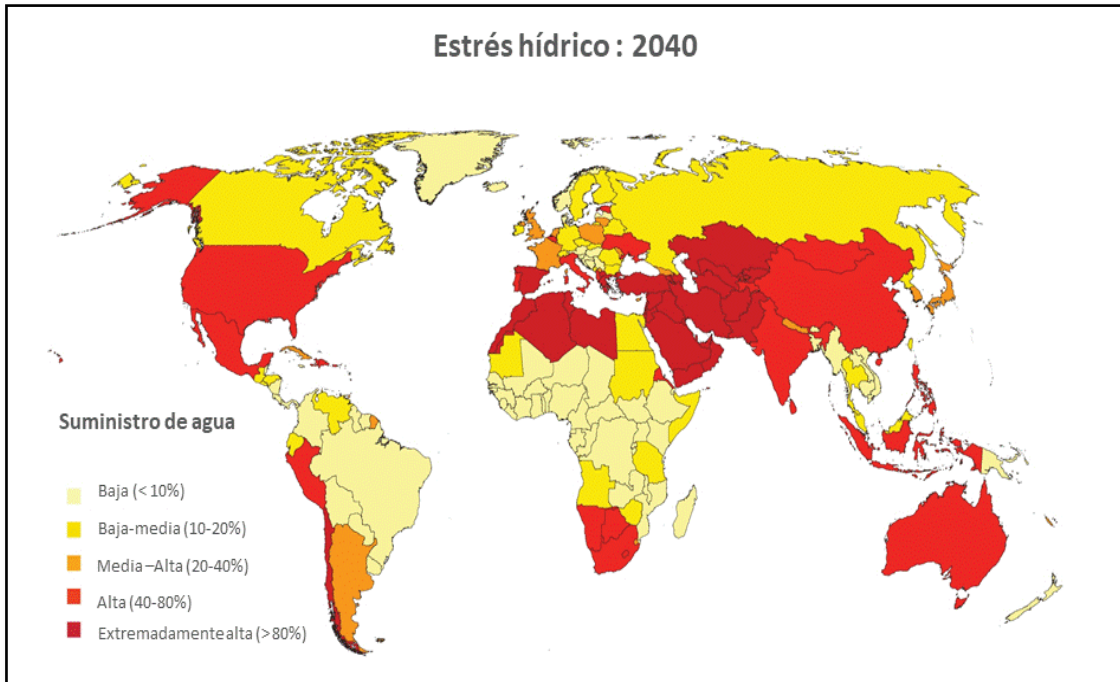


Figura 1. Estrés hídrico en los próximos 40 años (WRI, 2013)

Las estadísticas a nivel mundial son alarmantes, sin embargo, las cifras en nuestro país también resultan de interés, por ejemplo, considerando la proyección de la población a diciembre de 2007, se estimó que para un total de 106.23 millones de personas en el país, la disponibilidad natural de agua por habitante era de 4 mil 312 metros cúbicos anuales (SEMARNAT, 2008), un volumen que de acuerdo al World Resources Institute (WRI), se considera como de disponibilidad baja ya que el límite inferior para clasificar a la disponibilidad media es de 5 mil metros cúbicos por habitante por año.

A nivel nacional también se presentan diferencias entre la distribución geográfica del agua y la distribución geográfica de la población, por ejemplo en la zona norte, centro y noroeste, se concentra 77% de la población y únicamente se dispone del 31% del agua renovable., En la zona sur-sureste habita el 23% de la población y solo se dispone del 69% del agua renovable (SEMARNAT, 2008). Lo anterior provoca que se observen áreas con gran escasez de agua y regiones con frecuentes eventos hidrometeorológicos que significan costosas inundaciones y daños de asentamientos humanos e infraestructura.

Una de las soluciones para hacer frente a la escasez de agua potable se refiere al aprovechamiento eficiente de la precipitación pluvial, es decir, el agua de lluvia, ya que un milímetro de lluvia equivale a un litro por metro cuadrado (Phillips *et al.*, 2010).

La captación pluvial no es algo nuevo y tampoco implica gran tecnología a un nivel doméstico, es un sistema que ha sido practicado en diferentes épocas y culturas, ya que es un medio fácil para obtener agua para el consumo humano. El agua de lluvia puede ser interceptada, colectada y almacenada en depósitos especiales como cisternas, estanques o barriles para su uso posterior, lo cual ayudaría durante el tiempo de sequía para sobrellevarlas y también durante épocas de lluvias fuertes que desencadenan inundaciones que afectan a la población, lo anterior muestra que en un futuro no muy lejano, el sistema de captación de agua de lluvia será un mecanismo de sobrevivencia necesario (Ramón, 2014).

Uno de los principales retos a los que se enfrentan los sistemas de captación de agua es la desinfección de microorganismos patógenos y mantener la calidad del agua para consumo humano. Con respecto a ello, la Norma Oficial Mexicana 127 SSA1 establece los parámetros para el agua potable, entre los que se encuentran los coliformes totales y los coliformes fecales. Los coliformes fecales se definen como el grupo de organismos que pueden fermentar la lactosa a 44 - 45 °C, estos comprenden el género *Escherichia* y en menor grado especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* (Marchand, 2002). Estos microorganismos representan un peligro significativo al agua de consumo humano, por su presencia en aguas servidas y excretas del hombre y de los animales. En este caso los sistemas de captación de agua, pueden ser altamente contaminados por este tipo de excretas y es posible que dichos microorganismos se encuentren vivos y con la capacidad de producir enfermedades.

Lo anterior provoca que la desinfección de agua se convierta en uno de los tópicos de interés en el presente proyecto, para lo cual es necesario identificar los microorganismos característicos del agua estancada así como su desinfección.

1.2 Primeras observaciones de enfermedades transmitidas por el agua

El científico italiano Fracasoro mientras analizaba el patrón de muertes por peste bubónica y otras epidemias alrededor de las ciudades costeras del Adriático italiano en 1546, concluyó que la infección de muerte fue transmitida por cuatro rutas principales: mano a mano, insectos, partículas fecales-orales y aéreas (Bulloch, 1960). Otro caso evidente, fue la muerte de Prince Consort Albert en 1861 por la fiebre tifoidea, lo cual proporcionó suficiente motivación para que el gobierno británico reevaluara el sistema sanitario para la distribución del agua y el tratamiento de aguas residuales, lo que generó una política pública para instituir medidas de protección para la salud y prevención de enfermedades transmitidas por el agua. Gracias a estas observaciones en la década de

1890, los ingenieros sanitarios descubrieron que el tratamiento del agua potable con cloro era una forma barata, efectiva, y una forma relativamente simple de producir agua potable biológicamente aceptable. Por lo tanto, comenzó el uso generalizado de la desinfección y otros procesos para producir un consumo de agua sin patógenos. Por lo que se estableció el proceso de monitoreo para garantizar la eficacia continua, así mismo, una amplia variedad de experimentos físicos, químicos y analitos biológicos fueron examinados para determinar la sensibilidad y especificidad de éstos. Finalmente, en el año 2000 se estableció que el monitoreo para los indicadores de contaminación fecal protegían mejor la salud del sector público que el monitoreo de patógenos específicos. El primordial fundamento de esta conclusión fue simple: ya que hay demasiadas y todavía desconocidas especies patógenas transmitidas por el agua. Además, estos patógenos están presentes en pequeñas concentraciones. Aunque actualmente existen métodos de identificación para muchos de los patógenos transmitidos por el agua, en general son bastante costosos, técnicamente exigentes y lentos (Edberg *et al.*, 2000).

1.3 E. coli característica generales

E. coli se encuentra en todas las heces de mamíferos, sin embargo, no se multiplica de manera apreciable en el medio ambiente. En la década de 1890 fue elegida como el indicador biológico de la seguridad del tratamiento del agua, incluso se desarrollaron sustitutos de la bacteria, como las pruebas de coliformes fecales y coliformes totales, que pasaron a formar parte de las reglamentaciones sobre el agua potable. Hasta finales de la década de 1980, se hizo posible analizar la presencia de *E. coli* en agua potable de forma económica y simple, a consecuencia de ello fue reinsertado en las regulaciones de agua potable. En este periodo también se descubrió que *E. coli* puede sobrevivir en el agua potable entre 4 y 12 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura, microflora, etc.).

Las bacterias y los virus son aproximadamente igualmente sensibles a los oxidantes, pero los parásitos lo son menos. Bajo las condiciones en los sistemas de distribución, *E. coli* será mucho más longevo. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, es posible diseñar un programa de monitoreo que permita la protección de la salud pública a un costo modesto (Edberg *et al.*, 2000).

1.3.1 E. coli como el mejor indicador biológico

Theobald Smith fue el primero que estudió *E. coli* como parte de la flora normal de los mamíferos y lo propuso como el indicador principal de agua potable en la década de 1890 (Prescott y Winslow,

1915). En 1904, Eijkman desarrolló la “prueba de coliformes fecales” (Eijkman, 1904) y fue hasta 1914, cuándo el departamento del Tesoro de EU propuso un estándar para la seguridad del agua potable que establecía la utilización de una prueba de coliformes totales (Clesceri *et al.*, 1998). Fue en ese momento, cuando se identificó que la mayoría de eventos en contaminación de agua potable eran de origen fecal y el método coliforme total detectó una alta proporción de *E. coli*, lo que implica directamente una amenaza a la salud pública. Para ello fue necesario establecer que el grupo de coliformes comprende aquel género capaz de utilizar lactosa para producir ácido y gas, o poseen la enzima β -galactosidasa, que es capaz de utilizar un sustrato de galactopiranosido cromogénico para el crecimiento (Clesceri *et al.*, 1998). Los géneros que satisfacen esta definición incluyen *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Escherichia*, los cuales se encuentran ampliamente en el ambiente es decir, fuente de agua, vegetación y suelos (LeChevallier *et al.*, 1987)

A pesar de estar en el ambiente, varios estudios han demostrado claramente que *E. coli* es el único coliforme que es un habitante indudable del tracto gastrointestinal. Mientras que *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* se encuentran en pequeñas cantidades cuando están presentes.

En 1921 se realizó un estudio en el estado de Iowa en varios sitios de animales y humanos, en él se tomaron muestras de diferentes fuentes entre las que se encontraron: heces humanas, heces de animales, muestras de agua, leche, granos y suelo. En cada muestra se observaron diferentes cantidades de cepas, tal como se aprecia en la Tabla 1, *E. coli* se encontró en mayor proporción en heces fecales de animales y humanos, comparado con *Enterobacter*, la cual mostró mayor presencia en otros medios como agua, leche y suelo, a partir de ello se propuso la teoría de que *E. coli* es una especie que se encuentra en mayor proporción en el tracto intestinal comparada con *Enterobacter*.

Tabla 1. Número relativo de bacterias coliformes fecales y no fecales en diversas sustancias (Allen y Edberg, 1995)

| Fuente | Número de cepas observadas | Porcentaje de cepas de <i>Enterobacter aerogenes</i> | Porcentaje de cepas <i>E. coli</i> |
|----------------|----------------------------|--|------------------------------------|
| Heces humanas | 2534 | 5.9 | 94.1 |
| Heces animales | 1832 | 7.4 | 92.6 |
| Agua | 2137 | 35.2 | 64.8 |
| Leche | 1382 | 43.1 | 56.9 |
| Granos | 288 | 81.7 | 18.3 |
| Suelo | 853 | 88.1 | 11.9 |

A fines de la década de 1970, se estableció que *E. coli* era específica y abundante en heces humanas y animales. La especie fue encontrada en aguas residuales, efluentes tratados y todas las aguas y suelos naturales sujetos a contaminación fecal de mamíferos (Edberg *et al.* 1988), fue entonces cuando se hizo evidente que los métodos para identificar *E. coli* de manera específica, estaban disponibles solamente para laboratorios especializados, los cuales eran demasiado costosos y que requerían un alto nivel de experiencia técnica para poder analizarla de manera rutinaria en el agua. Por lo tanto, los sanitarios comenzaron a confiar en la prueba de "coliformes fecales" como sustituto de *E. coli.*, incluso varias agencias reguladoras como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) aprobaron el análisis de coliformes fecales como prueba de la presencia de *E. coli* en agua.

1.3.2 Supervivencia de *E. coli*

Entre las variables que afectan la distribución de los patógenos se encuentran: el tipo de patógeno, tipo de agua (agua superficial, agua subterránea, agua de distribución tratada), temperatura del agua, micro flora presente y exposición a la luz solar (radiación ultravioleta).

La calidad y tipo de agua tienen una gran influencia en la supervivencia de los agentes patógenos y los indicadores. Por ejemplo, los microbios sobreviven mejor cuando están adheridos o secuestrados en partículas que cuando están expuestos. La temperatura del agua ejerce una serie de efectos sobre el indicador, los patógenos y otra microflora. El agua superficial tiende a tener una gama más amplia de otras microfloras que las aguas subterráneas. Tanto los indicadores biológicos como los otros patógenos forman parte del ecosistema y su cadena alimentaria. En consecuencia, cuanto más probable sea que un microbio coma otro microbio, más corta será su vida útil.

A pesar de la información mostrada anteriormente, no se puede determinar con certeza cuál es la vida útil de *E. coli* en agua debido a la variabilidad del entorno, sin embargo, uno de los estudios más extensos sobre la capacidad de supervivencia de *E. coli* en condiciones tanto naturales como de laboratorio fue elaborado por Kudryavtseva (1972), dicho autor estableció que *E. coli* era capaz de sobrevivir durante tres meses en aguas subterráneas. Filip *et al.*, (1987) también reportaron que *E. coli* es capaz de sobrevivir en aguas subterráneas a 10°C hasta 100 días. Sin embargo, basado en el estudio de supervivencia de *E. coli* en el medio ambiente, se propone que su supervivencia es de 4 a 12 semanas en un agua a temperatura de 15-18 ° C.

1.3.3 *E. coli* y la enfermedad diarreica

La diarrea aguda es una enfermedad intestinal generalmente infecciosa y autolimitada, se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas o de consistencia disminuida, en número mayor a tres en 24 horas y con evolución menor de dos semanas.

La enfermedad diarreica grave (EDA), es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en el mundo. De acuerdo con estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud (Molina, 2015), las EDA son un problema de salud de la población infantil, principalmente en los países en desarrollo donde se producen anualmente entre 5 a 6 millones de muertes, lo que se consideró como la segunda causa global de mortalidad infantil. Esta es una enfermedad que afecta a todos los grupos de edad, sin embargo, el periodo pediátrico de mayor vulnerabilidad incluye a los menores de 5 años, quienes se deshidratan con mayor rapidez. En México, el Instituto Nacional de Salud Pública estima que se recetan antibióticos a 70% de los pacientes con infecciones respiratorias y diarreicas agudas, lo que se justifica solamente en un 15% de los casos. Steffen, director de la campaña del Día Mundial de la Salud Digestiva, señaló que el 20% de las muertes infantiles se debe a diarrea y sólo el 39% de los niños con diarrea recibe el tratamiento recomendado.

E. coli es responsable de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además se ha reportado su participación en cerca del 50% de las infecciones intrahospitalarias y en el 90% de las infecciones de este tipo en pacientes ambulatorios (Molina, 2015).

1.3.3.1 Síndromes clínicos

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia: *E. coli enteropatógena* (EPEC), *enterotoxigénica* (ETEC), *enterohemorrágica* (EHEC), *enteroinvasiva* (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y *enteroagregativa* (EAEC). Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento. En la Tabla 2 se muestran las características de los patotipos diarreogénica para el humano.

Tabla 2: Características de los patotipos de *E. coli* diarrogénica para el humano (Molina, 2015).

| Patotipos | EPEC | ETEC4 | EIEC | EHEC | EAEC |
|--------------------------------|--|---|---|---|---|
| Edad afectada | Lactantes | Mayores de cinco años | Todas las edades | Todas las edades | Todas las edades |
| Tipo de diarrea | Secretora | Secretora | Inflamatoria | Inflamatoria | Persistente y aguda |
| Serotipos o serogrupos | O26:H11 O55:H6 O86:H34 O111:H2 O114:H O127:H9 | O6:H11 O8:H9 O11:H27 O20:NM O25:H42 O78:H11 | O28 ac:NM O29:NM O112 ac: NM O115: NM O124: H30 | O26:H11 O45:H2 O111:H8 O121:H19 O157:H7 | O44:H18 O55 O11 O125 O126 O128 |
| Factor de virulencia | Adherencia localizada Adherencia Intima | Enteroxinas ST y/o LT Factores antigénicos de colonización | Invasividad | Citoxinas similares a la toxina shinga | Adherencia agregativa Toxinas Pet y Pic Sideroforos |
| Distribución geográfica | Niños menores de 2 años | Mundial | Países en vías de desarrollo | Mundial | Mundial |

Debido a las altas concentraciones de *E. coli* en agua, los efectos en la salud y su periodo tan amplio de vida, la desinfección del agua se ha convertido en una preocupación a nivel mundial, por lo cual es necesario evaluar los principales métodos de eliminación así como sus ventajas y desventajas en las diferentes maneras de uso.

1.4 Desinfección de agua

Se denomina desinfección a la inactivación de microorganismos patógenos en el agua (EPA, 1999), En la Tabla 3, se muestran los patógenos más comunes que se transmiten en el agua. Sin embargo, la desinfección de agua también deberá cumplir las siguientes funciones: minimización de los subproductos de desinfección (SPD), oxidación del fierro y manganeso, prevención del rebrote de microorganismos en los sistemas de distribución, mantener estabilidad biológica, remover sabor y olor mediante la oxidación química, mejorar la eficiencia de la coagulación /filtración y finalmente prevenir el crecimiento de algas en filtros.

Tabla 3. Patógenos comunes en agua (EPA, 2011)

| Tamaño (μm) | Patógeno | Infectividad relativa* |
|--|--|-------------------------------|
| 0.1-10 | <i>Salmonella spp</i> | Moderada |
| | <i>Shigella spp</i> | Alta |
| | <i>Yersinia enterocolitica</i> | Baja |
| | <i>Campylobacter spp</i> | Moderada |
| | <i>Escherichia coli</i> | Baja |
| | <i>Verocytotoxigenic E. coli</i> incluye | Alta |
| | <i>E coli-O157</i> | |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Baja |
| | <i>Mycobacterium spp</i> | Alta |

* A partir de la evidencia epidemiológica, alto significa dosis infectivas entre 1 - 100 organismos, moderada 100- 10,000 y bajo > 10,000

1.4.1 Técnicas de desinfección

Cuando se habla de desinfección hay varios puntos que se deben de tomar en cuenta, el primero es la eficacia del tren de tratamiento primario, en el que el agua de la fuente se somete a varios procesos, incluida invariablemente alguna forma de desinfección con oxidantes como el ozono o la cloración. La segunda consideración es el área de riesgo potencial para la salud pública, a continuación se muestran los diferentes tipos de desinfectantes identificados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos en 1990.

1.4.1.1 Ozono

El ozono, siendo el más energético, es uno de los más activos frente a los microbios, bacterias y virus, los cuales son rápidamente eliminados y los quistes de parásitos significativamente reducidos en viabilidad. El ozono, al igual que el dióxido de cloro, es inestable y no puede ser transportado ni almacenado y, por lo tanto, debe ser producido in situ. Las especies oxidantes son el propio O_3 o los radicales hidroxilo. En comparación con Cl_2 , ClO_2 y las cloraminas, es muy eficiente en bajas concentraciones, y más efectivo en la inactivación de patógenos, incluyendo bacterias, protozoarios y virus. Sólo debe ser utilizado como desinfectante primario, pues no tiene efecto residual en agua. El O_3 no forma SPD organoclorados, pero pueden aparecer compuestos bromados si el agua contuviera bromuros, además de otros productos orgánicos tales como aldehídos o cetonas (EPA, 1999 y White, 1999).

1.4.1.2 Cloro y cloraminas

La cloración generalmente es activa contra bacterias y virus. Debido a la preocupación sobre la producción de trihalometanos (THM) y el límite de THM en el agua potable, cada vez más servicios públicos han estado cambiando a la cloraminación que es la combinación de amoníaco con el cloro para aportar un desinfectante residual al agua, más persistente que el cloro. La cloraminación funge como el principal desinfectante de elección y el medio para mantener la desinfección residual a través del sistema. Las cloraminas son menos eficientes en cuanto a la desinfección pero más estables que el cloro, en consecuencia, los microbios pueden sobrevivir durante períodos de tiempo más prolongados cuando están expuestos a las cloraminas.

1.4.1.3 UV

Como técnica de tratamiento de agua, la luz ultravioleta es un desinfectante eficaz debido a su fuerte capacidad germicida. Los rayos UV desinfectan contra las bacterias y los virus que contiene el agua y

pueden ser eficaces contra los protozoos como los quistes de *Giardia lamblia cyst* o *Cryptosporidium oocysts*. Los rayos UV han sido utilizados durante muchos años en la industria farmacéutica, cosmética.

Debido a problemas de seguridad asociados con la dependencia de la cloración y la mejora en la tecnología UV, la radiación UV ha experimentado una mayor aceptación en los sistemas municipales y domésticos. Hay dos clases de sistemas de desinfección certificados y clasificados por la National Sanitation Foundation (NSF) bajo el estándar clase A y clase B (Oram, 2014). Clase A: sistemas de tratamiento útiles para un rango de saturación de microorganismos de al menos $40,000 \mu\text{W}\cdot\text{seg} / \text{cm}^2$. Clase B: sistemas de tratamiento para agua con un rango de saturación de microorganismos de $16,000 \mu\text{W}\cdot\text{seg} / \text{cm}^2$. Por lo tanto, el tipo de unidad depende de su situación, fuente de agua y la calidad del agua. Sin embargo, cuando la turbidez es de cinco Unidades Nefelométrica de Turbidez (UNT) o los sólidos suspendidos totales son mayores que 10 mg/L , se recomienda encarecidamente la filtración previa del agua.

1.4.1.4 Dióxido de cloro y permanganato de potasio

El dióxido de cloro es un poderoso desinfectante. Es efectivo para la inactivación de bacterias, virus, y protozoos, incluyendo *Cryptosporidium*. Como desinfectante es más efectivo que el cloro, pero no tan efectivo como el ozono. El dióxido de cloro también se usa para controlar el sabor, el olor, y oxidación de hierro y manganeso, en general forma menos subproductos halogenados que el cloro, el producto final predominante es clorito (USEPA, 2003a).

El permanganato de potasio (KMnO_4) se usa principalmente para controlar el sabor, los olores, eliminar el color, controlar crecimiento biológico en plantas de tratamiento, y eliminar el hierro y manganeso. En un rol secundario, el permanganato de potasio puede ser útil para controlar la formación de trihalometanos (THM) y otros SPD precursores oxidantes, además de ayudar a la reducción de otros desinfectantes (Hazen y Sawyer, 1992). Sin embargo, es un desinfectante no tan recomendable ya que requiere un largo tiempo de contacto para lograr un buen efecto en la desinfección de agua.

En la siguiente Tabla se resumen los tratamientos de desinfección normalmente utilizados, así como las ventajas y desventajas de cada tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4: Técnicas de desinfección en el tratamiento de agua, ventajas y desventajas (EPA, 1999).

| Tipo | Ventajas | Desventajas |
|-------|--|--|
| Ozono | <ul style="list-style-type: none"> *Es más efectivo que el cloro, las cloraminas y el dióxido de cloro para la inactivación de virus, <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i>. *En algunos casos puede mejorar el proceso de clarificación y la eliminación de turbidez. *Controla el color, el sabor y los olores. *Es uno de los desinfectantes químicos más eficientes, el ozono requiere un tiempo de contacto muy corto. *Al descomponerse, el único residuo es oxígeno disuelto. *La actividad biocida no está influenciada por el pH. | <ul style="list-style-type: none"> *El costo inicial del equipo de ozonización es alto. *La generación de ozono requiere alta energía y se debe generar en el sitio. *El ozono es altamente corrosivo y tóxico. *Se descompone rápidamente a pH alto y temperaturas cálidas. |
| Cloro | <ul style="list-style-type: none"> *Es un biocida eficaz. *Es el método de desinfección más fácil y menos costoso, independientemente del tamaño del sistema. *Es el método de desinfección más utilizado y, por lo tanto, el más conocido. | <ul style="list-style-type: none"> *Puede causar un deterioro en la coagulación / filtración de sustancias orgánicas disueltas. *El agua podría tener problemas de sabor y olor, dependiendo de la calidad del agua y la dosificación. *Es corrosivo. *Es menos efectivo a pH alto. *Grandes concentraciones de cloro son inestables y producirán clorato como subproducto. |

| | | |
|------------------|---|---|
| Cloraminas | <p>*El residuo de cloramina es más estable y más duradero que el cloro libre, proporcionando una mejor protección contra el rebrote bacteriano en sistemas con grandes tanques de almacenamiento y tuberías de agua sin salida.</p> <p>*Debido a que las cloraminas no tienden a reaccionar con compuestos orgánicos, muchos sistemas experimentan menos incidencias con problemas de sabor y olor cuando se usan cloraminas.</p> | <p>*Las propiedades desinfectantes de las cloraminas no son tan fuertes como otros desinfectantes, como cloro, ozono y dióxido de cloro.</p> <p>*Las cloraminas no pueden oxidar hierro, manganeso y sulfuros.</p> <p>*El exceso de amoníaco en el sistema de distribución puede ocasionar problemas de nitrificación, especialmente en lugares con bajo nivel de desinfectante residual.</p> <p>*Las cloraminas son menos efectivas como desinfectantes a pH alto que a bajo pH.</p> |
| UV | <p>*Luces UV de baja presión y presión media disponibles.</p> <p>*Muy efectivo contra bacterias y virus en concentraciones de 40,000 a 16,000 $\mu\text{W}\cdot\text{seg} / \text{cm}^2$.</p> <p>*Subproductos mínimos de desinfección producidos.</p> | <p>*El desinfectante físico primario; requiere sustancia química secundaria desinfectante para residual en el sistema de distribución.</p> <p>*Aguas con altas concentraciones de hierro, calcio, turbidez y los fenoles pueden no ser aplicables a la desinfección UV.</p> <p>Experiencia limitada y datos con flujos superiores a 200 GPM.</p> |
| Dióxido de cloro | <p>*Eficaz contra una amplia gama de patógenos en el agua potable.</p> <p>*No forma subproductos halogenados.</p> | <p>*Menos estable que otras especies de cloro y, por lo tanto, es difícil de mantener un efecto residual en el sistema de distribución durante mucho tiempo.</p> <p>*La eficiencia de la desinfección se reduce significativamente a bajas temperaturas.</p> <p>*Debe ser generado en el sitio.</p> <p>* Los costos químicos son altos.</p> |

| | | |
|-------------------------|---|---|
| Permanganato de potasio | <ul style="list-style-type: none">*Oxida el hierro y el manganeso y oxida el olor y los compuestos que causan sabor.*Es fácil de transportar, almacenar y aplicar.*Es útil para controlar la formación de THM y otros SPD.*Tiene poco impacto en otros procesos de tratamiento en el agua. | <ul style="list-style-type: none">*Se requiere un largo tiempo de contacto.*Tiene una tendencia a darle al agua un color rosado.*No se generan subproductos al preparar la solución de alimentación, sin embargo, el color púrpura oscuro / negro que genera, puede causar lesiones oculares graves, es irritante para la piel y puede ser fatal si es ingerido. La sobredosificación es peligrosa ya que puede causar problemas de salud como ictericia y presión arterial baja. |
|-------------------------|---|---|

Las tecnologías de desinfección anteriormente mencionadas en su mayoría se ven limitadas ya que no tienen un efecto residual duradero o debido a que los subproductos que se generan durante el proceso resultan dañinos para la salud, es por ello que la búsqueda de tecnologías continuará durante las próximas décadas, tratando de implementar nuevos métodos los cuales garanticen la inactivación total de los microorganismos y que estén al alcance de la población.

1.5 Nanotecnología como un método de desinfección

Los nanomateriales se definen generalmente como partículas de menos de 100 nm. A esta escala, los materiales a menudo poseen nuevas propiedades y diferentes de sus contrapartes de dimensión micrométrica, muchas de las cuales han sido exploradas para aplicaciones en el tratamiento del agua y aguas residuales. Algunas de estas aplicaciones utilizan las propiedades de los nanomateriales dependientes del tamaño, lo cual se relacionan con una alta área de superficie específica, que influye en la disolución rápida y la alta reactividad (Qu *et al.*, 2013).

Las aplicaciones de los nanomateriales que se analizan a continuación están en función de los procesos de operación (Tabla 5). La mayoría de las aplicaciones que se analizan todavía se encuentran en la etapa de investigación de laboratorio, sin embargo, de manera complementaria se muestran las propiedades de las membranas nanocompuestas en la rama de desinfección.

Tabla 5. Aplicaciones actuales y potenciales de la nanotecnología en el tratamiento de agua y aguas residuales (Qu *et al.*, 2013).

| Aplicaciones | Nanomateriales representativos | Propiedades deseables de los nanomateriales | Tecnologías habilitadas |
|----------------------------------|--|--|---|
| Adsorción | Nanotubos de carbón. | Área superficial específica alta, sitios de adsorción altamente evaluables, química de superficie sintonizable, fácil reutilización. | Preconcentración / detección de contaminantes, adsorción de contaminantes recalcitrantes. |
| | Óxido metálico a nanoescala. | Área de superficie específica alta, distancia de difusión intrapartícula corta, más sitios de adsorción, compresible sin reducción significativa del área de superficie, fácil reutilización, algunos son superparamagnéticos. | Filtros de medios adsorbentes, reactores de lodo. |
| | Nanofibras con estructura de núcleo y caparazón. | Química de la superficie del caparazón adaptada para la adsorción selectiva, núcleo reactivo para la degradación, distancia corta de difusión interna. | Nanoadsorbentes reactivos |
| Membranas y procesos de membrana | Nano-zeolitas | Tamiz molecular, hidrofiliidad. | Membranas de nanocompuestos de película delgada de alta permeabilidad |
| | Nano-Ag | Actividad antimicrobiana fuerte y de amplio espectro, baja toxicidad para los humanos | Membranas antiinflamables. |
| | Nanotubos de carbón. | Actividad antimicrobiana (nanotubos de carbono no alineados). | Membranas antiinflamables. |

| | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|---|---|
| | | Diámetro pequeño, suavidad atómica de la superficie interna, química de apertura sintonizable, alta estabilidad mecánica y química. | Membranas de nanotubos de carbono alineadas |
| | Aquaporin | Alta permeabilidad y selectividad. | Membranas de Aquaporin |
| | Nano-TiO ₂ | Actividad fotocatalítica hidrofiliidad, alta estabilidad química. | Membranas reactivas, membranas nanocompuestas de película fina de alto rendimiento. |
| | Nano-magnetita. | Química de superficie sintonizable, superparamagnética. | Ósmosis delantera |
| Desinfección y control microbiano | Nano-Ag | Actividad antimicrobiana fuerte y de amplio espectro, baja toxicidad para los humanos, facilidad de uso. | Desinfección del agua, superficie anti-bioincrustación. |
| | Nanotubos de carbón | Actividad antimicrobiana, forma de fibra, conductividad. | Desinfección del agua, superficie anti-bioincrustación. |
| | Nano-TiO ₂ | Generación fotocatalítica de ROS, alta estabilidad química, baja toxicidad humana y costo. | Desinfección a gran escala y la descontaminación. |

| | | | |
|-----------------------|---|---|---|
| Detección y monitoreo | Puntos cuánticos | Amplio espectro de absorción, emisión estrecha, brillante y estable que se escala con el tamaño de partícula y el componente químico. | Detección óptica |
| | Nanopartículas de metales nobles. | Resonancia de plasmones de superficie localizada mejorada, alta conductividad. | Detección óptica y electroquímica. |
| | Nanopartículas de sílice dopadas con colorante. | Alta sensibilidad y estabilidad, rica química de sílice para una fácil conjugación. | Detección óptica. |
| | Nanotubos de carbón | Gran superficie, alta resistencia mecánica y estabilidad química, excelentes propiedades electrónicas. | Detección electroquímica, preconcentración de muestras. |
| | Nanopartículas magnéticas | Química de superficie sintonizable, superparamagnetismo | Preconcentración y purificación de muestra |

1.6 Nanomateriales antimicrobianos

A partir del efecto que presentan las Nps hacia la inactivación de microorganismos, se ha investigado sobre qué parte celular afecta cada una de ellas en las bacterias. En estudios previos se ha identificado que las Nps antibacterianas interactúan con las células microbianas a través de una variedad de mecanismos. Los principales mecanismos antimicrobianos informados en la literatura se resumen en la Figura 2. Las Nps pueden interactuar directamente con las células microbianas, por ejemplo, interrumpir la transferencia de electrones transmembrana/ penetrar la membrana celular, oxidar los componentes celulares y producir productos secundarios por ejemplo, especies de oxígeno reactivo (ROS) o iones de metales pesados disueltos, que causan daño. A continuación se muestran los efectos sobre las células microbianas, en donde las Nps más comúnmente utilizadas son base Ag, ZnO y TiO₂ (Li *et al.*, 2008).

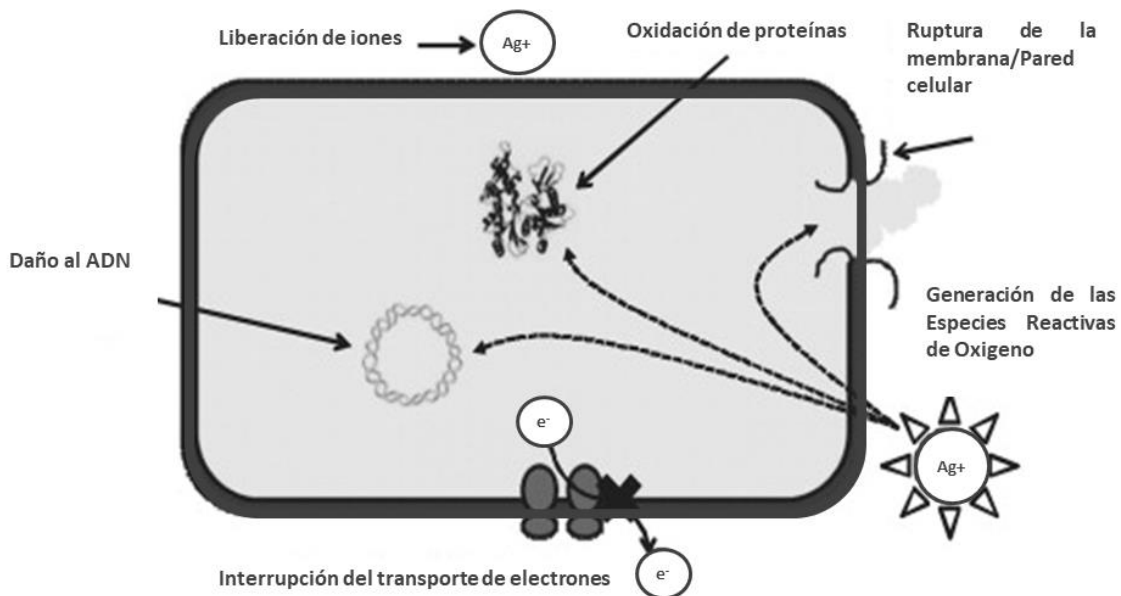


Figura 2. Diversos mecanismos de actividades antimicrobianas ejercidas por los nanomateriales (Li *et al.*, 2008).

1.6.1 Nanopartículas de Ag

Las propiedades antimicrobianas de los compuestos de plata y los iones de plata han sido reconocidas en una amplia gama de aplicaciones, desde la desinfección de dispositivos médicos y electrodomésticos hasta el tratamiento de agua (Bosetti *et al.*, 2002, Chou *et al.*, 2005, Gupta y Silver, 1998). Los iones de plata interactúan con los grupos tiol en las proteínas, lo que resulta en la inactivación de las enzimas respiratorias y conduce a la producción de ROS (Matsumura *et al.*, 2003). También se demostró que los iones Ag^+ evitan la replicación del ADN, afectando la estructura y la permeabilidad de la membrana celular, con lo cual se provoca la lisis de la misma, tal como se muestra en la Figura 3. Este hecho conlleva a una mayor permeabilidad en la pared celular dejando a la célula bacteriana incapaz de la regulación del transporte a través de la membrana plasmática, lo que culmina con la muerte celular (Feng *et al.*, 2000, Monge, 2009). Estos iones de plata son fotoactivos en presencia de irradiación UV lo que lleva a una mayor inactivación de bacterias y virus (Kim *et al.*, 2008, Rahn *et al.*, 1973).

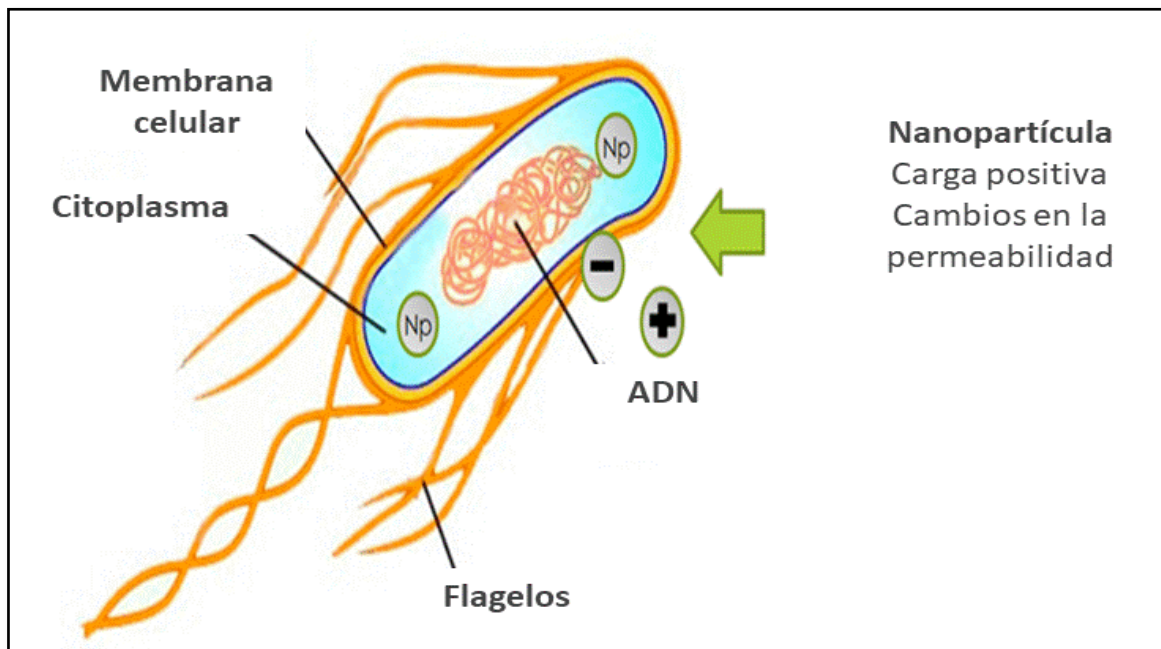


Figura 3. Efecto de las nanopartículas de plata sobre *E. coli* (Monge, 2009).

1.6.2 Nanopartículas de ZnO

El Óxido de Zinc (ZnO) de tamaño nanométrico se ha utilizado en los filtros solares, revestimientos y pinturas debido a su alta eficacia de absorción UV y transparencia a la luz visible (Franklin *et al.*, 2007). Las Nps de ZnO muestran fuertes actividades antibacterianas en un amplio espectro de bacterias (Sawai, 2003, Adams *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2008). El mecanismo antibacteriano de ZnO todavía está bajo investigación, sin embargo, sugirió que la generación fotocatalítica de peróxido de hidrógeno era uno de los principales efectos que desarrolla (Sawai, 2003), además, la penetración de la envoltura celular y la desorganización de la membrana bacteriana tras el contacto con Nps de ZnO también es un efecto para inhibir el crecimiento bacteriano (Brayner *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2008).

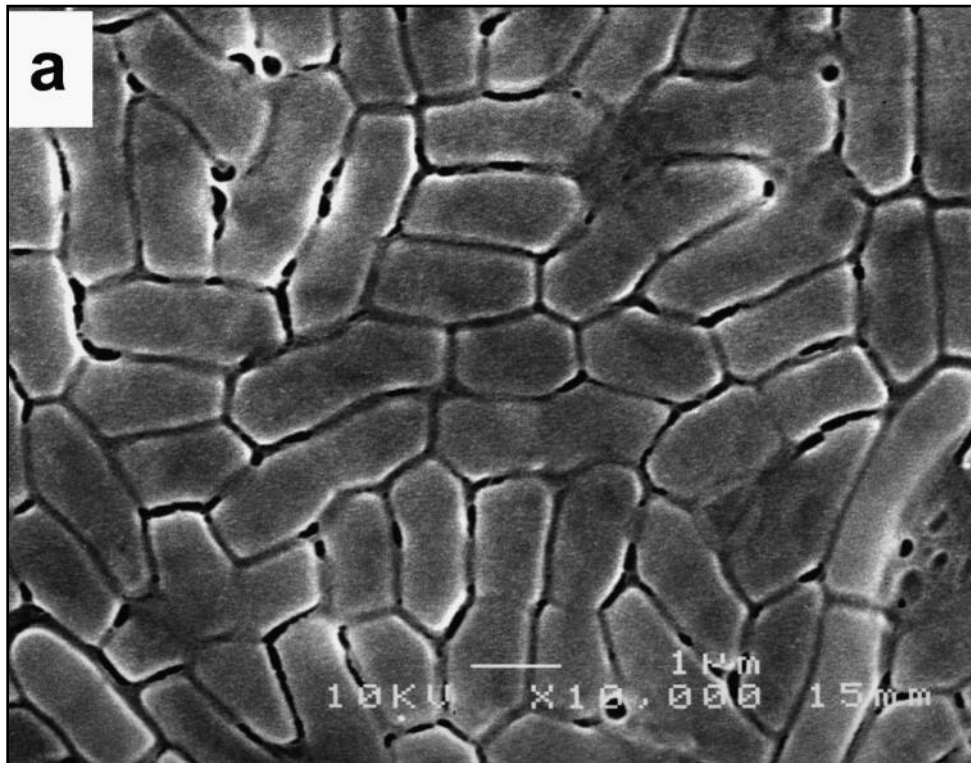
1.6.3 Nanopartículas de TiO₂

El TiO₂ es el fotocatalizador semiconductor más comúnmente utilizado entre los diferentes nanomateriales. Activado por irradiación UV sus propiedades fotocatalíticas se han utilizado en diversas aplicaciones medioambientales para eliminar contaminantes del agua y el aire (Gelover *et al.*, 2006, Murray *et al.*, 2007, Salthammer y Fuhrmann, 2007). El TiO₂ puede matar bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, aunque las bacterias Gram-positivas son menos sensibles debido a su capacidad de formar esporas (Wei *et al.*, 1994). Estudios más recientes han informado que el TiO₂ puede matar virus incluyendo el de la polio 1 (Watts *et al.*, 1995), el virus de la hepatitis B (Zan *et al.*, 2007) y el virus del herpes simplex (Hajkova *et al.*, 2007). Según la literatura la concentración de TiO₂ requerida habitualmente para matar bacterias varía entre 100 y 1000 mg/L, dependiendo del tamaño de las partículas, de la intensidad y longitud de onda de la luz utilizada (Wei *et al.*, 1994). La actividad antibacteriana de TiO₂ se relaciona con la producción de ROS, especialmente radicales de hidroxilos libres y peróxido formado bajo irradiación UV-A (Kikuchi *et al.*, 1997). Una característica atractiva del TiO₂ es su potencial para ser activado por luz visible, por ejemplo, la luz del sol, mejora significativamente la desinfección, lo cual se puede lograr dopando su estructura o al ser acoplado a Nps metálicas de la plata, oro, paladio, etc.

Las membranas impregnadas con Nps son un ejemplo contundente de la aplicación de diferentes materiales en la desinfección de agua., Basado en las propiedades bactericidas que las Nps mantienen, se han logrado grandes resultados de desinfección. Actualmente, las geomembranas cumplen un papel importante en los sistemas de captación de agua, con los cuales se puede dar solución a las problemáticas de la escasez de agua y al mismo tiempo ejercer un efecto bactericida para mantener la calidad de agua.

1.6.4 Efectos de las nanopartículas en la membrana celular

En estudios previos se evaluó el efecto de la Nps sobre *E. coli*, en los cuales se confirmó que las células se dañaron, mostrando la formación de "hoyos" en la pared celular de la bacteria, mientras que las Nps de Ag se encontraron acumuladas en la membrana bacteriana. Una membrana con tal morfología exhibe un aumento significativo en la permeabilidad, lo que resulta en la muerte de la célula. En dicho estudio se aprecia la morfología de superficie tanto de la *E. coli* nativa (Figura 4a) como de la tratada (Figura 4b) en medio LB (Luria-Bertani), las células bacterianas tratadas cambiaron significativamente y mostraron un daño mayor, que se caracterizó por la formación de "fosas" en sus paredes celulares. El análisis TEM mostró claramente que las Nps se acumularon en la membrana, mientras que algunas penetraron con éxito en las células (Figura. 5 a y b).



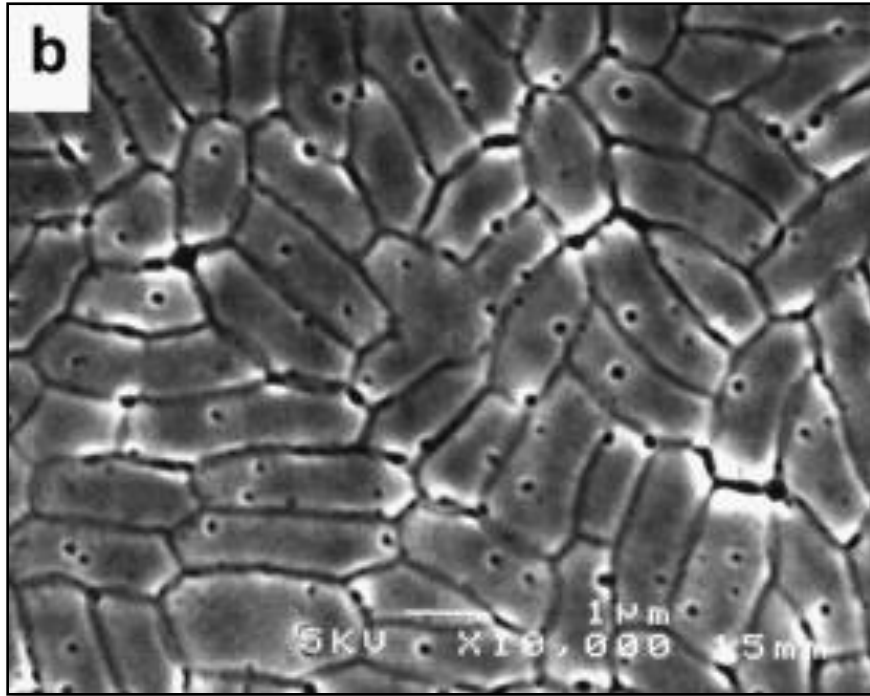
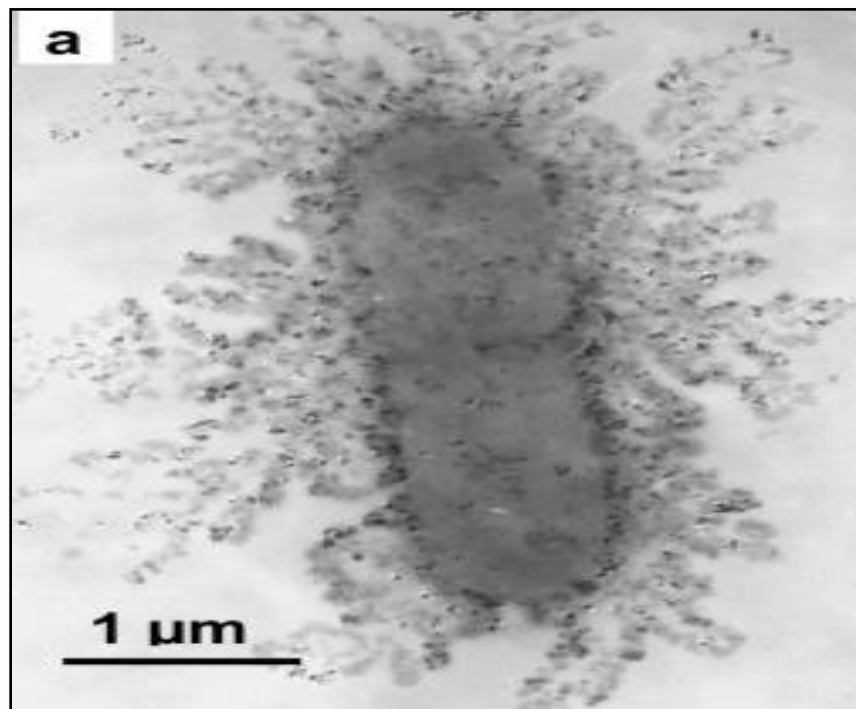


Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido 10, 000x de células nativas de *E. coli* (a) y células tratadas con Nps de plata en medio líquido LB durante 4 h (b) (Sondi y Salopek, 2004).



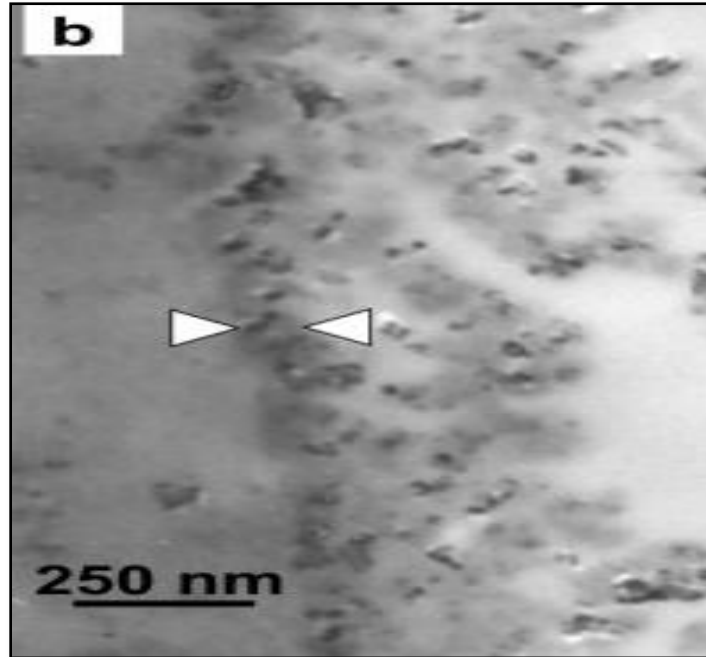


Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión de células de *E. coli* tratadas con de Nps de plata en medio líquido LB durante 1 h (a) y vista ampliada de la membrana de esta célula (b) (Sondi y Salopek, 2004).

1.6.5 Caracterización de nanopartículas: resonancia superficial de plasmón

La presencia de electrones libres en la banda de conducción de la superficie de las Nps metálicas, inducen una excitación colectiva de los electrones libres cuando se recibe un haz de luz incidente, la cual es detectada por el espectrofotómetro y se le llama polaritón del plasmón de superficie.

Para determinadas frecuencias, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y de la oscilación del polaritón; este fenómeno se llama resonancia del plasmón de superficie y tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color (Cornejo, 2015).

En las Nps de los metales nobles como el oro y la plata, la resonancia es máxima y su frecuencia se produce en el campo visible del espectro electromagnético. Esta resonancia se origina cuando el tamaño de las Nps es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente, $d < \lambda$. En estas circunstancias se producen excitaciones dipolares fuertes de los electrones libres en la superficie de la partícula; con la resonancia del plasmón se produce un fuerte acoplamiento de los electrones libres con el haz de luz incidente como consecuencia de los fotones absorbidos.

La frecuencia de resonancia y la anchura de banda de absorción del plasmón, dependen del tamaño y de la forma de las Nps (Figura 6). Esta dependencia permite seleccionar frecuencias de luz reflejada a las que van asociadas distintas energías y colores, desde la luz ultravioleta hasta las proximidades del campo infrarrojo. La posibilidad de modificar las frecuencias de resonancia es el origen de las propiedades óptico electrónicas de las Nps de oro y de plata principalmente.

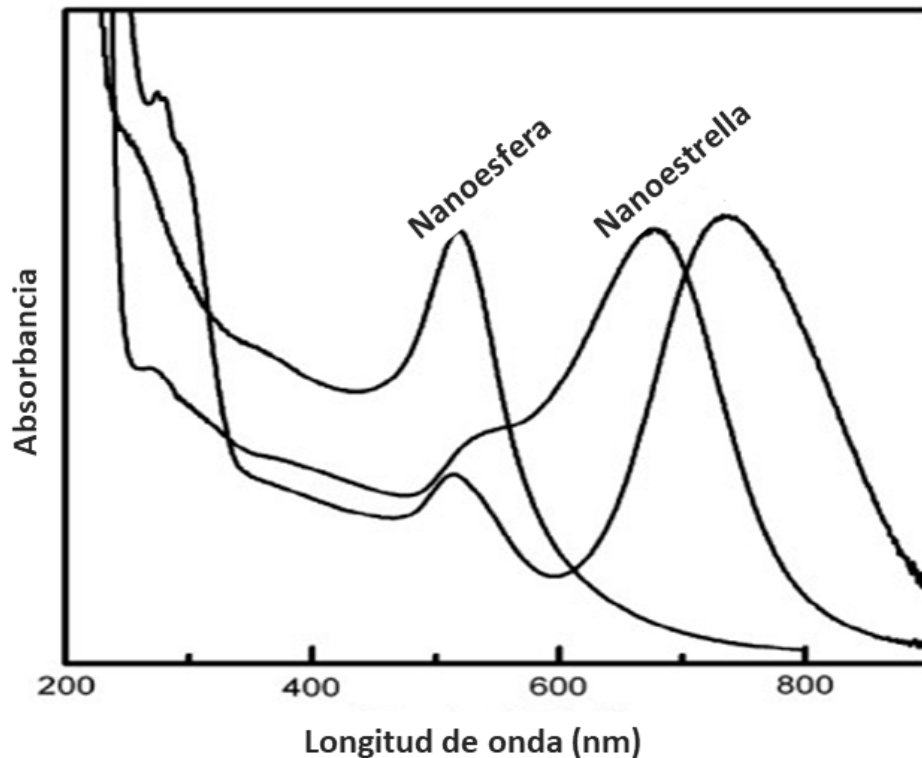


Figura 6. Variación de la longitud de onda absorbida con la forma de las Nps (Cornejo, 2015).

La resonancia superficial de plasmón (RPS) depende de la concentración de las Nps, de su distribución espacial y de las propiedades de la matriz que las rodea.

La energía de la resonancia del plasmón de superficie depende de la densidad del plasma de electrones libres y de la propiedad dieléctrica del medio que rodea la nanopartícula; esta energía aumenta con la frecuencia de resonancia a medida que disminuye el diámetro de la nanopartícula y cuando se cumple la condición $d < \lambda$, siendo λ la longitud de onda incidente expresada en nm.

Para las Nps de $d < 20$ nm, el ancho de banda del plasmón aumenta progresivamente, a medida que disminuye su tamaño; cuando el diámetro es $d > 20$ nm, la anchura de banda se desliza a longitudes de onda más largas, se producen multipolos y la oscilación es más compleja.

La modificación de la longitud de onda (frecuencia) transmitida de las Nps de tamaños de unos

pocos nanómetros, puede ser realizada modificando su forma. En la Figura 7 se muestra la relación entre el tipo de plasmón reflejado y la forma de la nanopartícula (Rivera y Mejía, 2016).

Cada nanopartícula presenta un rápido y fuerte espectro de absorción en las proximidades de longitudes de onda, en este caso las Nps de Zinc se presentan a 350 y 400.

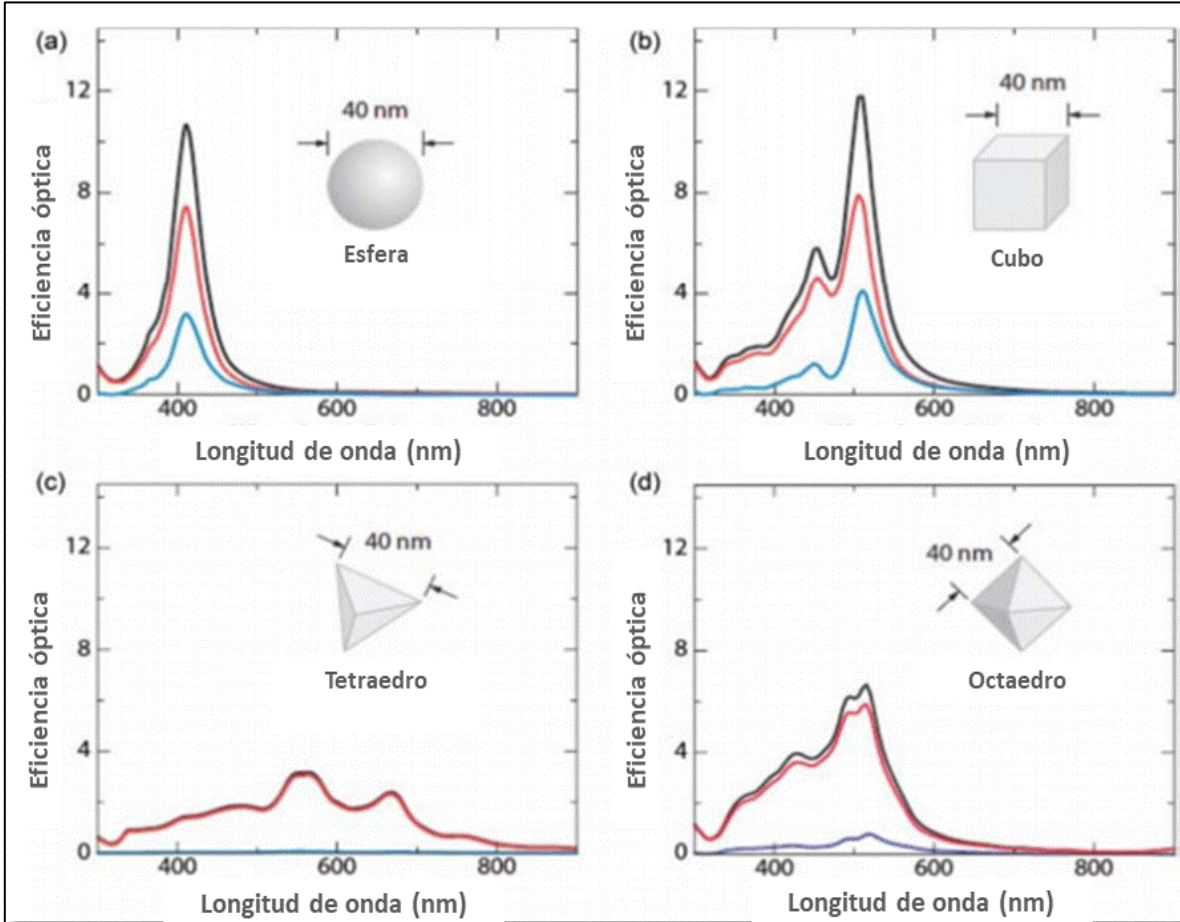


Figura 7. Variación de la longitud de onda absorbida conforme a la morfología de la nanopartícula (Rivera y Mejía, 2016).

El espectro de absorción de las Nps de plata se encuentra entre 300 y 400 nm. El valor máximo de la longitud de onda de transmisión se puede variar dentro de un amplio rango de valores $\lambda=393$ -738 nm, variando el color de la suspensión coloidal entre un amarillo claro y un color verde respectivamente. En la Figura 8 se muestra la longitud de onda a la cual se presentan las Nps de Ag y la variación de la morfología.

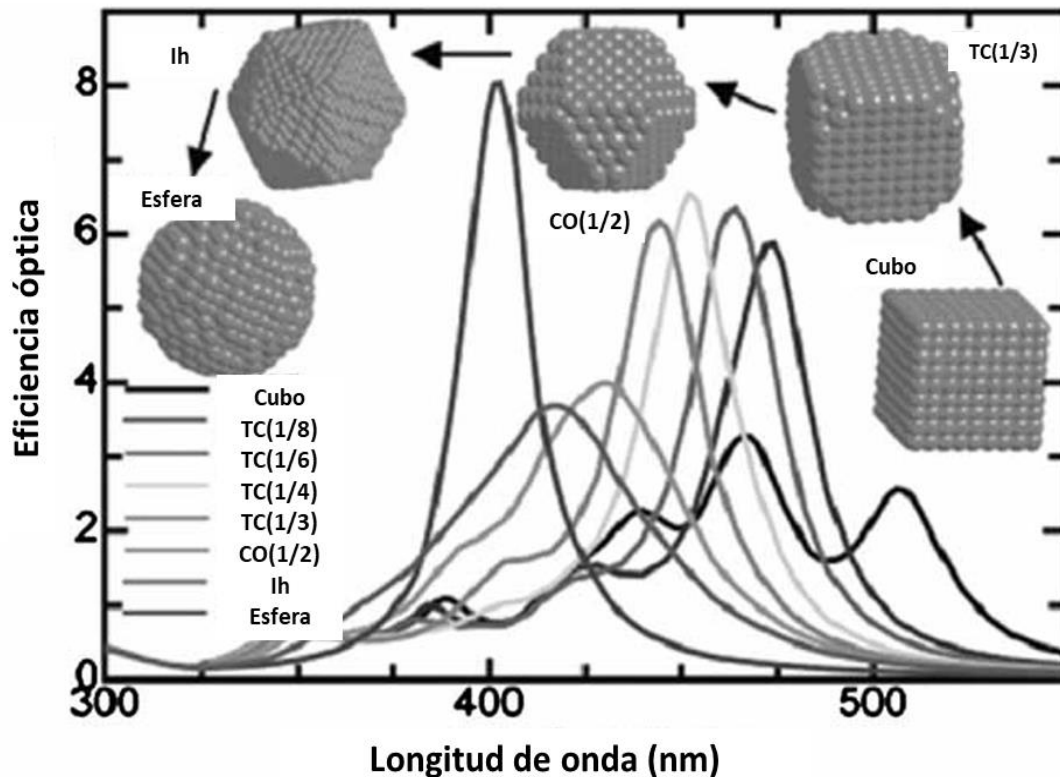


Figura 8. Relación entre la variación de longitud de onda y la morfología de Nps de Ag (Sau *et al.*, 2010).

1.7 Membranas en la desinfección de agua

El objetivo básico del tratamiento del agua es eliminar los constituyentes no deseados. Las membranas proporcionan una barrera física para dichos componentes en función de su tamaño, lo que permite el uso de fuentes de agua no convencionales. Como componente clave del tratamiento y la reutilización del agua, proporcionan un alto nivel de automatización, requieren menos uso de productos químicos, y la configuración modular permite un diseño flexible (Qu *et al.*, 2013).

Un desafío importante de la tecnología de la membrana es la compensación inherente entre la selectividad de la membrana y la permeabilidad. El alto consumo de energía es una barrera importante para la amplia aplicación de procesos de membrana accionados por presión. El ensuciamiento de la membrana aumenta el consumo de energía y la complejidad del diseño y operación del proceso. Además, es complicado mantener la vida útil de las membranas y los

módulos de membrana. El rendimiento de los sistemas de membrana depende en gran medida del material con el cual se constituye. Actualmente la impregnación de nanomateriales funcionales en las membranas ofrece una gran oportunidad para mejorar la permeabilidad de la membrana, la resistencia a las incrustaciones, la estabilidad mecánica y térmica, así como para crear nuevas funciones para la degradación de los contaminantes y la autolimpieza.

1.7.1 Membranas nanocompuestas

Un número significativo de estudios sobre nanotecnología de membrana se han enfocado en crear sinergismo o multifunción al agregar nanomateriales en membranas poliméricas o inorgánicas. Los nanomateriales utilizados para tales aplicaciones incluyen Nps de ZnO, Ag, y TiO₂, estas Nps inorgánicas ayudan a mejorar la estabilidad mecánica y térmica de las membranas poliméricas, reduciendo el impacto negativo de la compactación y el calor en la permeabilidad de la membrana (Ebert *et al.*, 2004, Pendergast *et al.*, 2010).

Los nanomateriales antimicrobianos como las Nps de Ag, pueden reducir el biofilm sobre la membrana una vez que estén injertadas en la superficie polimérica, esto ayuda a inhibir la unión bacteriana y la formación de biopelículas (Mauter *et al.*, 2011, Zodrow *et al.*, 2009) así como inactivar virus (De Gussemme *et al.*, 2011).

Las membranas incorporadas de Nps catalíticas (también conocidas como membranas reactivas) combinan su función de separación física y la reactividad de un catalizador hacia la degradación de contaminantes. Se han dedicado muchos esfuerzos para desarrollar membranas inorgánicas fotocatalíticas consistentes en nanocatalizadores, normalmente Nps de Titanio (TiO₂Nps) o TiO₂ modificado (Choi *et al.*, 2006a).

1.8 Geomembranas, usos y aplicaciones en sistemas de captación de agua

Además de las membranas, los geosintéticos han sido utilizados como barreras impermeables en las presas desde 1959, el uso de geosintéticos en sistemas hidráulicos tiene el potencial de crecer significativamente cuando se compara con el crecimiento esperado de la industria en otras áreas bien establecidas tales como transporte y sistemas ambientales. Si bien se han logrado avances significativos en ingeniería de geosintéticos, ya que las geomembranas se usaron por primera vez en estructuras hidráulicas, las investigaciones en curso y las evaluaciones de desempeño en el terreno continúan brindando información valiosa.

Las geomembranas se utilizaron por primera vez en una presa construida en Contrada Sabetta

(Italia), en 1959, la estructura involucró un relleno de roca y una presa de mampostería de escombros, donde una geomembrana de poliisobutileno de 2 mm de espesor se instaló durante la construcción (Sembenelli y Rodríguez 1996). El principal mecanismo de infiltración de agua a través de geomembranas fue debido a pequeños defectos, gracias a ello se han instalado sistemas de drenaje para recoger el agua que permea el revestimiento de la geomembrana con el fin de minimizar la infiltración en la estructura de la presa.

Actualmente las geomembranas tienen diferentes aplicaciones en el área de construcción entre las cuales destacan: forros para agua potable, agua de reserva, líquidos residuales, líquido de desecho radiactivo o peligroso, revestimientos para la contención secundaria de tanques de almacenamiento subterráneos, estanques solares, agricultura, industria, industria acuícola, estanques arquitectónicos, canales y canales de transporte de desechos, vertederos de residuos sólidos primarios, secundarios y terciarios y pilas de desechos, pilas de lixiviación, paredes verticales. Sin embargo, debido a las aplicaciones que se dan en forros de agua potable es importante identificar cual es el tipo de geomembrana que se debe emplear, así como las características de cada una (Manan *et al.*, 2015).

1.8.1 Tipos de geomembranas

Las geomembranas de polietileno se han usado ampliamente como barrera para líquidos o vapores para muchas aplicaciones diferentes. Entre los materiales de geomembrana disponibles en el mercado se encuentran : cloruro de polivinilo (PVC), polietileno clorado (CPE), polietileno clorosulfonado (CSPE), caucho de etileno propileno (EPDM), polipropileno (PP), LLDPE, polietileno de densidad media (MDPE), HDPE , geomembrana bituminosa, etc.

LLDPE y HDPE se seleccionan a menudo para geomembranas en aplicaciones expuestas, por ejemplo, cubiertas de vertederos y depósitos, revestimientos de estanques y canales, etc. Los costos de construcción para geomembranas expuestas son menores que de geomembranas enterradas cubiertas por suelos u otros materiales.

1.8.1.1 Geomembranas de cloruro de polivinilo plastificado (PVC-P)

Las geomembranas de cloruro de polivinilo plastificado (PVC-P) han sido el material más utilizado en la impermeabilización de yacimientos en España en los años 70 y 80. Desde ese punto de vista, la institución IRANOR creó un grupo de trabajo a fines de los años setenta que elaboró una regulación de PVC-P para utilizar esas geomembranas para la impermeabilización de depósitos y publicó un estándar para láminas homogéneas. Posteriormente, se desarrollaron otros métodos, por ejemplo, relacionados con fibra de vidrio y refuerzos de tela sintética, tanto resistente como no

resistente a materiales bituminosos y, para diferentes aplicaciones como Ingeniería Civil u Obras de Construcción (Manan *et al.*, 2015).

1.8.1.2 Terpolymer Rubber (EPDM)

Terpolymer rubber (EPDM) es el compuesto macromolecular de una geomembrana utilizada en obras hidráulicas y obras de construcción. EPDM tiene un uso extenso y podría considerarse la barrera sintética más utilizada en países como EE. UU.

1.8.1.3 Polietileno de alta densidad (HDPE)

HDPE se usa más comúnmente a nivel internacional debido a su disponibilidad y costo de material relativamente económico. El HDPE es un producto excelente para aplicaciones grandes que requieren resistencia a los rayos UV y al ozono, resistencia química o instalaciones de alta calidad. Típicamente utilizado en aplicaciones de vertederos y minería, este producto se entrega en rollos grandes con un ancho de 22.5 ' y es soldado por calor en el campo por técnicos capacitados que proporcionan una instalación certificada de alta calidad. Las geomembranas de HDPE ofrece el revestimiento más rentable para proyectos grandes. Se encuentra disponible en espesores que van de 40 a 120 mil. Los materiales de revestimiento de HDPE son una opción rentable para los proyectos de revestimiento expuestos. Este producto ha sido utilizado en vertederos, lagunas World Wide Technology (WWT), lagunas de desechos animales y aplicaciones mineras. En la Figura 9 se muestra el tipo de geomembrana utilizada en 237 de las presas alrededor del mundo. El cloruro de polivinilo (PVC) se ha utilizado en la mayoría de los proyectos, aunque varias formas de poliolefina (LLDPE y HDPE) también se han utilizado en una serie de aplicaciones (Zornberg, 2005).

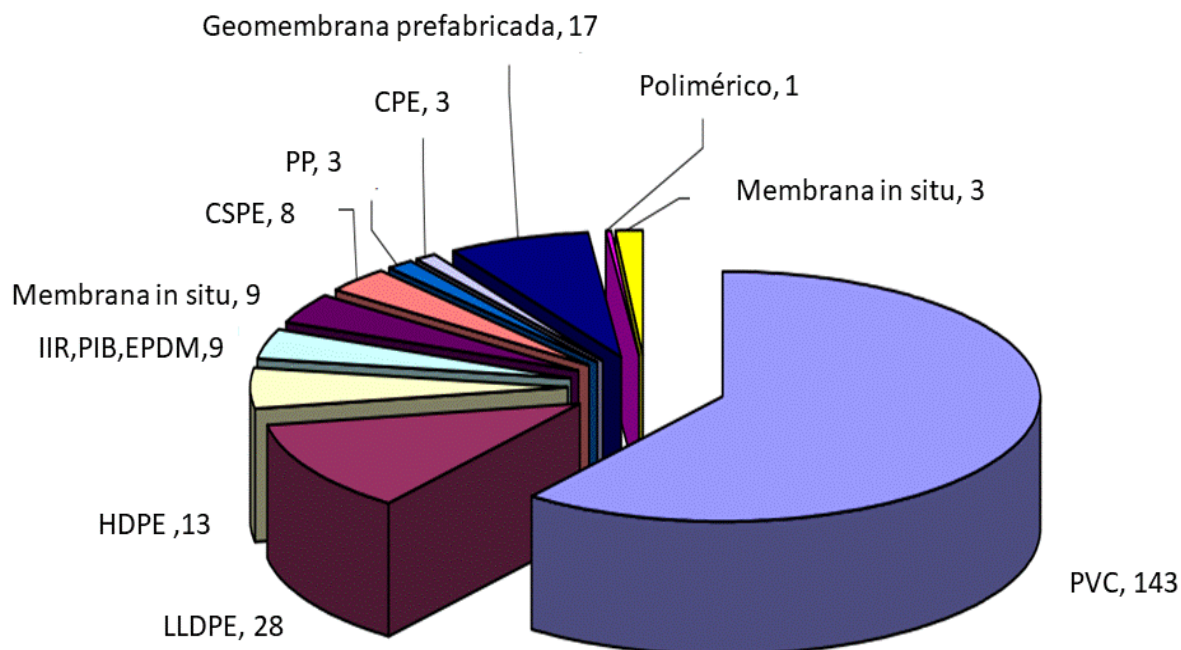


Figura 9.Tipos de geomembranas utilizadas en proyectos de presas (Zornberg, 2005).

1.8.2 Durabilidad de las geomembranas

Los resultados de monitoreo continuo estiman que la vida media de las geomembranas de HDPE para cubiertas, es de aproximadamente 450 años a una temperatura de 20 ° C. La vida media disminuye con la temperatura y se espera que sea menor para las resinas que no sean HDPE. Sin embargo, particularmente cuando se compara con la vida media que podría atribuirse a materiales como el hormigón, la longevidad de las geomembranas se considera excesivamente adecuada para aplicaciones hidráulicas. El cloruro de polivinilo plastificado (PVC-P), el polietileno de alta densidad (HDPE) y el caucho de terpolímero del monómero de etileno-propileno-dieno (EPDM) son tres tipos de geomembrana que son de comportamiento a largo plazo (Manan *et al.*, 2015).

Uno de los grandes retos del presente proyecto es prolongar el efecto bactericida de las Nps al soportarlas en geomembranas y mantener el efecto residual durante un largo periodo ya que actualmente la aplicación de una mayor concentración de biocida solo da como resultado una menor

prolongación de la vida útil del material. Al mismo tiempo del impacto ambiental, una desventaja inherente es la emisión de cantidades relativamente grandes de biocidas en el medio ambiente.

Un enfoque para limitar la cantidad de biocida necesaria, mientras se mantiene una resistencia biológica adecuada, es utilizar una tecnología de liberación lenta. La selección de un sistema de liberación adecuado permite mantener la concentración del agente activo por encima de la concentración de inhibición mínima efectiva (CMI), al mismo tiempo que disminuye la liberación inicial y la cantidad total de biocida necesaria (Figura 10).

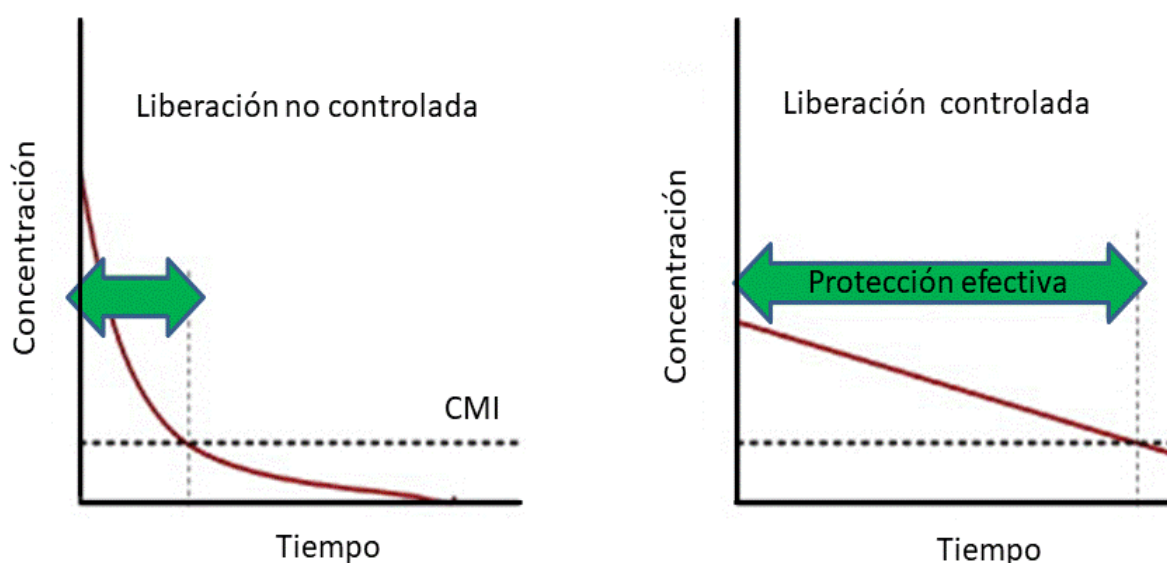


Figura 10. Efecto del sistema de liberación controlada sobre las concentraciones de biocidas a tiempo (CMI = concentración inhibitoria mínima) (Eversdijk *et al.*, 2012).

1.8.2.1 Biofilm

Entre los factores que afectan la duración de la geomembrana se encuentra el llamado biofilm. Existen varias teorías con respecto a la adhesión de los microorganismos. Mientras algunas se basan en las fuerzas de Lifshitz-Van der Waals, como también las fuerzas de atracción y repulsión; otras se inclinan por la teoría de la termodinámica, basada en la energía libre de adhesión, derivadas de las energías libres de superficie de la célula, y la superficie del sustrato. De otra parte, también se afirma que los apéndices de las superficies celulares o la excreción de adhesivos ayudan a la fijación, en mayor número, que las consideraciones estrictamente termodinámicas (Busscher *et al.*, 1997). Los microorganismos tienden a adherirse a superficies vivas o inertes para colonizarlas,

crecer y formar una matriz polimérica autoproducida, en la cual pueden confluír múltiples especies microbianas. A todo el conjunto se le denomina biofilm (Carpertier y Cerf, 1993).

La capacidad para formar biofilms no parece restringirse a algunos grupos específicos de microorganismos y se considera, que bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias pueden sobrevivir dentro de los biofilms (Donlan, 2002; Thomas y Nakaishi, 2006). Los biofilms son necesarios para permitir a la bacteria persistir y resistir las condiciones adversas del medio, mientras que el modo de crecimiento planctónico es importante para la propagación de bacterias.

La primera evidencia publicada sobre la existencia de un biofilm, fue la realizada por Duguid, Anderson y Campebell (1966), poniendo en evidencia la adhesión de *Salmonella* sobre superficies alimentarias. Desde entonces, se han publicado numerosos estudios que describen la habilidad de los microorganismos patógenos para formar biofilms, entre los que se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7 (Shi y Zhu, 2009).

1.8.2.2 Crecimiento de biofilm en superficies

El desarrollo de un biofilm puede ocurrir sobre casi todas las superficies y cualquier medio ambiente, en el que existan microorganismos viables presentes. En la mayoría de los casos, los microorganismos se adhieren a sustratos sólidos que pueden ser vivos o inanimados y/o a las formas inorgánica y orgánica, un requisito esencial para su supervivencia y reproducción normal (Kumar y Anand, 1998).

La fijación bacteriana a la superficie depende del tiempo, en el que las bacterias se unen activamente a las superficies por medio de apéndices, como los flagelos, pilis, adhesinas y cápsulas bacterianas. La alta energía libre y las superficies húmedas promueven la adhesión bacteriana, formando microcolonias de unión irreversible, donde las células ya no presentan movimiento browniano. A diferencia de la etapa de disposición de la superficie, el tiempo para que se produzca la adhesión celular depende de la especie bacteriana y los sustratos presentes en las superficies (Marshall, 1992; An y Friedman, 1998; Chmielewski y Frank, 2003). La formación de biofilms puede liderar serios problemas, en este caso puede impedir el contacto de la bacteria con la superficie de la geomembrana disminuyendo la eficacia de tratamiento y promover la rápida sustitución o lavado de la geomembrana.

Existen diferentes factores que afectan el desarrollo y estructura del biofilm, dentro de los cuales se pueden mencionar los siguientes: Las propiedades de la superficie, la disponibilidad de nutrientes, la composición de la comunidad microbiana, la disponibilidad de agua, la interacción

interespecífica, el transporte celular y la temperatura. (Chmielewski y Frank, 2003; Garret *et al.*, 2008; Shi y Zhu, 2009; Van Houdt y Michiels, 2010).

1.9 Estudios previos

En un estudio elaborado en el año 2011 en la Universidad de Bucaramanga, se sintetizaron Nps con tres agentes reductores: cisteína, aniones citrato e hidracina, obteniendo un mejor resultado con las AgNps que fueron sintetizadas a partir de hidracina, en dicho estudio se obtuvieron las siguientes concentraciones bactericida frente a *E. coli* 0.25 µg/L de AgNps para CMI y 1 µg/L de AgNps CMB (Paredes, 2011).

En otro estudio elaborado en el 2014 en la universidad de Barcelona España, se impregnaron superficies duras de poliéster con un área de 5x5 cm y un grosor de 1 cm (Figura 11) utilizando dos tipos de biocida, ZnO Nps, Ag Nps y ZnO Nps + Ag frente a *Staphylococcus aureus* y *E. coli* (Fontecha, 2014).

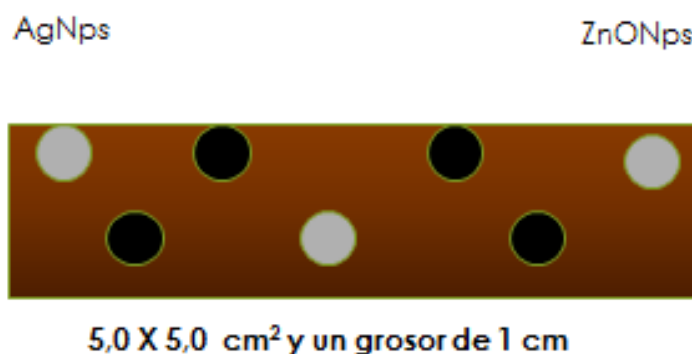


Figura 11. Superficies duras de poliéster impregnadas con Nps de Ag y ZnO (Fontecha, 2014).

Como resultados se observó que la superficie biocida con mezcla de Ag Nps + ZnO Nps en su concentración más alta de 850 mg/L Ag + 400 mg/L ZnO, fue la que presentó una mayor eficacia antimicrobiana, con un valor de 5.11 log 10 UFC (unidades formadoras de colonias)/cm² para *E. coli* y de 4.80 log 10 UFC/ cm² para *S. aureus* (Tabla 6).

Tabla 6: Eficacia antibacteriana de superficies duras de poliéster (Fontecha, 2014).

| Tipo de superficie biocida | Concentración mg/L | Eficacia antibacteriana | |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| Np ZnO | 400 | 0.12 ^{c k} ± 0.51 | 0.17 ^{d j} ± 0.58 |
| | 500 | 0.25 ^{c j} ± 0.71 | 0.47 ^{c j} ± 0.83 |
| | 650 | 0.83 ^{b l} ± 0.57 | 0.83 ^{b H} ± 0.65 |
| | 850 | 2.07 ^{a H} ± 1.01 | 1.19 ^{a G} ± 0.92 |
| Np Ag | 400 | 2.35 ^{d G} ± 0.46 | 2.38 ^{c F} ± 0.41 |
| | 500 | 4.14 ^{c F} ± 0.44 | 2.89 ^{b E} ± 0.33 |
| | 650 | 4.67 ^{b DE} ± 0.40 | 3.62 ^{a CD} ± 0.43 |
| | 850 | 4.90 ^{a BC} ± 0.31 | 3.84 ^{a C} ± 0.37 |
| Np Ag + Np ZnO | 400+400 | 4.57 ^{d E} ± 0.36 | 3.63 ^{c D} ± 0.33 |
| | 500+400 | 4.75 ^{c CD} ± 0.37 | 3.77 ^{c C} ± 0.41 |
| | 650+400 | 4.89 ^{b C} ± 0.36 | 4.39 ^{b B} ± 0.41 |
| | 850+400 | 5.11 ^{a A} ± 0.31 | 4.80 ^{a A} ± 0.47 |

Recuentos bacterianos medidos expresados en log₁₀ UFC cm⁻²

En otro estudio realizado en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por Sánchez (2017) se evaluó la eficiencia en la eliminación de *E. coli* con tres materiales elaborados a partir de polietileno y fueron impregnados a diferentes concentraciones de ZnO/Ag y plata iónica. Los materiales empleados en el estudio fueron Abact 425 (6.046 mg/L Ag), Pafi PI 021 (2.492 mg/L Ag + 18.31 mg/L ZnO) y finalmente Silver Plus ZnO al 7% (0.439 mg/L Ag + 216 mg/L ZnO). La cuantificación del crecimiento microbiano se realizó mediante cinéticas y se colocaron los materiales en matraces Erlenmeyer, cada matraz fue inoculado con *E. coli* utilizando como método de cuantificación la escala de Mc Farland, 1907 (Figura 12).



Figura 12. Pellets impregnados de Nps de plata y zinc para la evaluación del crecimiento microbiano (Sánchez, 2017)

Al finalizar las cinéticas de crecimiento bacteriano se identificó que el lecho de plástico antimicrobiano basado en Silver Plus ZnO 7% (0.439 mg/L de Ag y 216 mg/L de ZnO) fue el material con el cual se obtuvo una mayor eficiencia frente a la eliminación de *E. coli*, al lograr inhibir un 99 % del crecimiento microbiano, seguido de Abact 425 con un 11%, mientras que Pafi PI 021 no presentó inhibición (Tabla 7).

Tabla 7: Eliminación de *E. coli* con Nps de Zinc y Plata (Sánchez, 2017).

| ID material | Concentración de Óxido de Zinc (mg/L) | Concentración de Plata (mg/L) | Porcentaje de inhibición (%) |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Silver plus ZnO al 7% | 216 | 0.439 | 99.9 |
| Abact 425 PI | 0 | 6.046 | 11 |
| Pafi Mx PI 021 | 18.31 | 2.492 | No presentó |
| Control | 0 | 0 | No presentó |

Como resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), los valores obtenidos fueron de 22 mg/L de ZnO y 0.05 mg/L de Ag para CMI, mientras que para la CMB se obtuvieron valores de 216 mg/L de ZnO y 0.439 mg/L de Ag respectivamente. En este último estudio se evaluó la durabilidad del efecto bactericida en los pellets de polietileno, para el cual se presume su tiempo de vida es de 1000 días aproximadamente.

Los estudios mostrados anteriormente son el resultado de la impregnación de Nps metálicas en diferentes superficies, sin embargo, actualmente no existen estudios donde se evalúe el efecto bactericida de las Nps metálicas soportadas en geomembranas comerciales, que puedan proporcionar un efecto bactericida frente a *E. coli* y puedan servir como recubrimiento en sistemas de captación de agua.

Con base a lo anterior surge el presente proyecto el cual tiene como objetivo evaluar el efecto bactericida de las Nps de plata y zinc soportadas en geomembranas comerciales, las cuales se pretende sean utilizadas como método de desinfección para agua, que presenten un efecto residual durante el tratamiento y funjan como un sistema de almacenamiento o captación de agua potable.

2. Materiales y métodos para evaluar la eliminación de *Escherichia coli* en agua estancada y la caracterización de geomembranas impregnadas con nanopartículas metálicas

2.1 Propiedades y características de las geomembranas

En este trabajo de investigación se evaluaron superficies basadas en materiales plásticos impregnados con partículas de carácter antibacteriano, las cuales se conforman con Nps base Ag y ZnO. Para ello, mediante un proceso de extrusión de película plana se fabricó una capa de la membrana de plástico con un espesor de 25 micras. El proceso para fabricar una película plana consistió en fundir el material plástico, previamente mezclado con las Nps de carácter antimicrobiano, usando un husillo “tornillo” de transporte con calentamiento a una temperatura entre 160 a 210°C, para posteriormente hacerlo pasar a través de una apertura conocida como “dado” que moldea el plástico fundido en forma de película plana (Figura 13).

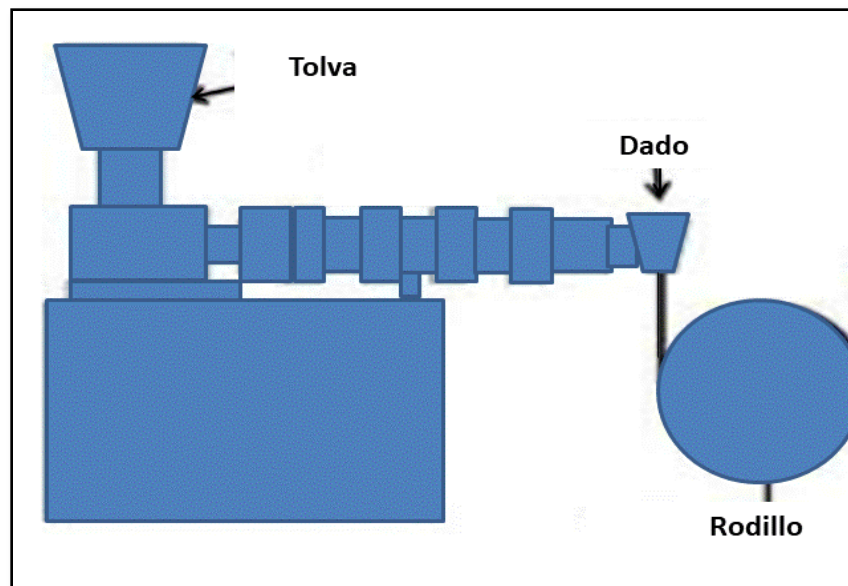


Figura 13. Esquema de fabricación de la capa de plástico con carácter antimicrobiano para su uso en geomembranas (Valle, 1993).

Para el desarrollo del presente proyecto se proporcionaron cinco geomembranas elaboradas con base a poliolefinas (polietileno y polipropileno) las cuales están impregnadas de Nps de zinc y plata (Tabla 8). En este estudio se emplearon equipos y materiales de laboratorio que se enlistan en la Tabla 9.

Tabla 8. Geomembranas utilizadas para la eliminación de *E. coli*

| Geomembrana | Nombre | Composición reportada por el fabricante |
|--------------------|---------------------|---|
| 1 | PE4F2 400 | Hasta 400 ppm de ZnO y hasta 200 ppm de plata En plástico de polietileno |
| 2 | Silver Plus 200 2E | Hasta 200 ppm de ZnO y hasta 127 ppm de plata En plástico de polietileno |
| 3 | Silver Plus 200 2PP | Hasta 200 ppm de ZnO y hasta 200 ppm de plata En plástico de polipropileno |
| 4 | Silver Plus 500 PP | Hasta 500 ppm de ZnO y hasta 300 ppm de plata En plástico de polipropileno |
| 5 | Silver Plus 1000 PP | Hasta 1000 ppm de ZnO y hasta 600 ppm de plata |

Tabla 9. Equipos utilizados durante el estudio

| No. | Nombre del equipo | Marca | Modelo | No. serie |
|-----|--|--------------|--------------|------------------|
| 1 | Autoclave | Hinotek | YX-280B | 125-1724 |
| 2 | Balanza analítica | Ohaus | EP214C | I0851125081588 P |
| 3 | Campana de extracción | - | - | - |
| 4 | Destilador | FELISA | FE-390 | 1301070 |
| 5 | Espectrofotómetro de absorción atómica | Perkin Elmer | AAAnalyst400 | 2015-1401-2003 |
| 6 | Espectrofotómetro UV-Visible | HACH | DR 5000 | 1302661 |
| 7 | Incubadora con agitación e iluminación | Lumistell | IRO-70 | 14038IRO70 |
| 8 | Mufla | NOVATECH | MD-20 | 58014 |
| 9 | Parrilla de calentamiento con agitación múltiple | IKA | RT-10PS1 | 3.385928 |
| 10 | Agitador Vortex | Corning | 6775 | S3101225 |
| 11 | Campana de flujo laminar | NOVATECH | CFLH-90 | 058962 |
| 12 | Microscopio óptico | Carl Zeiss | Primo Star | 415500 |

2.2 Análisis de la concentración inicial de nanopartículas de Ag y Zn en las geomembranas

Se pesaron las geomembranas en la balanza manteniendo un peso promedio de 1.3 g. Cada geomembrana se colocó en un crisol y se llevó a la mufla a una temperatura de 600° C durante 20 minutos para calcinar el contenido orgánico y mantener solo la composición inorgánica.

Se retiraron los crisoles de la mufla y fueron colocados en la estufa hasta alcanzar una temperatura ambiente. Las cenizas se vaciaron en un vaso de precipitados de 50 ml y se añadieron 10 mL de HCl al 10% y 15 mL de HNO₃ al 20 %, cada vaso fue colocado en una parrilla corning a una

temperatura de 100 °C durante 20 minutos dentro de la campana de extracción, una vez que se disolvieron las cenizas en el medio ácido, la solución fue vaciada a un matraz de 50 ml y se aforó con agua destilada (Figura 14).

Para realizar la determinación de Ag y Zn en las geomembranas se utilizó Espectroscopia de Absorción Atómica en Flama (EAA), dicho análisis tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que presentan niveles energéticos cuya diferencia en energía corresponde en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la ley de Beer, que relaciona ésta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos (Harvey y Rodríguez, 2002).

El estudio de absorción atómica se realizó en el equipo PerkinElmer Analyst 400, los gases utilizados fueron acetileno Infra® a una pureza de 99.6 %, y aire comprimido Infra® extra seco. El análisis de Zn se llevó a cabo a 213.86 nm, con estándares de 1, 10, 100, y 1000 mg/L, mientras que la Ag se analizó a 328.07 nm, con estándares de 1.6, 16 y 160 mg/L, los límites de detección del equipo son de 0.008 para el Zn y de 0.0001 para Ag.

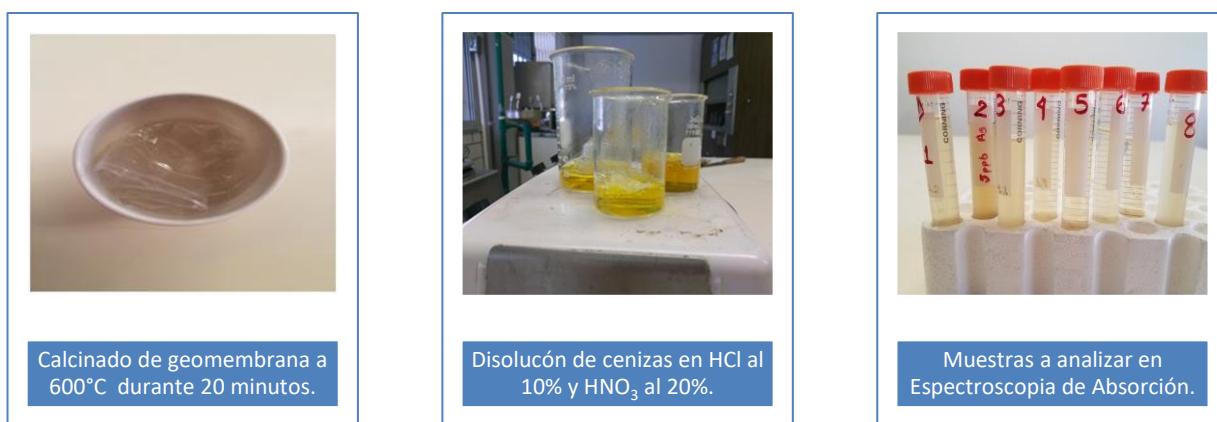


Figura 14. Preparación de muestras para el estudio de espectroscopia de absorción atómica

2.3 Cinéticas de crecimiento de *E. coli*

2.3.1 Preparación del material

Para la implementación de las cinéticas fue necesario el uso de tubos de ensaye especiales con dimensiones de 2.5 cm de ancho x 20 cm de largo según lo establecido en la norma HS 1001, en la cual se muestra el procedimiento para evaluar la migración global de plásticos que están destinados a entrar en contacto con alimentos, lo anterior considerando que las geomembranas pueden ser implementadas en sistemas de captación de agua potable para consumo humano. Durante el estudio se cortaron cuatro tiras de cada geomembrana a una longitud de 2.5 x 20 cm y se fijó cada geomembrana en soporte plástico, el objetivo de éste fue mantener la geomembrana rígida para permitir el contacto directo con la solución dentro del tubo y evitar que se desplazara hacia la superficie (Figura 15). Finalmente se colocó todo el sistema dentro del tubo.

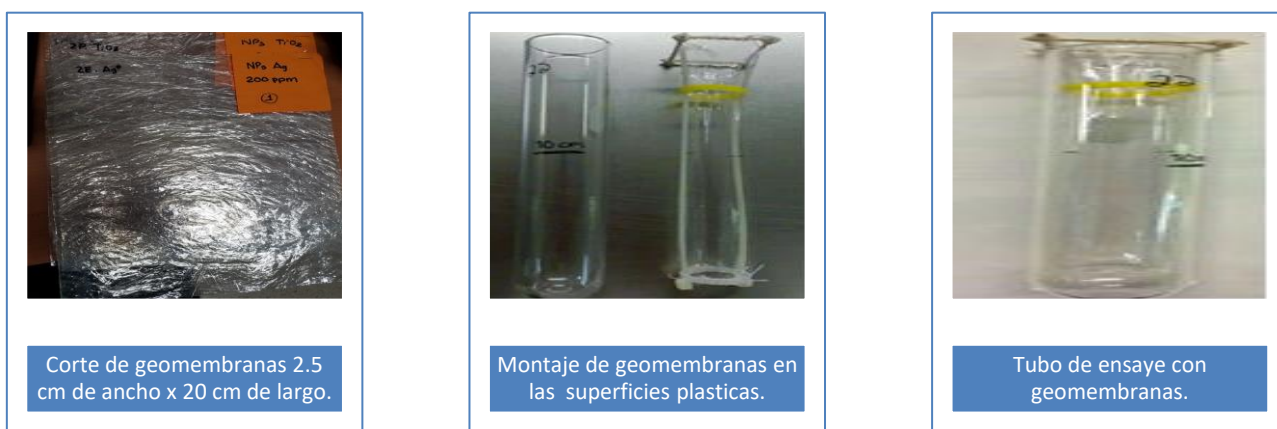


Figura 15. Corte y montaje de las geomembranas en los tubos de ensaye.

Una vez soportadas las geomembranas en los tubos se procedió a esterilizar el material para eliminar la carga microbiana patógena y no patógena. Los tubos se recubrieron con papel kraft, sellados con cinta para esterilizar y fueron puestos en autoclave a 125°C durante 20 minutos.

2.3.3 Cuantificación de *E. coli*

Como medio de cultivo se utilizó agua peptonada la cual contiene 10 g de peptona de carne y 5 g de NaCl en 1000 mL. Se agregaron 80 mL del medio de cultivo a los tubos de ensaye que ya habían sido previamente esterilizados. Cada tubo de ensaye se inoculó con *E. coli* a una densidad óptica inicial de 0.5 en la escala de Mc Farland equivalente a 10^8 bacterias/ml. Se colocaron los tubos a

37°C, 200 rpm en una incubadora y la medición del crecimiento se realizó cada hora hasta alcanzar 24 seguidas, en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm con la ayuda de celdas Hach, el blanco empleado fue agua peptonada sin microorganismos (Paredes, 2011).

Durante las cinéticas se utilizó una geomembrana sin Nps inmersa en el medio de cultivo como control y a partir de ella se determinó el crecimiento estándar del microorganismo, los experimentos se realizaron por triplicado.

2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano. La concentración mínima bactericida (CMB) se define como la concentración mínima que previene todo el crecimiento detectable, es decir el 99.9% de la población bacteriana (Korting y Hartinger, 1998). La pruebas de CMI y CMB se realizaron únicamente con la geomembrana Silver Plus 200 2E que presentó mayor efecto en la eliminación *E. coli*.

Las condiciones de temperatura y movimiento fueron las mismas que las cinéticas crecimiento, la única variable modificada fue la concentración de ZnO y Ag, se colocaron cinco concentraciones diferentes en cada experimento (Tabla 10). La cinética se realizó durante 24 horas y se analizó el crecimiento de *E coli* en el espectrofotómetro a 600 nm al igual que en las anteriores (Paredes, 2011).

Tabla 10. Concentraciones empleadas para evaluar CMI y CMB en la geomembrana Silver Plus 200 2E.

| Experimento | Concentración de ZnO + Ag (mg/L) |
|-------------|----------------------------------|
| 1 | 7.5 + 0.18, |
| 2 | 15 + 0.37 |
| 3 | 30 + 0.75 |
| 4 | 45 + 1.5 |
| 5 | 60 + 2.1 |

2.5 Adaptabilidad de las geomembranas a diferentes temperaturas

Una de las propiedades que deben presentar las geomembranas es la funcionalidad a diferentes temperaturas, ya que a partir de esta variable se puede determinar su aplicación en diferentes ambientes. El estudio se realizó a la temperatura de 30, 40 y 50 °C y a 0 rpm. El medio de crecimiento fue agua peptonada y se inoculó con *E. coli* con una D.O. inicial de 0.5, la medición se realizó en el espectrofotómetro a 600 nm durante 12 horas.

2.6 Resonancia superficial de plasmones (RSP)

El estudio de RSP sirve para identificar Nps de Zn y Ag en solución. Lo anterior con el objetivo de identificar el desprendimiento de Nps, provenientes de la geomembrana que se mantuvo en contacto con el agua peptonada. Se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en una rejilla de cuarzo (Rivera y Mejía, 2016). El análisis se llevó a cabo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 0 a 1000 nm, se utilizó como blanco agua peptonada sin Nps (Figura 16).

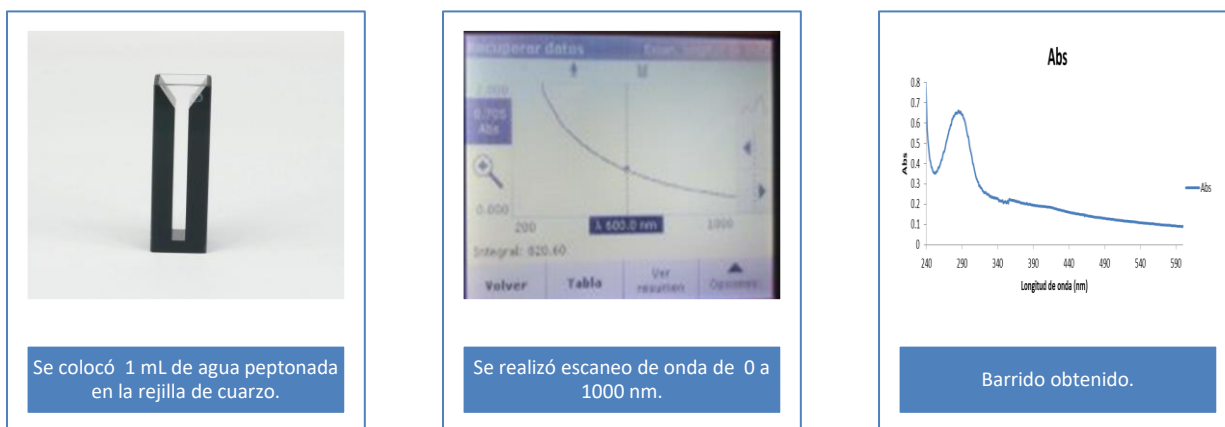


Figura 16. Análisis de plasmón superficial que se origina del medio peptonado donde se llevó a cabo el tratamiento de inmersión de la geomembrana.

2.7 Liberación de nanopartículas de zinc y plata

En cada tubo se añadieron 80 mL de agua peptonada, hasta alcanzar una altura de 10 cm, los tubos con las geomembranas se incubaron a 200 rpm y a 37 °C. Cada semana se tomó una muestra de 5 mL y se les realizó un filtrado para analizar en EAA (Figura 17).

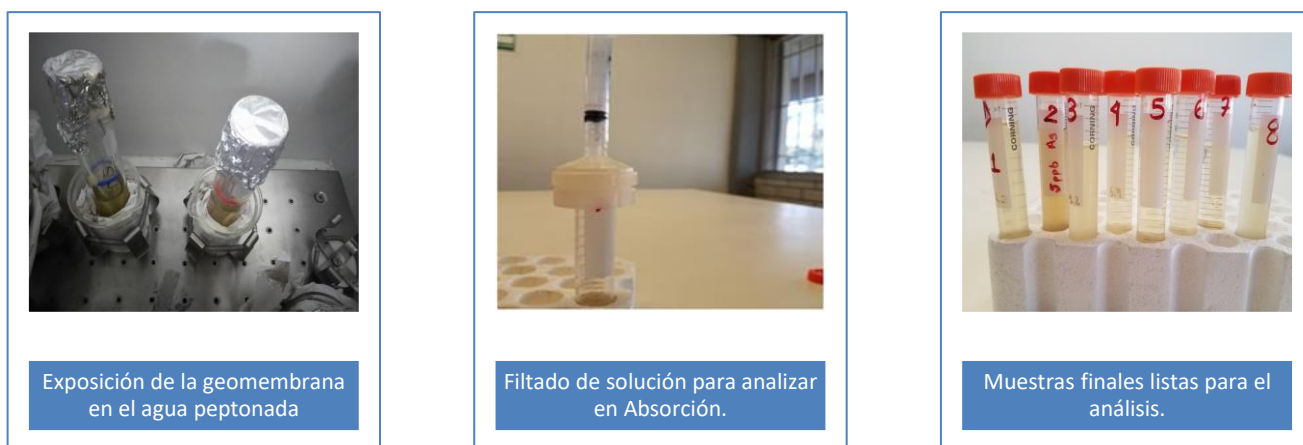


Figura 17. Preparación de muestras para analizar Zn y Ag desprendidos de las geomembranas.

2.8 Formación de biofilm

Se preparó el material a las mismas condiciones de las cinéticas de crecimiento, pero esta vez se incubaron los tubos durante 60 días, y se tomó una muestra cada 20 días de la geomembrana Silver Plus 200 2E.

Se cortaron partes de la geomembrana de 1x1 cm, y se les realizó la tinción gram negativa para identificar la presencia de *E. coli*. Se colocó en el portaobjetos la muestra de geomembrana, se realizó el frotis y se dejó secar. Posterior a ello, se fijó la muestra en el porta objetos pasándolo a través de la llama del mechero, se cubrió con unas gotas de cristal violeta durante 1 minuto y se lavó el exceso de colorante con agua. Se añadió lugol durante 1 minuto y se lavó nuevamente el exceso con agua. Finalmente, se lavó la preparación con alcohol durante 30 segundos, se cubrió con safranina durante 1 minuto y se retiró el exceso de colorante con agua (Vázquez *et al.*, 2011). Se observaron las muestras en el microscopio óptico marca Carl Zeiss a un aumento de 10, 40 y 100x con aceite de inmersión (Figura 18).

Como parte complementaria se realizó un análisis en el MEB de las bacterias adheridas en la geomembrana. Como medio de soporte se emplearon pines stub, éstos fueron recubiertos con cita de carbón y se colocó una muestra de 0.5 x 0.5 cm de la geomembrana Silver Plus 200 2E antes y después del tratamiento con *E. coli*. Las muestras fueron recubiertas de oro paladio y se analizaron a un aumento de x5000 en el Instituto de Metalurgia de la UASLP.

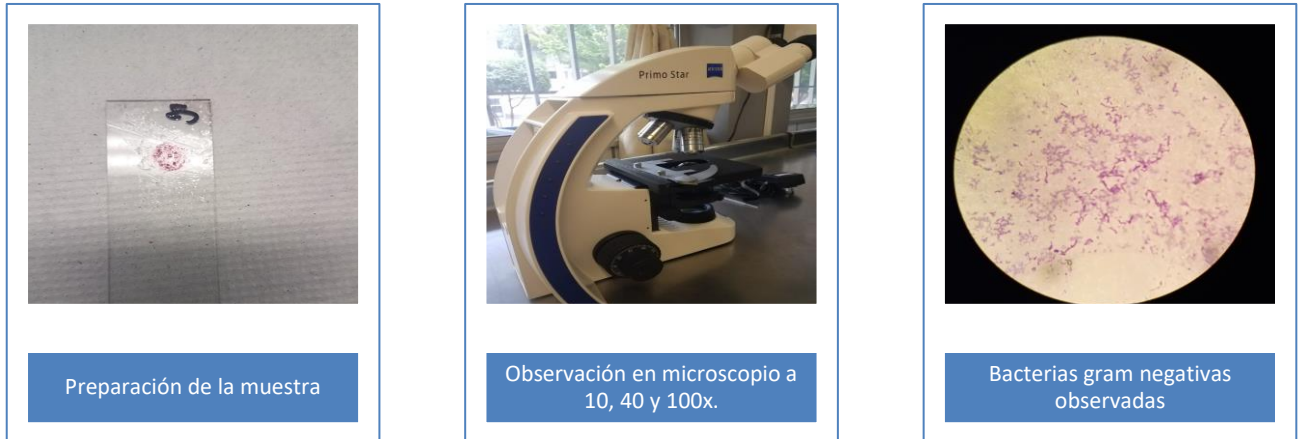


Figura 18. Identificación de *E. coli* en la geomembrana Silver Plus 200 2E por microscopio óptico.

3. Resultados del efecto bactericida de las geomembranas impregnadas con nanopartículas metálicas sobre *Escherichia coli* en agua estancada

3.1 Concentración inicial de plata y zinc en las geomembranas

Como resultados del análisis por EAA se obtuvieron las siguientes concentraciones mostradas en la Tabla 11.

Tabla 11. Concentración de Nps Ag y ZnO en cada geomembrana

| Membrana | Nombre | ZnO (mg/L) | Ag (mg/L) |
|----------|---------------------|------------|-----------|
| 1 | PE4F2 400 | 24.30 | 2.47 |
| 2 | Silver Plus 200 2E | 60.93 | 2.61 |
| 3 | Silver Plus 200 2PP | 9.43 | 1.31 |
| 4 | Silver Plus 500 PP | 5.44 | 1.23 |
| 5 | Silver Plus 1000 PP | 15.60 | 0.12 |

Los resultados indican que la concentración más alta de ZnO y Ag se encuentra en Silver Plus 200 2E con 60.93 mg/L de ZnO y 2.61 mg/L de Ag. La determinación de la concentración es importante ya que a partir de ella se puede identificar si es suficiente el activo antimicrobiano para ejercer un efecto bactericida en *E. coli*, de lo contrario, será necesario impregnar las geomembranas a concentraciones más altas.

Las concentraciones utilizadas en el presente proyecto son más bajas que las reportadas en la literatura. Fontecha (2014) impregnó superficies poliméricas a una concentración de 400 mg/L de Ag y 400 mg/L de ZnO, mientras que Sánchez (2017) impregnó pellets de polietileno a concentraciones de 216 mg/L de ZnO y 0.439 mg/L de Ag.

3. 2 Resultados de la cinética de crecimiento

La evaluación de la cinética de crecimiento permitió determinar cuál es la geomembrana que presentó un mayor efecto en eliminar a *E. coli*. En la Figura 19 se aprecia que solo tres geomembranas presentaron efecto en la eliminación de *E. coli*. Las membranas fueron: 1) Silver Plus 200 2E con una concentración de 60.93 mg/L ZnO y 2.61 mg/L Ag como la mejor geomembrana al eliminar el microorganismo desde la segunda hora, 2) PE4F2 400 a una concentración de 24.30 mg/l ZnO y 2.47 mg/L Ag, la cual presentó un freno al crecimiento del microorganismo mas no es su totalidad, y 3) Silver Plus 1000 PP con 15.60 mg/l ZnO y 0.12 mg/L Ag que presentó un efecto mínimo y llegó a comportarse de manera muy similar al control.

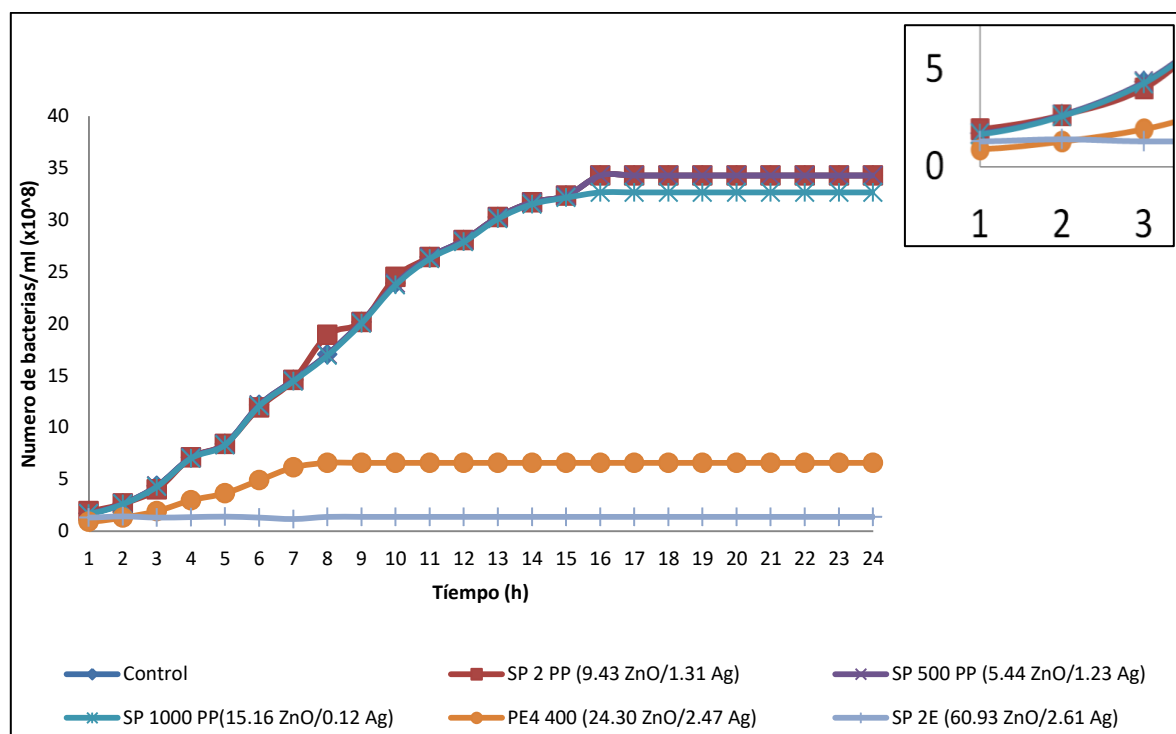


Figura 19. Efecto bactericida de las cinco geomembranas frente a *E. coli*.

En la Tabla 12 se muestra Silver Plus 200 2E como el mejor material bactericida al eliminar 99.78 % de los microorganismos, seguido se encuentra PE4F2 400 con un porcentaje de 82.95% y finalmente Silver Plus 1000 PP con un porcentaje de eliminación del 5%.

Obtener un porcentaje de eliminación del 99% es destacado ya que según la EPA (1999) uno de los principales objetivos de la desinfección de agua es lograr la inactivación de los microorganismos patógenos en su totalidad, dicha geomembrana además de eliminar al microorganismo, presentó

efecto residual durante las 24 horas de análisis, por lo cual se cumple con el supuesto de prevención del rebrote de microorganismos que establece la misma agencia.

Tabla 12. Porcentajes de eliminación de *E. coli* obtenidos con cada geomembrana.

| Material | Nombre | Porcentaje de eliminación % |
|----------|---|-----------------------------|
| 1 | PE4F2 400 (24.30 mg/l ZnO y 2.47 mg/L Ag) | 82.95 |
| 2 | Silver Plus 200 2E (60.93mg/l ZnO y 2.61 mg/L Ag). | 99.78 |
| 3 | Silver Plus 200 2PP (9.43 mg/l ZnO y 1.31 mg/L Ag) | 0 |
| 4 | Silver Plus 500 PP (5.44 mg/l ZnO y 1.23 mg/L Ag) | 0 |
| 5 | Silver Plus 1000 PP (15.60 mg/l ZnO y 0.12 mg/L Ag) | 5 |

Uno de los factores que le aumentaron el desempeño de la geomembrana Silver Plus 200 2E, fue a que las Nps de ZnO y Ag se encuentran impregnadas en la superficie de la geomembrana, lo cual provoca un mayor contacto con la membrana celular de *E. coli* y causa la muerte de manera más rápida (Figura 20), comparado con las geomembranas restantes las cuales tienen las Nps de manera inmersa y se puede dificultar el contacto con el microorganismo. Con base al estudio realizado por Fontecha (2014) y Sánchez (2017), se considera un supuesto similar, ya que en ambos casos, los materiales empleados presentaban la impregnación de Nps en el interior lo cual pudo afectar el contacto nanopartículas-microorganismo y hacer más lento el proceso.

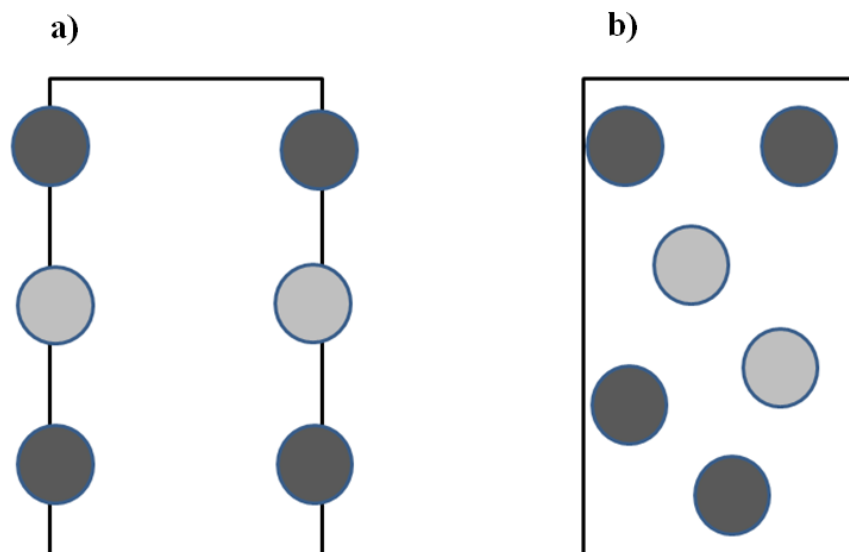


Figura 20. Distribución de Nps en la geomembrana Silver Plus 200 2E (a), distribución de Nps en geomembranas restantes (b).

Con los resultados obtenidos, se muestra que en el presente estudio se optimiza el uso de las Nps de ZnO y Ag con el uso de geomembranas, debido a que se impregnan las Nps de manera superficial sin generar pérdidas de área. En la Tabla 13 se muestra un comparativo de la eficacia antibacteriana obtenida por Fontecha (2014), Sánchez (2017) y el estudio actual. Fontecha (2014), a pesar de tener una mayor concentración de Nps (850 mg/L Ag y 400 mg/L ZnO) logró eliminar una concentración más baja de microorganismos. Por otra parte Sánchez (2017), reportó concentraciones de Nps de ZnO tres veces más grandes a la concentración actual, y logró eliminar lo equivalente al presente estudio.

La acción inhibitoria de las Nps sobre los microorganismos es parcialmente conocido. Se cree que el ADN pierde su capacidad de replicación y las proteínas celulares se inactivan en el tratamiento con Ag (Feng *et al.*, 2000). Hay informes en la literatura que muestran que la atracción electrostática entre las células bacterianas cargadas negativamente y las Nps con carga positiva es crucial para la actividad de las Nps como materiales bactericidas (Stoimenov *et al.*, 2002).

Sin embargo, es necesario observar el efecto de las Nps en el microorganismo mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) para corroborar la presencia éstas en la membrana celular.

Tabla 13. Comparativo de la eliminación de *E. coli* con estudios previos.

| Estudio | Área biocida | Concentración mg/L | | Eficacia antibacteriana |
|-----------------|------------------|--------------------|---------|--|
| | | Nps Ag+ | Nps ZnO | |
| Fontecha (2014) | (5 x 5 x 1 cm) | 850 | 400 | 128,824.95 bacterias /cm ² |
| Sánchez (2017) | (4 x 4 x 0.5 cm) | 0.4 | 216 | 3,500,000,000 bacterias/ cm ² |
| Estudio actual | (10 x 2.5 cm) | 2.6 | 60.9 | 3,500,000,000 bacterias/ cm ² |

3.3 Resultados concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida con Silver Plus 200 2E.

En la Figura 21 se muestran los resultados de la CMI y CMB, a diferentes concentraciones de la geomembrana Silver Plus 200 2E, donde se aprecia que CMI es una dosis dependiente, y que a mayor concentración de Nps se obtiene un mayor efecto bactericida, para entender lo anterior, en la Tabla 14 se establecieron los porcentajes de inhibición frente a *E. coli* obtenidos durante el estudio. En ésta tabla se muestra que a una concentración de 15 mg/L de ZnO y 0.37 mg/L de Ag se inhibió el 17 % de los microorganismos, por lo tanto se considera como CMI ya que fue la concentración más baja que se necesita para ver efecto sobre *E. coli*, dicho supuesto se corrobora al observar el experimento uno, el cual contiene una concentración más baja de Nps y no presentó efecto en el microorganismo.

El valor de CMB se identificó a una concentración de 60 mg/L ZnO y 2.61 mg/l de Ag ya que inhibió el 99 % de *E. coli*, tal como lo estableció Korting y Hartinger (1998).

Al comparar el estudio realizado por Sánchez (2017) donde se identificó el valor de CMI a 22 mg/L de ZnO y 0.05 mg/L de Ag, y CMB a 216 mg/L de ZnO y 0.439 mg/L de Ag, en el presente estudio se logró inhibir el mismo porcentaje de microorganismos con una concentración menor de Nps así como una menor superficie, lo cual implica beneficios económicos en la optimización de las Nps y del material en el cual están soportadas.

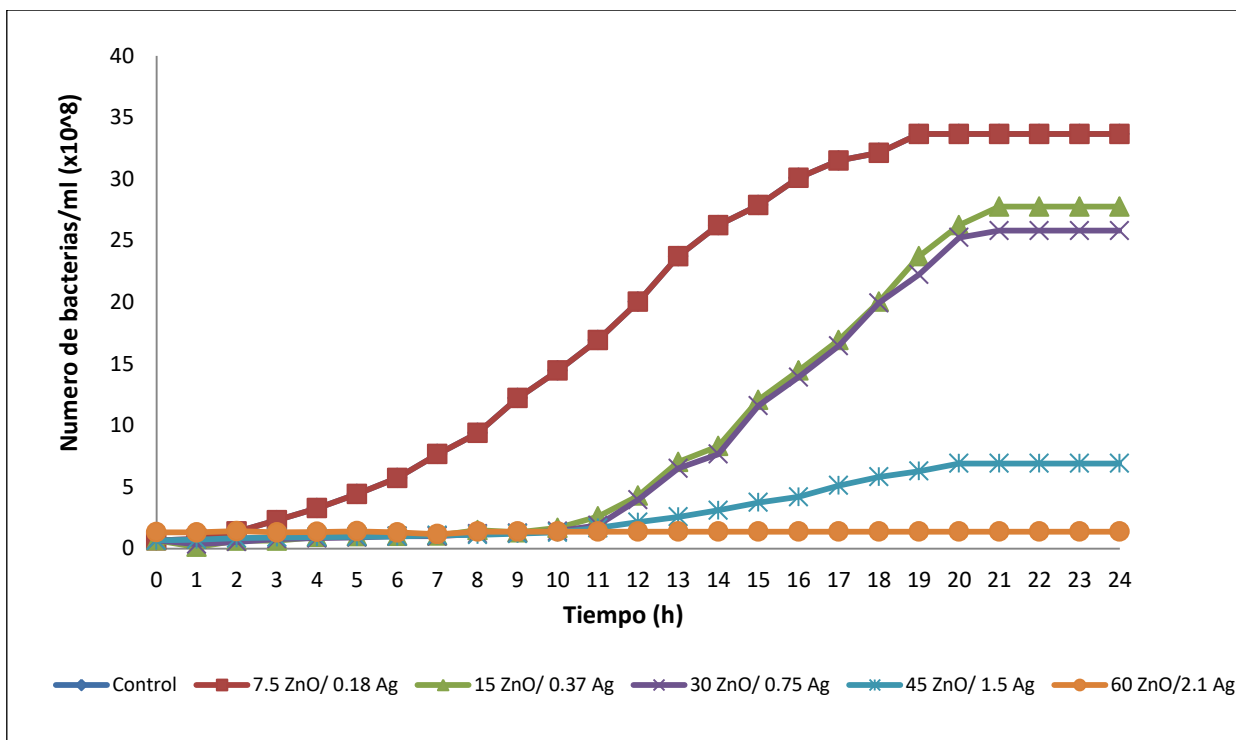


Figura 21. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E.

Tabla 14. Resultados de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de Silver Plus 200 2E.

| Experimento | Concentración ZnO (mg/L) | Concentración Ag (mg/L) | Porcentaje de eliminación % |
|-------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 1 | 7.5 | 0.18 | 0.0 |
| 2 | 15 | 0.37 | 17.9 |
| 3 | 30 | 0.75 | 23.8 |
| 4 | 45 | 1.5 | 81.1 |
| 5 | 60 | 2.1 | 99.9 |

3.4 Resultados de la adaptabilidad de las geomembranas a diferentes temperaturas

En la Figura 22 se muestra el crecimiento de *E. coli* a una temperatura de 30° C y 0 rpm, al estar en contacto con la geomembrana Silver Plus que presenta efecto bactericida y con la geomembrana sin efecto bactericida. La cinética de *E. coli* sin el efecto bactericida, alcanzó un crecimiento de 3.40×10^8 bacterias/ mL, mientras que el crecimiento de *E. coli* cuando está bajo el efecto bactericida de la geomembrana alcanzó un crecimiento de 1.9722×10^8 bacterias/mL. Bajo estas condiciones el crecimiento de *E. coli* no es el ideal ya que uno de los principales factores que promueve su crecimiento es la agitación constante tal como lo reportó Paredes (2011), sin embargo, el efecto de la geomembrana Silver Plus 200 2E, logró inhibir casi el 50 % del crecimiento de *E. coli* comparado con el control. Con lo anterior, se establece que la geomembrana Silver Plus 200 2E mantuvo el efecto bactericida frente a *E. coli* a una temperatura de 30 ° C y 0 rpm.

En la Figura 23 se observa el efecto de la temperatura sobre *E. coli* a 40 °C y 0 rpm, donde se aprecia un crecimiento un máximo de 3.89×10^8 bacterias/mL sin el efecto bactericida de la geomembrana, y un crecimiento máximo de 2.13×10^8 bacterias/mL con efecto bactericida de la geomembrana. Este último valor de 2.13×10^8 bacterias/mL a 40°C es muy similar al crecimiento de 1.9722×10^8 bacterias/mL que se obtuvo a 30° C, por lo cual se establece que a estas temperaturas el efecto bactericida de la geomembrana se mantiene, sin que la modificación de ésta variable afecte su funcionamiento.

En el último experimento realizado a una temperatura de 50°C y 0 rpm, se observa una disminución en el crecimiento del microorganismo cuando se encuentra sin el efecto bactericida de la geomembrana que alcanzó 2.99×10^8 bacterias/mL, mientras que el crecimiento con el efecto de la geomembrana fue de 1.87×10^8 bacterias/mL (Figura 24).

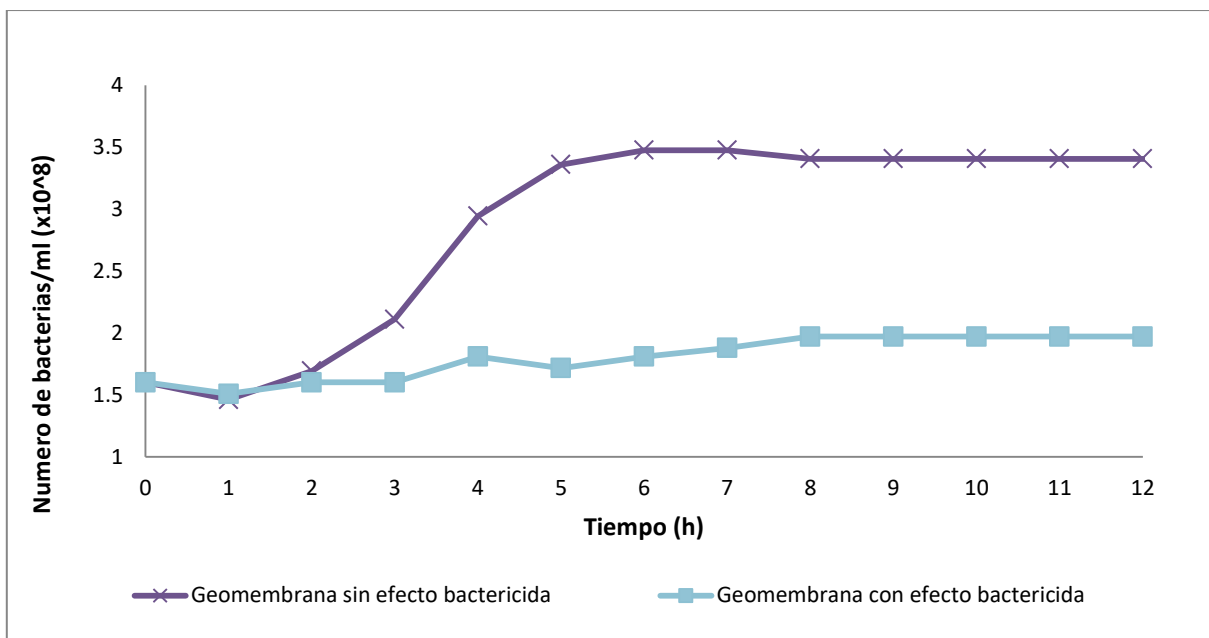


Figura 22. Crecimiento de *E. coli* bajo el efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a 30° C y 0 rpm.

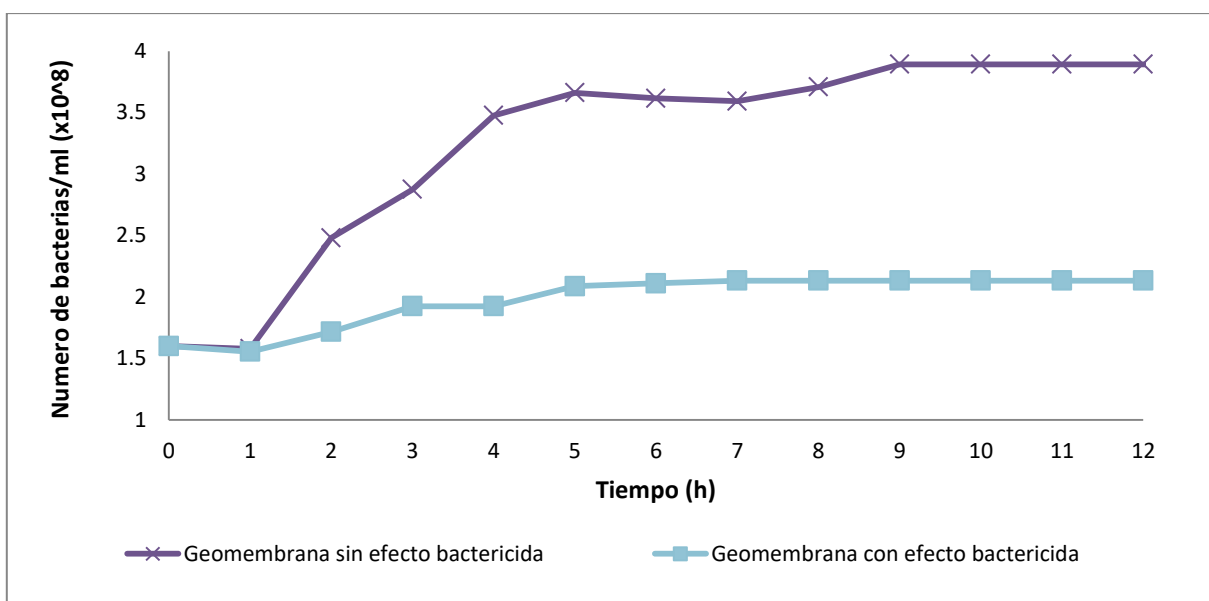


Figura 23. Crecimiento de *E. coli* bajo el efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a 40° C y 0 rpm.

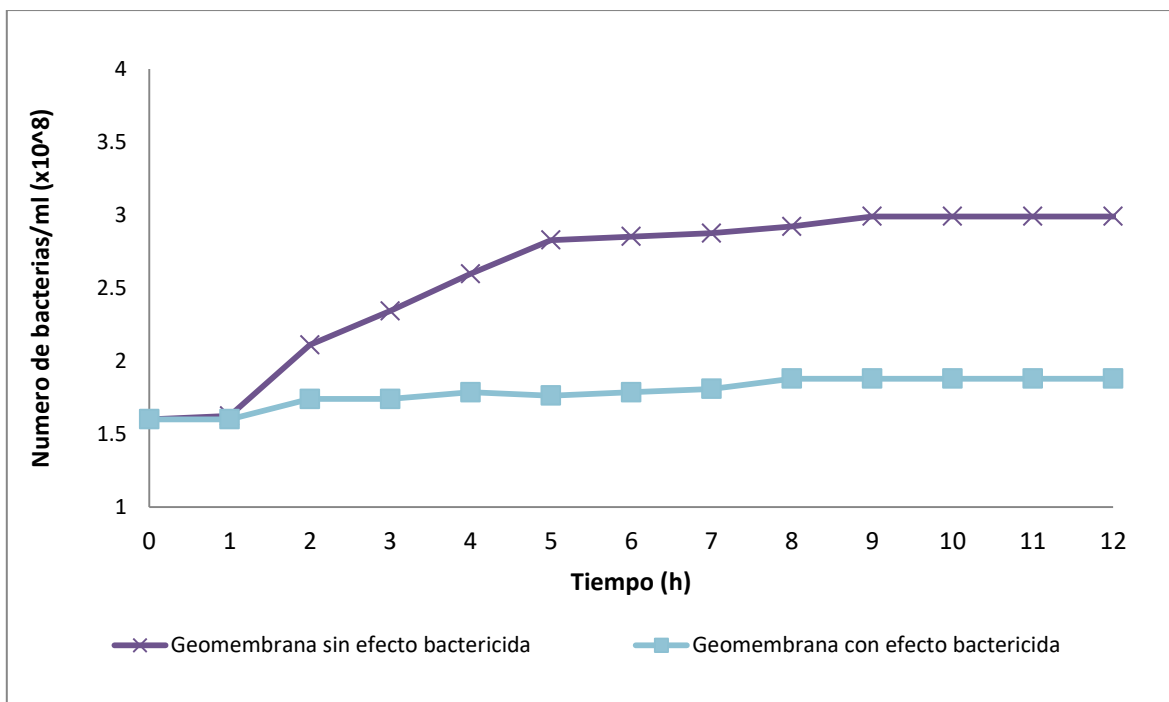


Figura 24. Crecimiento de *E. coli* bajo el efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a 50° C y 0 rpm.

En la Tabla 15 se muestran los crecimientos máximos alcanzados en cada experimento con y sin geomembrana, para tener una visión más amplia del efecto de la temperatura sobre *E. coli*. Con lo anterior se establece que la geomembrana Silver Plus 200 2E impregnada con Nps de ZnO y Ag y elaborada a base de poliolefinas, es capaz de mantener un efecto bactericida sobre *E. coli* a diferentes temperaturas simulando un agua estancada.

La ventaja de elaborar una geomembrana comercial con Nps que mantienen un efecto bactericida, proporciona beneficios económicos, comparadas con las geomembranas que se encuentra en el mercado. En el presente estudio se comprueba la estabilidad de la geomembrana Silver Plus 200 2E, por lo que se pretende sea empleada como recubrimiento en los vertederos o sistemas de captación de agua que suelen estar impermeabilizados con ella (Zornberg, 2005).

Tabla 15. Efecto bactericida de la geomembrana Silver Plus 200 2E a diferentes temperaturas.

| Experimento | Temperatura | Crecimiento de <i>E. coli</i> sin geomembrana | Crecimiento de <i>E. coli</i> con la geomembrana Silver Plus 200 2E |
|-------------|-------------|--|---|
| 1 | 30 | 3.40 X 10 ⁸ bacterias/mL | 1.97 X 10 ⁸ bacterias/mL |
| 2 | 40 | 3.89 X 10 ⁸ bacterias/mL | 2.13 X 10 ⁸ bacterias/mL |
| 3 | 50 | 2.99 X 10 ⁸ bacterias/mL | 1.87 X 10 ⁸ bacterias/mL |

3.5 Resultados resonancia superficial de plasmones

En la Figura 25 se observa el barrido de la solución control sin Nps de Ag y ZnO, mientras que en la Figura 26, se muestran los resultados del análisis que se realizó de Silver Plus 200 2E por espectrofotometría UV-Vis. En él se aprecia la formación de un plasmón a 350 nm que según Rivera y Mejía (2016) es atribuido a la presencia de Nps de Zn. El plasmón es formado por la presencia de electrones libres que se encuentran en la superficie de las Nps, que al recibir la luz incidente, producen una oscilación mostrada en el espectrofotómetro como plasmón de superficie.

Según la literatura, las Nps de Zn en solución, podrían tener un diámetro mayor a 20 nm, lo anterior se establece, debido a que la anchura de banda es más angosta, y la oscilación es más compleja (Rivera y Mejía, 2016). Además de la información anterior, según lo establecido por Cornejo (2015), la longitud de onda y el plasmón resultante se pueden atribuir a la presencia de Nps esféricas, ya que el plasmón es muy similar al que se manifiesta por este tipo de morfologías.

Con respecto a las Nps de Ag, no se muestra la formación de un plasmon, que pudiera indicar la migración de Nps de la geomembrana hacia el medio de cultivo, lo anterior se atribuye a que las concentraciones de Ag en solución son muy bajas, y posiblemente, se encuentren debajo del límite de detección del espectrofotómetro. Con base a ello, la literatura menciona que la RPS depende de la concentración de las Nps, de su distribución espacial y de las propiedades de la matriz que las rodea (Cornejo, 2015).

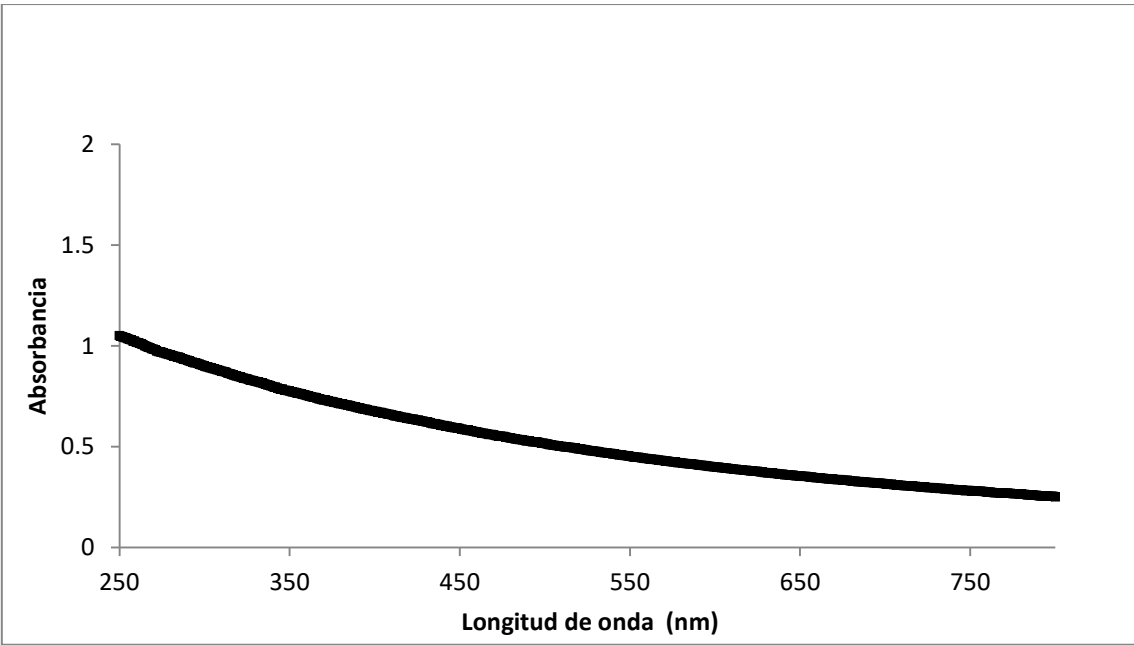


Figura 25. Análisis en el espectrofotómetro de la solución control sin Nps.

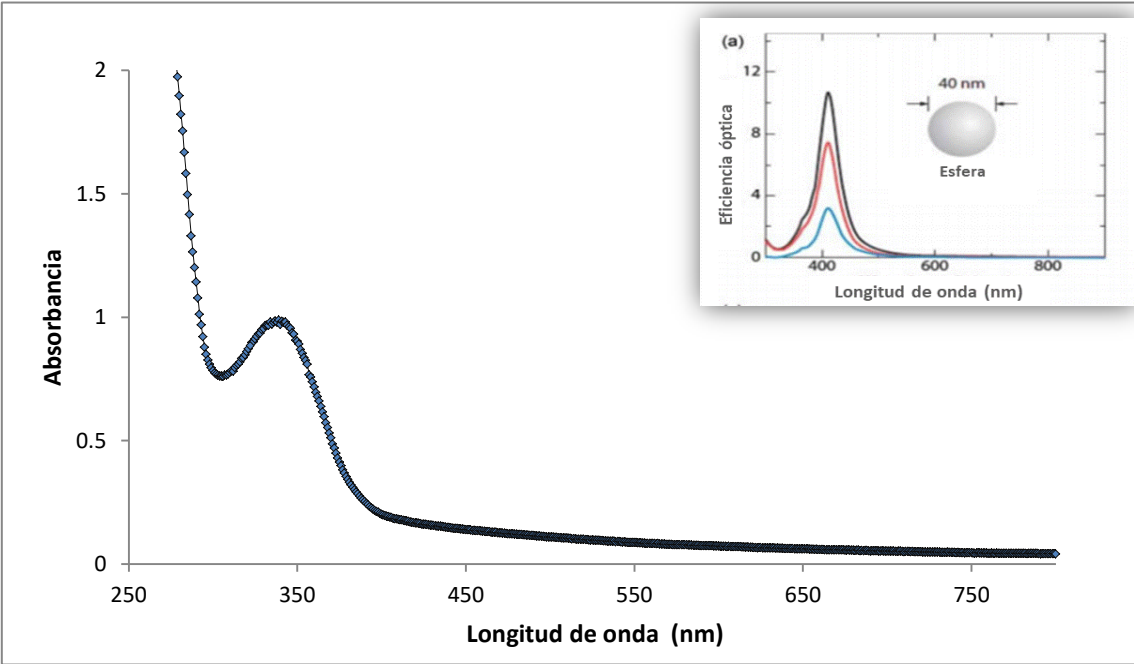


Figura 26. Plasmón identificado en la solución con Nps, de la geomembrana Silver Plus 200 2E.

3.6 Resultados de la liberación de zinc y plata

Como resultado del desprendimiento de Zn y Ag de la geomembrana Silver Plus 200 2E, se muestran los valores obtenidos en la Tabla 16. Las primeras dos semanas se desprendió la mayor concentración de Zn y Ag, sin embargo, en la tercera semana el desprendimiento fue constante, hasta alcanzar una liberación total de 0.2675 mg/L de Zn y 0.005 mg/L de Ag durante las ocho semanas de análisis.

Tabla 16. Análisis de Zn y Ag desprendidos de la geomembrana Silver Plus 200 2E.

| Semana | Zn mg/L | Ag mg/ L |
|--------|---------|----------|
| 1 | 0.0475 | 0.001 |
| 2 | 0.035 | 0.001 |
| 3 | 0.0325 | 0.0005 |
| 4 | 0.0305 | 0.0005 |
| 5 | 0.0305 | 0.0005 |
| 6 | 0.0305 | 0.0005 |
| 7 | 0.0305 | 0.0005 |
| 8 | 0.0305 | 0.0005 |
| Total | 0.2675 | 0.005 |

En la Figura 27 se observa mayor desprendimiento de Zn comparado con Ag, lo cual se atribuye a la diferencia de concentración de cada uno de los metales en la geomembrana. El desprendimiento varía según el tipo de enlace que se presenta entre geomembrana-nanopartícula. El resultado de la liberación del metal es favorable ya que un desprendimiento de 0.005 mg/L de Ag en ocho semanas, podría garantizar una durabilidad del material de aproximadamente 5 años, considerando que Ag se encuentra en menor concentración.

El comportamiento del desprendimiento es similar al establecido por Eversdijk (2012) donde se mantiene la CMI necesaria para inhibir el crecimiento de *E. coli* durante un periodo de tiempo más

largo. Con base a lo anterior, se establece que la aplicación de Nps de Ag y Zn en la geomembrana de polietileno Silver Plus 200 2E, prolonga el efecto bactericida sobre *E. coli*, al retener por mayor tiempo las Nps en el material, además de mantener el desinfectante activo por tiempo prolongado. En la Tabla 17, se muestra un comparativo entre la durabilidad de diferentes superficies establecidas por Fontecha (2014), Sánchez (2017) y el presente estudio. El comparativo muestra que las superficies anteriormente empleadas tienen una menor durabilidad, lo anterior se atribuye al tipo de impregnación que se realiza en cada material, y también varía dependiendo del tipo de enlace que se realice entre las Nps y el polímero. En el caso particular Silver Plus 200 2E, es mezclado con las Nps de manera directa y posterior a ello es sometido al proceso de extrusión de plásticos.

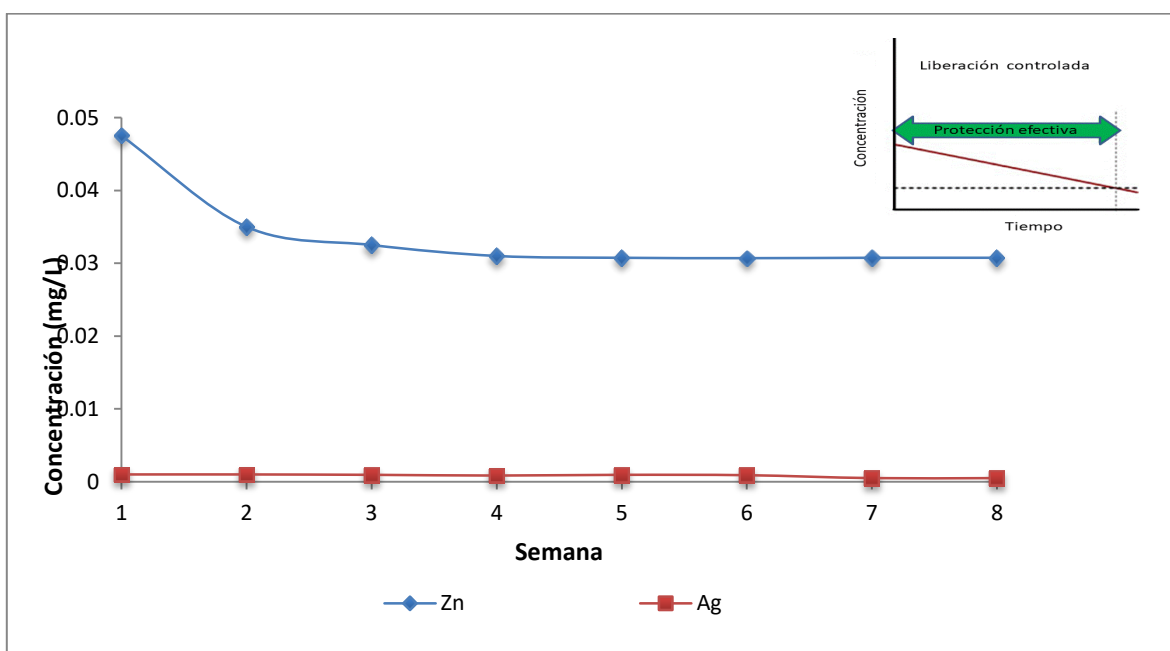





Figura 27. Liberación controlada de ZnO y Ag de la geomembrana Silver Plus 200 2E

Tabla 17: Comparativo de la durabilidad de diferentes superficies poliméricas impregnadas con Nps de Ag y ZnO

| Estudio | Matriz/Superficie | Concentración mg/L Ag+ mg/L ZnO | Durabilidad establecida |
|-----------------|--|---------------------------------------|----------------------------|
| Fontecha (2014) | Polietileno <div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> AgNps ZnONps </div>  <p style="font-size: x-small; text-align: center;">5.0 X 5.0 cm² y un grosor de 1 cm</p> | 850 +400 | 3 años |
| Sánchez (2017) | Pellets  | 0.439+ 216.0 | 2.7 años |
| Estudio actual | Geomembrana  | 2.1 + 60.0 | 5 años |

3.7 Formación de biofilm por microscopio óptico

Los resultados de la adherencia de *E. coli* en la geomembrana sin Nps se aprecian en Figura 28 a. En esta imagen se observa al microorganismo desde el día 20 adherido a la geomembrana, sin embargo, la cantidad de bacterias aumenta durante los días 40 y 60 (Figura 28 b y c). La adherencia de *E. coli* es mayor en superficies sólidas como las geomembranas y es más fácil, en condiciones húmedas, cuando un sistema se encuentra estacionario es incapaz de romper la biopelícula que van formando los microorganismos lo cual promueve la adherencia de un biofilm más grueso, en esta

primera etapa se observa que la ausencia de Nps promueve el crecimiento y la adherencia de la bacteria a la superficie.

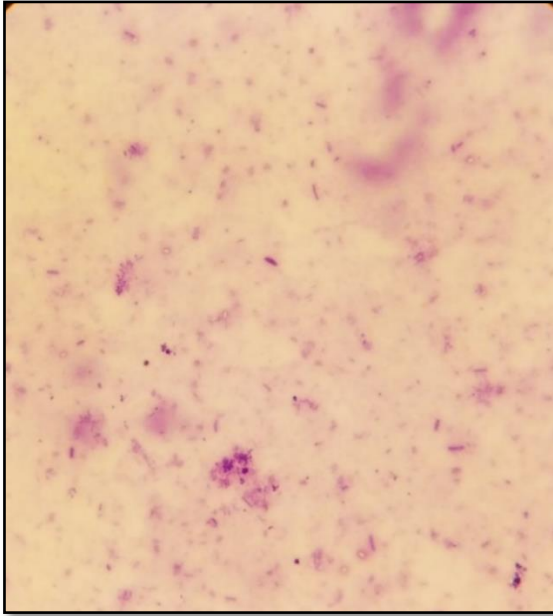
En la Figura 29 se observa la adherencia de los microorganismos en la geomembrana con Nps de Ag y ZnO durante los días 20(a), 40 (b) y 60 (c). Se aprecia que la presencia de Nps incorporadas a la geomembrana fue capaz de retrasar la adherencia de *E. coli* hasta cuarenta días. Lo observado en el microscopio óptico fue corroborado en MEB, en la Figura 30 (a) se observa la geomembrana antes del tratamiento con *E. coli* a un aumento de 5000x, mientras que en la Figura 30 (b) se aprecia la adherencia del microorganismo en la geomembrana después de 40 días de tratamiento. En ella se observa que *E. coli* comienza aglomerarse y a formar microcolonias sobre la geomembrana, en esta etapa las bacterias se encuentran fijadas de forma irreversible, crecen y se dividen utilizando los nutrientes presentes en la geomembrana, estas microcolonias se ensanchan y se unen para formar películas más gruesas (Kumar y Anad, 1998).

La formación de un biofilm es atribuido a las propiedades físico-químicas de las bacterias, las cargas negativas de las superficies bacterianas son contrarias a la adhesión bacteriana debido a las fuerzas electrostáticas. Estas fuerzas mantienen las bacterias a una corta distancia de la superficie. La superficie de las bacterias posee hidrofobicidad debido a las fimbrias, flagelos y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Por ello, es que los flagelos, buscan transportar las células a un sitio de fijación especial con la superficie (Shi y Shu, 2009).

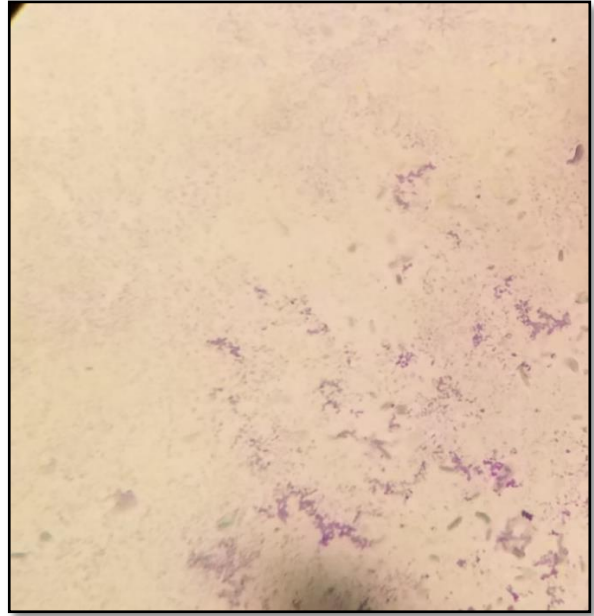
La literatura establece que las bacterias gram negativas son más resistentes a los metales pesados que las bacterias gram positivas. Lo anterior es debido a que las gram negativas tienen dos membranas lipídicas y una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias gram positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa (López *et al.*, 2014). Una de las ventajas que tienen las Nps de ZnO y Ag frente a *E. coli*, es la capacidad de dañar la membrana celular, debido a la diferencia de cargas que surge entre la membrana celular negativa de la bacteria, y el metal que se encuentra en la geomembrana.

En el presente estudio se muestra que la incorporación de Nps metálicas dentro de geomembranas de polietileno promueve la desinfección de agua y retrasa la adherencia de microorganismos en la superficie. Este proceso se puede retrasar aún más, al optimizar parámetros como la concentración de Nps, tiempo de contacto y temperatura. Es importante mencionar que se simuló las condiciones ideales para el crecimiento de *E. coli*, sin embargo, en los sistemas de captación de agua las condiciones para el crecimiento del microorganismo no son las ideales y la concentración de las bacterias no es tan alta.

a)



b)



c)

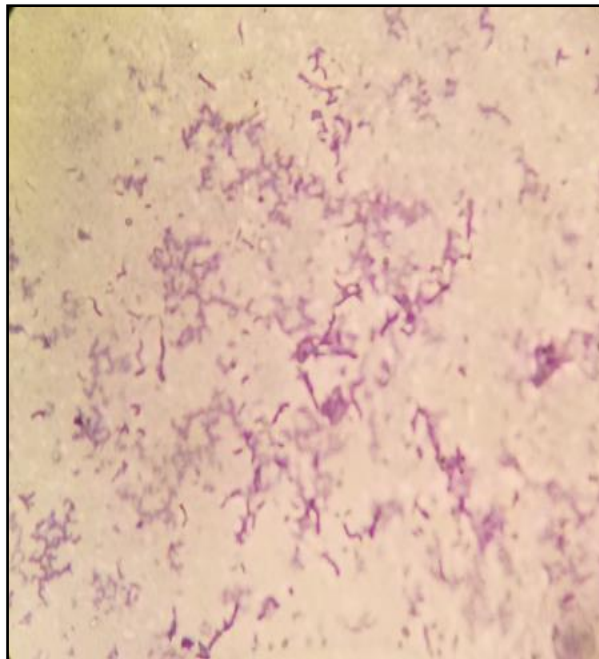


Figura 28. Análisis en microscopio óptico a 100x de la adherencia de *E. coli* en la geomembrana sin Nps, posterior a la tinción para bacterias gram negativas (a) día 20, (b) día 40 y (c) día 60.

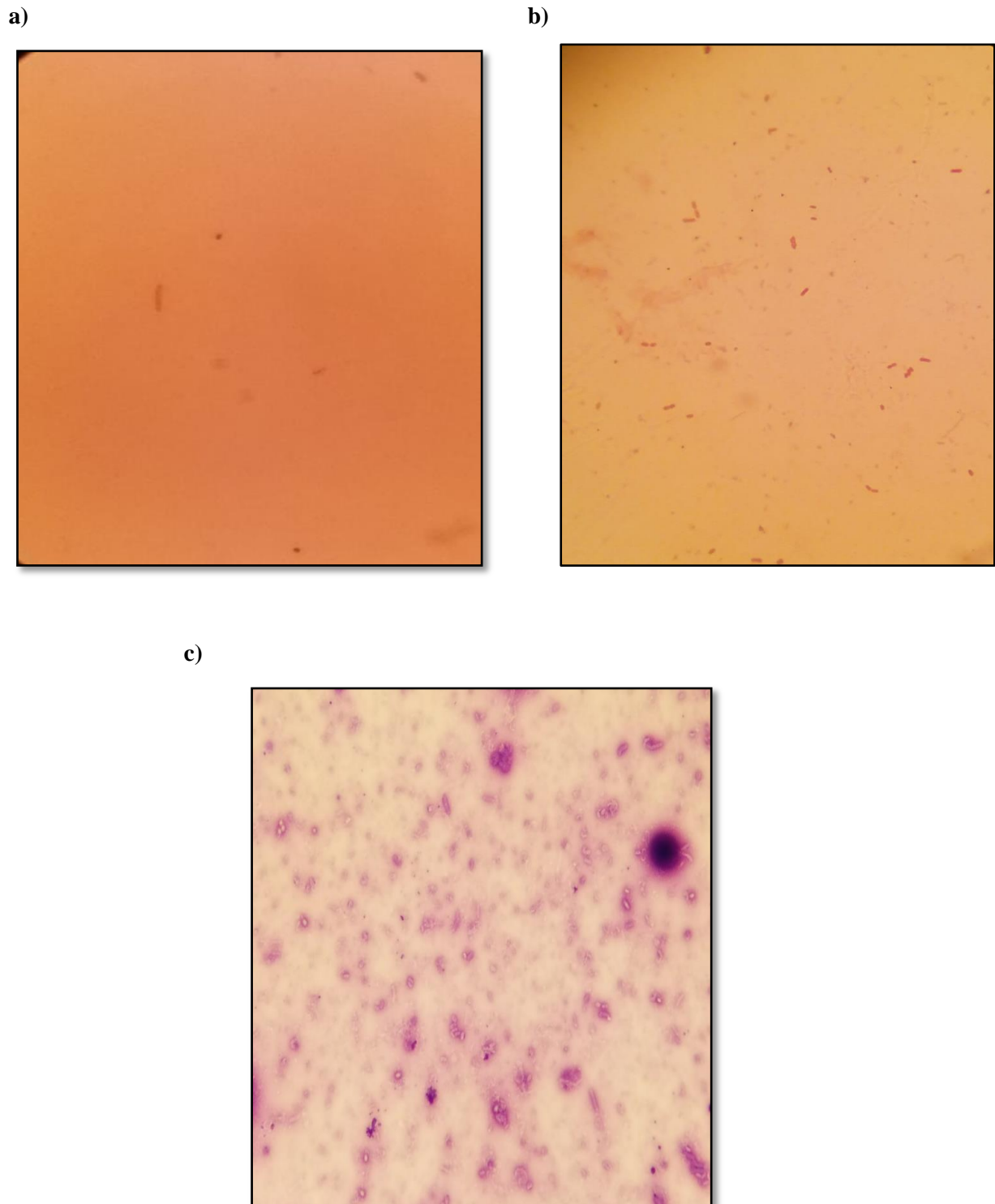


Figura 29. Análisis en microscopio óptico a 100x de la adherencia de *E. coli* en la geomembrana con Nps, posterior a la tinción para bacterias gram negativas (a) día 20, (b) día 40 y (c) día 60.

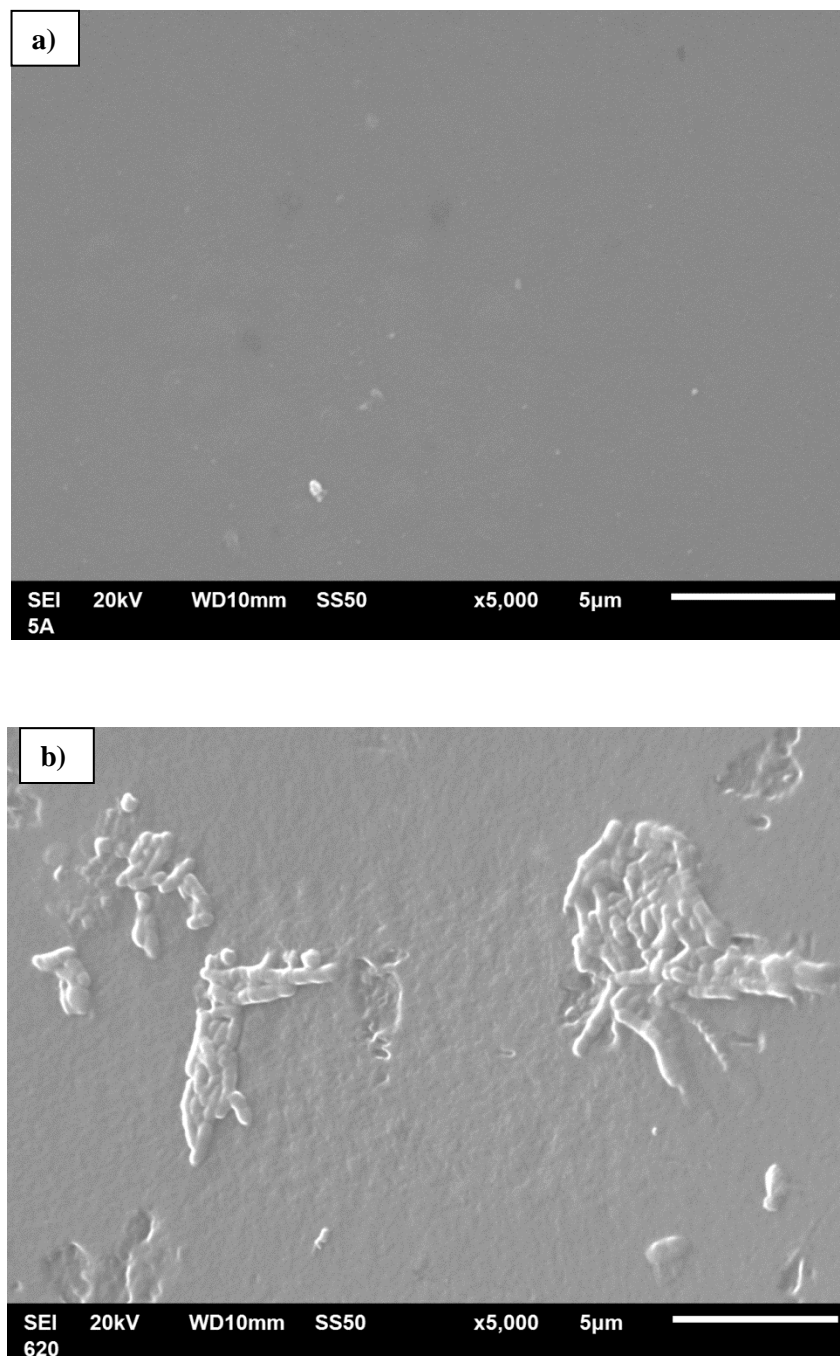


Figura 30. Micrografía de la geomembrana Silver Plus 200 2E a 5000x antes del tratamiento con *E. coli* (a), geomembrana después de 40 días de tratamiento con *E. coli* en agua peptonada (b).

Conclusiones

Los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento muestran que la geomembrana Silver Plus 200 2E fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* hasta un 99%. Este efecto es atribuido a las Nps de Ag y ZnO presentes en la geomembrana, las cuales dañan la membrana del microorganismo y provocan la muerte celular. Lo anterior le da un valor agregado a la geomembrana Silver Plus 200 2E comparado con las geomembranas comerciales, debido a que es capaz impermeabilizar los sistemas de captación de agua, y de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos para la salud. Con respecto a los valores de CMI y CMB, se lograron disminuir las concentraciones de Ag y ZnO reportadas en la literatura gracias a la impregnación superficial de las Nps, que promueven mayor superficie de contacto con *E. coli*.

La variación de temperatura en la geomembrana Silver Plus 200 2E, muestra que el material mantiene un efecto bactericida simulando un agua estancada a las temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C, lo cual nos permite ampliar el rango de aplicación de la geomembrana en diferentes ambientes, considerando que las condiciones climatológicas del país son variables dependiendo de la región.

Los estudios de la liberación de Ag y ZnO muestran que las Nps en solución tienen un tamaño mayor a 20 nm y presentan una morfología esférica. El análisis de la durabilidad de la geomembrana, indica que Silver Plus 200 2E prolonga el efecto bactericida de las Nps sobre *E. coli*, y mantiene el desinfectante activo hasta cinco años, lo cual es mayor a lo reportado en la literatura. Uno de los beneficios que proporciona este material, es que se disminuye la liberación de Ag y ZnO en grandes concentraciones al medio ambiente, además de no generar productos secundarios dañinos para la salud, como lo hacen los desinfectantes comunes.

El estudio de la geomembrana Silver Plus 200 2E en microscopio óptico muestra que a pesar de que las bacterias gram negativas son más resistentes a los metales, la incorporación de Nps en la geomembrana es capaz de retardar la adherencia de *E. coli* hasta cuarenta días, esto es debido a la diferencia de cargas entre las Nps metálicas y la membrana celular del microorganismo.

Con base a lo anterior, podemos concluir que el uso de la geomembrana Silver Plus 200 2E presenta mayores beneficios económicos sobre los materiales comerciales como son: 1) menor concentración de Nps, 2) mayor área superficial, 3) eficiente capacidad como antibacterial ante diversos cambios de temperatura, 4) no requiere agitación para que las Nps estén en contacto con los microorganismos y finalmente, presenta mayor tiempo de vida.

Esta investigación es la primera en reportar la impregnación de Nps metálicas en una geomembrana comercial, por lo cual el proceso puede ser viable de reproducir para realizar estudios posteriores.

Como recomendaciones se propone evaluar el efecto de las Nps con otros microorganismos característicos de agua estancada como *Salmonella* y *Entamoeba histolytica*, a fin de evaluar el efecto bactericida de las Nps en diferentes microorganismos. Se plantea comparar los costos de geomembranas comerciales con geomembranas modificadas, y evaluar el efecto bactericida con otras morfologías de Nps Ag y ZnO. Finalmente, se recomienda medir la liberación de ZnO y Ag durante un periodo de seis meses y evaluar la posibilidad de reutilizar la geomembrana al impregnarla nuevamente con Nps de Ag y ZnO.

Referencias

1. Adams, L., Lyon, D., y Alvarez, P. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*, 40(19), 3527-3532.
2. Allen, M. y Edberg, S. (1995). The public health significance of bacterial indicators in drinking water. Special publication, *The Royal Society of Chemistry 1999*. Gateshead, Tyne and Wear, UK: Athenaeum Press
3. An, Y. y Friedman, R. J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research*, 43(3), 338-348.
4. Bosetti, M., Masse, A., Tobin, E., y Cannas, M. (2002). Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials*, 23(3), 887-892.
5. Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M., y Fiévet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano letters*, 6(4), 866-870.
6. Bulloch, W. (1960). *The History of Bacteriology*. Oxford: University Press.
7. Busscher, H. y Van der Mei, H. (1997). Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in dental research*, 11(1), 24-32.
8. Carpentier, B. y Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of applied bacteriology*, 75(6), 499-511.
9. Chmielewski, R y Frank, J.(2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
10. Choi, J., Jegal, J., y Kim, W. (2006). Fabrication and characterization of multi-walled carbon nanotubes/polymer blend membranes. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2), 406-415.
11. Chou, W., Yu, D., y Yang, M. (2005). The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. *Polymers for advanced technologies*, 16(8), 600-607.
12. Clesceri, L., Greenberg, A. y Eaton, A. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th edn*. Washington: APHA, AWWA y WEF.
13. Comisión Europea. (2003). Registro, evaluación y autorización de productos químicos (REACH). Recuperado de <http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals>.
14. Cornejo, L. (2015). *La revolución nanotecnológica en los nuevos materiales un reto tecnológico para el siglo XXI*. Universidad de Jaen, España.

15. Crossette, B. (1995). Severe water crisis ahead for poorest nations in next 2 decades. *New York Times*, A13.
16. De Gusseme, B., Hennebel, T., Christiaens, E., Saveyn, H., Verbeken, K., Fitts, J. P. y Verstraete, W. (2011). Virus disinfection in water by biogenic silver immobilized in polyvinylidene fluoride membranes. *Water research*, 45(4), 1856-1864.
17. Donlan, R. y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
18. Ebert, K., Fritsch, D., Koll, J., y Tjahjwiguna, C. (2004). Influence of inorganic fillers on the compaction behaviour of porous polymer based membranes. *Journal of Membrane Science*, 233(1-2), 71-78.
19. Edberg, S., Allen, M., Smith, B. and the National Collaborative Study .(1988). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with presence-absence techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (6), 1003-1008.
20. Edberg, S., Rice, E., Karlin, R. y Allen, M. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 106S-107S.
21. Edward, A., George, P., y George, C. (1992). *Disinfection alternatives for safe drinking water*. Hazen and Sawyer. New York: NY.
22. Eijkman, C. (1904). *Central Blattfur Bakteriologie, abstract I orig.*37, 742.
23. EPA. (1999). *Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*. United States Environmental Protection Agency: Office of water.
24. EPA. (2011). *Water Treatment Manual: Disinfection*. Wexford. Ireland: Johnstown Castle.
25. Eversdijk, J., Erich, S., Hermanns, S., Adan, O., De Bolle, M., De Meyer, K. y Ten Cate, A. T. (2012). Development and evaluation of a biocide release system for prolonged antifungal activity in finishing materials. *Progress in Organic Coatings*, 74(4), 640-644.
26. Feng, Q., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., y Kim, J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research*, 52(4), 662-668.
27. Filip, Z., Kaddu, M. y Milde, G. (1987). Survival and adhesion of some pathogenic and facultative pathogenic microorganisms in ground water. *Water Science and Technology* 19 (7), 1189-1190.
28. Fontecha F. (2014). *Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos*

- químicos embebidos en materiales*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
29. Franklin, N., Rogers, N., Apte, S., Batley, G., Gadd, G., y Casey, P. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental science & technology*, 41(24), 8484-8490.
 30. Garrett, T., Bhakoo, M., y Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049-105.
 31. Gassert, F. (2013). Water stress by country. Julio 09, 2018, de WRI Sitio web: http://wriorg.s3.amazonaws.com/s3fs-public/water_stress_by_country_0.png
 32. Gelover, S., Gómez, L. A., Reyes, K., & Leal, M. T. (2006). A practical demonstration of water disinfection using TiO₂ films and sunlight. *Water research*, 40(17), 3274-3280.
 33. Goldshmid, J. (1972). *Effective Dissolved Salts on the Filtration of Coliform Bacteria and Sand Dunes*. Water Pollution Research Conference. Conferencia llevada a cabo en Jerusalem, Israel.
 34. Gupta, A. y Silver, S. (1998). Molecular genetics: silver as a biocide: will resistance become a problem. *Nature biotechnology*, 16(10), 888.
 35. Hajkova, P., Spatenka, P., Horsky, J., Horska, I., y Kolouch, A. (2007). Photocatalytic effect of TiO₂ films on viruses and bacteria. *Plasma Processes and Polymers*, 4(S1), S397-S401.
 36. Harvey, D., y Rodríguez, L. (2002). *Química analítica moderna* (No. 543 H333q). McGraw-Hill.
 37. Hazen and Sawyer. (1992.) *Disinfection Alternatives for Safe Drinking Water*. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.
 38. HS 1001 (s.f). Overall Migration Test by Total Immersion Method. Recuperado de https://www.wastereduction.gov.hk/sites/default/files/en/materials/info/container/HS_1001.pdf
 39. Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, y Hao, B. (2008). Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*, 24(8), 4140-4144.
 40. Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., & Manna, A. C. (2008). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS microbiology letters*, 279(1), 71-76.
 41. Kikuchi, Y., Sunada, K., Iyoda, T., Hashimoto, K., y Fujishima, A. (1997). Photocatalytic

- bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 106(1-3), 51-56.
42. Kim, J., Lee, C., Cho, M., y Yoon, J. (2008). Enhanced inactivation of *E. coli* and MS-2 phage by silver ions combined with UV-A and visible light irradiation. *Water research*, 42(1-2), 356-362.
 43. Korting, H. C., & Hartinger, A. (1988). Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of tetracycline and erythromycin in 35 recent Munich isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 39(3), 161-165.
 44. Kudryavtseva, B. (1972). An experimental approach to the establishment of zones of hygienic protection of underground water sources on the basis sanitary-bacteriological indices. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology* 18, 503-511.
 45. Kumar, C. y Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 9-27.
 46. L'vovich, M., Belyaev, J., Kindler, N., Koronkevic, T., y Voropaev, G. (1995). *The earth as transformed by human action*. University Press: Cambridge.
 47. LeChevallier, M., Schiemann, D. y Mc Feters, G. (1987). Factors contributing to the reduced invasiveness of chlorine-injured *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1358-1364.
 48. Lee, M., Kim, T., Kim, W., y Sung, Y. (2008). Surface plasmon resonance (SPR) electron and energy transfer in noble metal– zinc oxide composite nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(27), 10079-10082.
 49. Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D., Brunet, L., Liga, M., Li, D., y Alvarez, P.(2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water research*, 42(18), 4591-4602.
 50. López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.
 51. Manan, S., Pitroda, J., y Bhavsar, J. (2015). HDPE geomembranes: a liner material for reservoirs. engineering: Issues, opportunities and Challenges for Development. Congreso llevado a cabo en Umrakh, Bardoli.
 52. Marchand, E. (2002). *Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo*

- humano en Lima metropolitana*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
53. Marshall, K.(1992). Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *Am. Soc. Microbiol. News.*, 58, 202-207.
 54. Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., y Tsuchido, T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 4278-4281.
 55. Mauter, M., Wang, Y., Okemgbo, K., Osuji, C., Giannelis, E., y Elimelech, M. (2011). Antifouling ultrafiltration membranes via post-fabrication grafting of biocidal nanomaterials. *ACS applied materials & interfaces*, 3(8), 2861-2868.
 56. McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49(14), 1176-1178.
 57. Molina, J. (2015). Universidad Nacional Autónoma de México. *ESCHERICHIA COLI DIARROGÉNICA*. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>.
 58. Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Investigación química*, (1), 37.
 59. Murray, C., Goslan, E., y Parsons, S. A. (2007). TiO₂/UV: Single stage drinking water treatment for NOM removal. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 6(3), 311-317.
 60. Norma Oficial Mexicana. NOM-127-SSA1. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación 03 de Febrero de 1995.
 61. Oram, B. (2014). Water research center. Recuperado de <https://www.water-research.net/index.php/water-treatment/water-disinfection/uv-disinfection>.
 62. Paredes D. (2011). *Estudios del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre Escherichia coli y Staphylococcus aureu*. (Tesis de licenciatura). Universidad industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
 63. Pendergast, M. T. M., Nygaard, J. M., Ghosh, A. K., & Hoek, E. M. (2010). Using nanocomposite materials technology to understand and control reverse osmosis membrane compaction. *Desalination*, 261(3), 255-263.
 64. Phillips, V., Tschida, R., Hernández, M. y Hernández, F. (2010). Captación de agua de

- lluvia como alternativa para afrontar la escasez del recurso. Recuperado de http://licenciatura.iconos.edu.mx/k_angi/nueva/tienda/biblioteca/Manual%20Captacion%20de%20agua%20de%20lluvia.pdf
65. Prescott, S. y Winslow, C. (1915). *Elements of water bacteriology* 3rd edn. New York : John Wiley
 66. Qu, X., Alvarez, P. J., & Li, Q. (2013). Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water research*, 47(12), 3931-3946.
 67. Rahn, R., y Landry, L. C. (1973). Ultraviolet irradiation of nucleic acids complexed with heavy atoms-II. Phosphorescence and photodimerization of DNA complexed with Ag. *Photochemistry and photobiology*, 18(1), 29-38.
 68. Ramón, U. (2014). Sistemas de captación de agua de lluvia. *Impluvium*. 6,7.
 69. Rice, E., Clark, R. y Johnson, C. (1999). Chlorine inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7. *Emerging Infectious Diseases* 5,461--463.
 70. Rivera J. y Mejía, E. (2016). Reconfiguración de nanopartículas de plata obtenidas por abstracción láser en líquido. 1er. Foro internacional de nanotecnología. Llevado a cabo en la
 71. Salthammer, T., y Fuhrmann, F. (2007). Photocatalytic surface reactions on indoor wall paint. *Environmental Science & Technology*, 41(18), 6573-6578.
 72. Sánchez, K. (2017). *Desinfección de Escherichia coli de un agua residual sintética a partir de nanopartículas de Óxido de Zinc/Plata y plata iónica incorporados a un lecho de polietileno*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
 73. Sau, T., Rogach, A., Jäckel, F., Klar, T., y Feldmann, J. (2010). Properties and applications of colloidal nonspherical noble metal nanoparticles. *Advanced Materials*, 22(16), 1805-1825.
 74. Sawai, J. (2003). Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of microbiological methods*, 54(2), 177-182.
 75. Sawai, J. (2003). Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of microbiological methods*, 54(2), 177-182.
 76. SEMARNAT. (2008). Disponibilidad de agua. Recuperado de http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008/06_agua/cap6_2.html
 77. Sembenelli, P. y Rodríguez, E. (1996). Geomembranes for earth and earth-rock dams: state-

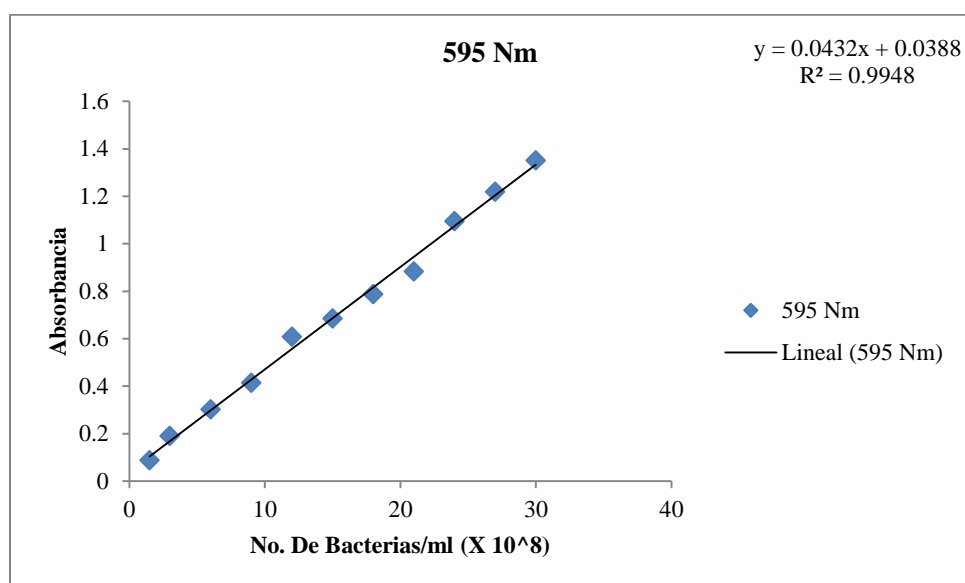
- of-the-art report. *Proc. Geosynthetic Applications, Design and Construction*, MB deGroot, 877-888.
78. Shi, X., y Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413.
 79. Simonovic, S. (2000). One view of the future. *Water International*, 25 (1), 76-88
 80. Sondi, I., y Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182.
 81. Stoimenov, P, Klinger, R., Marchin, G., y Klabunde, K. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679-6686.
 82. Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., & Klabunde, K. J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679-6686.
 83. Thomas, J. y Nakaishi, L. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *The Journal of the American Dental Association*, 137, S10-S15. .
 84. USEPA. (2003 a). *Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule – Toolbox Guidance Manual*. United States Environmental Protection Agency: Cincinnati.
 85. Valle, L. (1993). Extrusión de plásticos: principios básicos. Editorial Limusa.
 86. Van Houdt, R., y Michiels, C. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1117-1131.
 87. Vázquez, C., Martín, A., de Silóniz, M. I., & Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. REDUCA (Biología), 3(5).
 88. Villanueva, C., Manolis, K., y Grimalt, J. (2001). Cloración del agua potable y efectos sobre la salud: revisión de estudios epidemiológicos. *Medicina clínica*, 117(1), 27-35.
 89. Watts, R., Kong, S., Orr, M., Miller, G., y Henry, B. (1995). Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent. *Water research*, 29(1), 95-100.
 90. Wei, C., Lin, W., Zainal, Z., Williams, N., Zhu, K., Kruzic, A. y Rajeshwar, K. (1994). Bactericidal activity of TiO₂ photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assisted water disinfection system. *Environmental science & technology*, 28(5), 934-938.
 91. White, G. (1999). *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*. Hoboken, United States: John Wiley and Sons Ltd.
 92. WRI.(2013). Water stress by country. Washington, DC. World Resources Institute. Recuperado de <http://www.wri.org/resources/charts-graphs/water-stress-country>

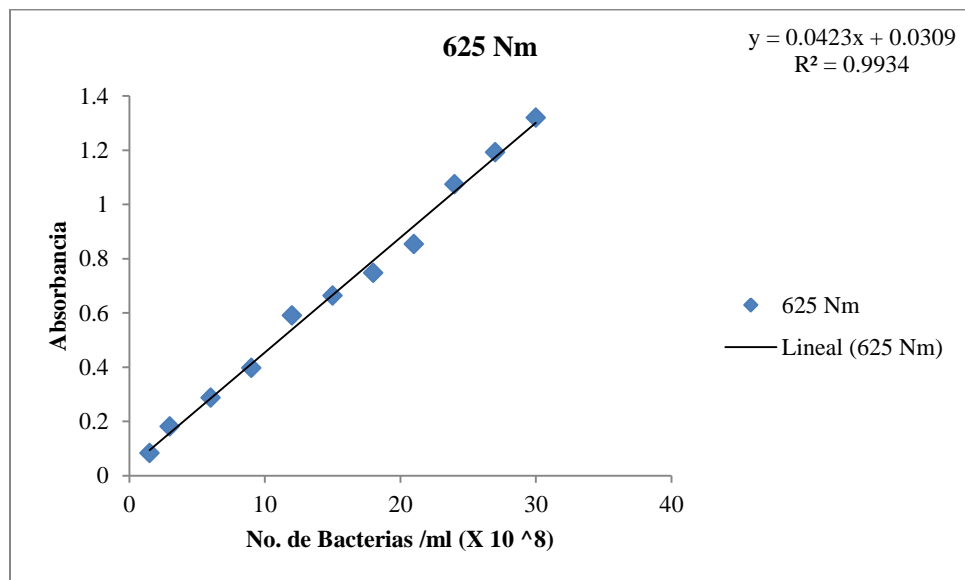
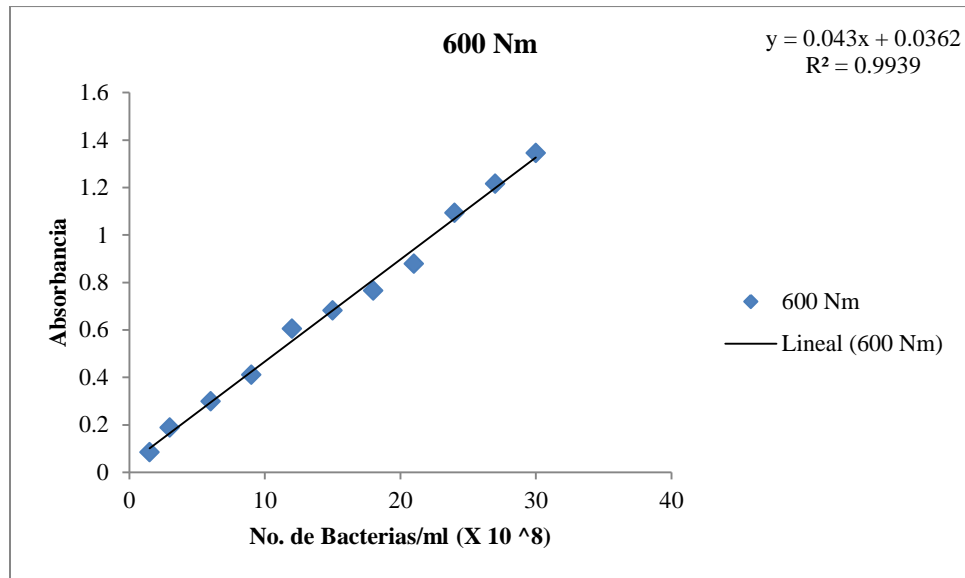
93. Zan, L., Fa, W., Peng, T., & Gong, Z. K. (2007). Photocatalysis effect of nanometer TiO₂ and TiO₂-coated ceramic plate on Hepatitis B virus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 86(2), 165-169.
94. Zodrow, K., Brunet, L., Mahendra, S., Li, D., Zhang, A., Li, Q., y Alvarez, P. J. (2009). Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water research*, 43(3), 715-723.
95. Zornberg, J. (2005). "Advances on the Use of Geosynthetics in Hydraulic Systems." Proceedings of the Nineteenth Geosynthetic Research Institute Conference Geosynthetics Institute. Conferencia llevada a cabo en Las Vegas, NV.

Anexos

1. Preparación de estándares para la escala de Mc Farland y curva de calibración de *E. coli*

| ESTANDAR | ESCALA DE MC FARLAND | | | Absorbancia | | |
|----------|--|---|--|-------------|--------|--------|
| | Solución de BaCl ₂ al 1% (ml) | Solución de H ₂ SO ₄ al 1% (ml) | No. De bacterias X 10 ⁸ /ml | 595 Nm | 600 Nm | 625 Nm |
| 0.05 | 0.05 | 9.95 | 1.5 | 0.087 | 0.084 | 0.083 |
| 1 | 0.1 | 9.9 | 3 | 0.189 | 0.188 | 0.181 |
| 2 | 0.2 | 9.8 | 6 | 0.301 | 0.299 | 0.287 |
| 3 | 0.3 | 9.7 | 9 | 0.413 | 0.411 | 0.397 |
| 4 | 0.4 | 9.6 | 12 | 0.608 | 0.605 | 0.59 |
| 5 | 0.5 | 9.5 | 15 | 0.684 | 0.681 | 0.663 |
| 6 | 0.6 | 9.4 | 18 | 0.787 | 0.765 | 0.747 |
| 7 | 0.7 | 9.3 | 21 | 0.882 | 0.878 | 0.854 |
| 8 | 0.8 | 9.2 | 24 | 1.094 | 1.092 | 1.074 |
| 9 | 0.9 | 9.1 | 27 | 1.218 | 1.215 | 1.192 |
| 10 | 1 | 9 | 30 | 1.35 | 1.345 | 1.319 |





Se obtiene la ecuación de la recta que según Lambert Beer

$$y = m x + n$$

Donde

y = absorbancia

m= pendiente

x = número de bacterias

Se tiene la ecuación de la recta obtenida para 600 nm.

$$y = 0.043x + 0.0362$$

Despejando X (equivalente al número de bacterias):

$$\text{Numero de bacterias} \times 10^8 / \text{mL} = \frac{y - 0.0342}{0.043}$$

De esta manera se obtiene la absorbancia en el espectrofotómetro y es sustituida para graficar número de microorganismos (eje y) contra el tiempo (eje x).

La inoculación con la que se inician las cinéticas es a una D.O de 0.5, equivalente a una absorbancia inicial de 0.08 a 0.1 en la escala de Mc Farland, de esta manera cuando se inocula con *E. coli* la absorbancia en el espectrofotómetro deberá de mantenerse entre este rango para que se inicie según la formula anterior con una concentración de microorganismos entre 1.0651×10^8 bacterias/mL y 1.5302×10^8 bacterias/mL.

2. Preparación medio de cultivo: agua peptonada

Se agregaron 10 g de peptona de carne y 5 g de NaCl en un matraz de 1000 mL, lo anterior con el objetivo de mantener un pH neutro para los microorganismos. Se colocó el matraz en una parrilla a 50° C y 100 rpm durante 10 minutos. Posterior a ello se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 125 ° C durante 20 minutos y finalmente se dejó enfriar el medio de cultivo a temperatura ambiente durante 24 horas, con ello también se verifica que no se presente crecimiento de bacterias en el medio para garantizar la inocuidad.



3. Cálculos durabilidad de las geomembranas

La durabilidad del efecto bactericida en la geomembrana Silver Plus 200 2E se establece con base a la liberación de ZnO y Ag durante el tiempo de estudio. Para ello la geomembrana Silver Plus se coloca en el tubo de ensaye con el agua peptonada previamente esterilizada, se inocula con el microorganismo a una D.O de 0.5 en la escala de Mc Farland y se incuba a 37°C, 200 rpm. Cada semana se toma una muestra de 5 mL del tubo, se filtra y se miden las concentraciones de ZnO y Ag desprendidos en absorción atómica, hasta alcanzar las 8 semanas de estudio.

Posterior a ello se realiza el cálculo de lo desprendido en las semanas con base a la plata debido a que es el metal que se encuentra en concentraciones mucho menores comparado con el óxido de zinc.

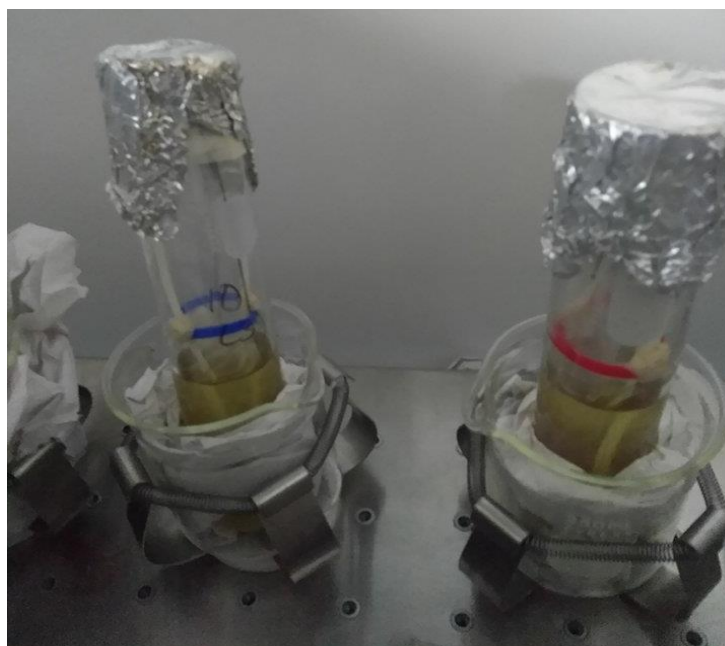
Concentración de plata inicial: 2.1 mg/L

Concentración de plata desprendida en 8 semanas 0.005 mg/L

8 semanas-----0.005 mg/L Ag

X 2.1 mg/L

X= 3360 semanas equivalente más de cinco años, este tiempo se tardara en liberarse el total de plata en la geomembrana.



| Semana | ZnO mg/L | Ag mg/ L |
|---------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 0.0475 | 0.001 |
| 2 | 0.035 | 0.001 |
| 3 | 0.0325 | 0.0005 |
| 4 | 0.0305 | 0.0005 |
| 5 | 0.0305 | 0.0005 |
| 6 | 0.0305 | 0.0005 |
| 7 | 0.0305 | 0.0005 |
| 8 | 0.0305 | 0.0005 |
| Total | 0.2675 | 0.005 |
