



# INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN AGUAS MEDIANTE FOTO-FENTON SOLAR A pH NEUTRO

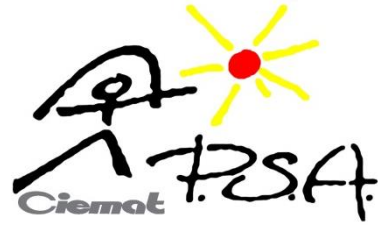


**Tesis Doctoral**

**ELISABET ORTEGA GÓMEZ**

**ABRIL 2015**





**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

**Dpto. de Ingeniería - Área de Ingeniería Química**

**Plataforma Solar de Almería**

**CIESOL**

**Inactivación de microorganismos presentes  
en aguas mediante foto-Fenton solar a pH  
neutro**

-

**Microorganisms inactivation in wastewater  
by solar photo-Fenton at neutral pH**

**Elisabet Ortega Gómez**

**TESIS DOCTORAL – PhD THESIS**

**ABRIL 2015**





**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

Departamento de Ingeniería

Área de Ingeniería Química

# **Inactivación de microorganismos presentes en aguas mediante foto-Fenton solar a pH neutro**

**Memoria presentada para aspirar al grado de  
Doctor por la Universidad de Almería**

**Dña. Elisabet Ortega Gómez**

Fdo. Elisabet Ortega Gómez

Almería a 23 de Abril de 2015

**DIRECTORES DE LA TESIS:**

**Dr. D. José Antonio  
Sánchez Pérez**

Catedrático de Ingeniería  
Química  
Universidad de Almería

**Dr. Dña. Pilar Fernández  
Ibáñez**

Científico Titular OPI  
Plataforma Solar de  
Almería - CIEMAT

**Dr. Dña. María de la  
Menta Ballesteros Martín**

Contratado Doctor  
Universidad de Pablo de  
Olavide



**MARCO DE LA TESIS**  
**THESIS FRAMEWORK**







## MARCO DE LA TESIS

La realización del presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo dentro del grupo “Ingeniería de Bioprocesos y Tecnologías del Agua (BIO-263)” del Departamento de Ingeniería Química y del grupo “Tecnologías avanzadas para la regeneración de aguas” del Centro de Investigación en Energía Solar, CIESOL, centro mixto Universidad de Almería-Ciemat (Plataforma Solar de Almería). Con esta tesis doctoral se inicia dentro del grupo una nueva línea de investigación en desinfección de aguas.

La investigación se enmarca dentro del proyecto de investigación “Desarrollo de nuevas estrategias basadas en fotocatalisis solar para la regeneración de aguas depuradas (CTQ2010-20740-C03-01)” financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad con una duración de tres años (2011-2013). Este proyecto se realiza en coordinación con el grupo de Análisis Ambiental y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Almería y el grupo de Tratamientos Solares de Aguas de la Plataforma Solar de Almería.

Dentro de este Proyecto, Dña. Elisabet Ortega Gómez ha disfrutado de una ayuda predoctoral de Formación de Personal Investigador (F.P.I.), durante el periodo comprendido entre 1 septiembre 2011 y 31 agosto 2015, concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2011-043886). Así mismo disfrutó de una beca de movilidad para estancias en el extranjero también concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (EEBB-I-14-08547). Esta beca de movilidad le permitió realizar una estancia de investigación de cuatro meses en el grupo de Procesos de Oxidación Avanzada de la *École Polytechnique Fédérale de Lausanne*, Suiza, liderado por el Prof. César Pulgarín, durante el periodo 30 de enero - 30 de mayo de 2014.

Los resultados presentados en esta memoria han sido publicados o están en proceso de publicación en revistas internacionales con índice de impacto científico. Dichos trabajos se citan a continuación:

### PUBLICACIONES

- **Ortega-Gómez, E.,** Fernández-Ibáñez, P., Ballesteros Martín, M.M., Polo-López, M.I., Esteban García, B., Sánchez Pérez, J.A. **Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival.** *Water Research*, 46 (18), 6154-6162 (2012).
  - **Ortega-Gómez, E.,** Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M., Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J.A. **Inactivation of *Enterococcus faecalis* in simulated wastewater**
-

**treatment plant effluent by solar photo-Fenton at initial neutral pH.** *Catalysis Today*, 209, 295-300 (2013).

- **Ortega-Gómez E., Ballesteros Martín M.M., Esteban García B., Sánchez Pérez J.A., Fernández Ibáñez, P. Solar photo-Fenton for *E. faecalis* inactivation: an investigation of the competitive role of resorcinol as model organic matter for oxidative species.** *Applied Catalysis B: Environmental*, 148–149, 484-489 (2014).
- **Ortega-Gómez, E., Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M., Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J. A. Inactivation of natural enteric bacteria in real municipal wastewater by solar photo-Fenton at neutral pH.** *Water Research*, 63, 316-324 (2014).
- **Ortega-Gómez, E., Ballesteros Martín, M.M., Carratala Ripolles, A., Fernández Ibañez, P., Sánchez Pérez, J.A., Pulgarín, C. Principal parameters affecting virus inactivation by the solar photo-Fenton process at neutral pH and  $\mu\text{M}$  concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Fe}^{2+/3+}$ .** *Applied Catalysis B: Environmental*. Accepted.
- **Ortega-Gómez, E., Ballesteros Martín, M.M., Esteban García, B., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Ibáñez, P. Is wastewater disinfection by photo-Fenton at neutral pH limited by solar irradiance?** *Applied Catalysis B: Environmental*. Under review.

También, se han realizado varias contribuciones a congresos nacionales e internacionales:

#### **APORTACIONES A CONGRESOS**

- **Ortega-Gómez, E., Esteban, B., Ballesteros, M.M., Fernández, P., Sánchez Pérez, J.A.** Estudio de la influencia de la radiación solar y del tiempo de exposición en la desinfección de agua residual por foto-Fenton a pH neutro. ISBN: 978-84-616-9173-9. Poster. XI Reunión de la Mesa Española de Tratamiento de Aguas (Meta 2014). 18<sup>th</sup> -20<sup>th</sup> June 2014, Alicante (España).
  - **Sánchez-Pérez, J.A., Ortega-Gómez, E., Fernández Ibáñez, P., Esteban, B., Ballesteros, M.M.** Solar Irradiance and exposure time on treated wastewater disinfection by photo-Fenton at neutral pH. Poster. 8<sup>th</sup> European Meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications (SPEA 8). 25<sup>th</sup> -28<sup>th</sup> June, 2014, Thessaloniki (Grecia).
-

- **Ortega Gómez, E.**, Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M. Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J.A. Disinfection of secondary effluent from WWTP by solar photo-Fenton process at neutral pH. ISBN: 978-84-15487-99-9. Poster. 3<sup>rd</sup> European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes (EAAOP-3). 27<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> October 2013, Almeria (España).
  - **Ortega Gómez, E.**, Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M. Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J.A. Disinfection of secondary effluent from WWTP by solar photo-Fenton process at neutral pH. Oral. 2<sup>nd</sup> International Conference on Photocatalytic and Advanced Oxidation Technologies for Treatment of Water, Air, Soil and Surfaces (PAOT-2). 9<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> September 2013, Gdansk (Polonia)
  - **Ortega Gómez, E.**, Fernández Ibáñez, P., Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M., Sánchez Pérez, J.A. Wastewater effluents disinfection by photo-Fenton. ISBN: 978-84-15487-33-3. Oral. X meeting of the Spanish water treatment committee (META 2012). 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> October 2012, Almeria (España).
  - Sánchez Pérez, J.A. **Ortega Gómez, E.**, Esteban García, B., Fernández Ibáñez, P., Ballesteros Martín, M.M. *Enterococcus faecalis* complete disinfection by solar photo-Fenton process. ISBN: 978-989-97667-3-0 and ISBN 978-989-97667-4-7. Poster. 7<sup>th</sup> European meeting on solar chemistry and photocatalysis environmental applications (SPEA7). 17<sup>th</sup> -20<sup>th</sup> June 2012, Porto (Portugal).
  - **Ortega Gómez, E.**, Ballesteros Martín, M.M., Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J.A. Effect of the temperature on wastewater disinfection by photo-Fenton process. Poster. I Mini-Symposium of Research in Experimental Science. 15<sup>th</sup> November 2011, Almeria (España).
  - **Ortega Gómez, E.**, Cabrera Reina, A., Carra Ruiz, I., Ballesteros Martín, M.M., Santos-Juanes Jordá, L. Effect of the temperature on wastewater disinfection by photo-Fenton process: *Enterococcus faecalis* inactivation . ISBN: 978-84-694-9814-9. Oral. VII Conference. "La investigación ante la sociedad del conocimiento. Sostenibilidad y medioambiente". 9<sup>th</sup> - 11<sup>th</sup> November 2011, Alcoy (España).
  - **Ortega Gómez, E.** Cabrera Reina, A., Santos-Juanes Jordá, L., Ballesteros Martín, M.M., Casas López, J.L., Román Sánchez, M.I., Sánchez Pérez, J.A. Effects of photo-Fenton operational variables on wastewater disinfection. Poster. 8<sup>th</sup> IWA International
-

Conference on Water Reclamation and Reuse. 26<sup>th</sup> - 29<sup>th</sup> September 2011, Barcelona (España).

- **Ortega Gómez, E.,** Santos-Juanes Jordá, L., Ballesteros Martín, M. M., Cabrera Reina, A., Román Sánchez, I. M., Sánchez Pérez, J. A. Water disinfection by photo-Fenton: Effects of experimental parameters on *E. Faecalis* survival. Poster. IWA (International Water Association) – Specialist Conference 2011, Water & Industry. 1<sup>st</sup> - 4<sup>th</sup> May 2011, Valladolid (España).

## THESIS FRAMEWORK

The work presented in this research has been carried out in the Bioprocess Engineering and Water Technologies Group (BIO-263) of the Chemical Engineering Department and in the Advanced Technologies for Water Regeneration Group of the Solar Energy Research Center, CIESOL, joint institute University of Almeria-CIEMAT (Plataforma Solar de Almería). In this PhD thesis a new research line on water disinfection has been started in the research group.

The research has been undertaken within the framework of the research project “Development of new strategies based on solar photocatalysis for treated water regeneration (CTQ2010-20740-C03-01)” funded by the Ministry of Economy and Competitiveness for a period of 3 years (2011-2013). This project has been conducted in collaboration with the Environmental Analysis and Water Treatments group from the University of Almeria and the Water Solar Treatments group of the Plataforma Solar de Almería.

In this project, Mrs. Elisabet Ortega Gómez was granted a scholarship for Research Staff Training (F.P.I.) from 1<sup>st</sup> September 2011 to 31<sup>st</sup> August 2015 by the Ministry of Economy and Competitiveness (BES-2011-043886). Furthermore, a grant for a research stay abroad was also funded by the Ministry of Economy and Competitiveness (EEBB-I-14-08547). This stay took place in the Advanced Oxidation Process research group headed by César Pulgarín at the Federal Polytechnic School of Lausanne, Switzerland, from 30<sup>th</sup> January to 30<sup>th</sup> May 2014.

The results shown in this thesis have been published or are in process of being published in international journals with scientific impact factor. The works are cited below:

### PUBLICATIONS

- **Ortega-Gómez, E.,** Fernández-Ibáñez, P., Ballesteros Martín, M.M., Polo-López, M.I., Esteban García, B., Sánchez Pérez. J.A. **Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival.** *Water Research*, 46 (18), 6154-6162 (2012).
  - **Ortega-Gómez, E.,** Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M., Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez. J.A. **Inactivation of *Enterococcus faecalis* in simulated wastewater treatment plant effluent by solar photo-Fenton at initial neutral pH.** *Catalysis Today*, 209, 295-200 (2013).
-

- **Ortega-Gómez E.**, Ballesteros Martín M.M., Esteban García B., Sánchez Pérez J.A., Fernández Ibáñez, P. **Solar photo-Fenton for *E. faecalis* inactivation: an investigation of the competitive role of resorcinol as model organic matter for oxidative species.** *Applied Catalysis B: Environmental*, 148–149, 484-489 (2014).
- **Ortega-Gómez, E.**, Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M., Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J. A. **Inactivation of natural enteric bacteria in real municipal wastewater by solar photo-Fenton at neutral pH.** *Water Research*, 63, 316-324 (2014).
- **Ortega-Gómez, E.**, Ballesteros Martín, M.M., Carratala Ripolles, A., Fernández Ibañez, P., Sánchez Pérez, J.A., Pulgarín, C. **Principal parameters affecting virus inactivation by the solar photo-Fenton process at neutral pH and  $\mu\text{M}$  concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Fe}^{2+/3+}$ .** *Applied Catalysis B: Environmental*. Accepted.
- **Ortega-Gómez, E.**, Ballesteros Martín, M.M., Esteban García, B., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Ibáñez, P. **Is wastewater disinfection by photo-Fenton at neutral pH limited by solar irradiance?** *Applied Catalysis B: Environmental*. Under review.

In addition, several contributions to national and international congresses, cited below, have been done:

#### CONFERENCE CONTRIBUTIONS

- **Ortega-Gómez, E.**, Esteban, B., Ballesteros, M.M., Fernández, P., Sánchez Pérez, J.A. Estudio de la influencia de la radiación solar y del tiempo de exposición en la desinfección de agua residual por foto-Fenton a pH neutro. ISBN: 978-84-616-9173-9. Poster. XI Reunión de la Mesa Española de Tratamiento de Aguas (Meta 2014). 18<sup>th</sup> -20<sup>th</sup> June 2014, Alicante (Spain).
  - Sánchez-Pérez, J.A., **Ortega-Gómez, E.**, Fernández Ibáñez, P., Esteban, B., Ballesteros, M.M. Solar Irradiance and exposure time on treated wastewater disinfection by photo-Fenton at neutral pH. Poster. 8<sup>th</sup> European Meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications (SPEA 8). 25<sup>th</sup> -28<sup>th</sup> June, 2014, Thessaloniki (Greece).
  - **Ortega Gómez, E.**, Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M. Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J.A. Disinfection of secondary effluent from WWTP by solar photo-Fenton
-

process at neutral pH. ISBN: 978-84-15487-99-9. Poster. 3<sup>rd</sup> European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes (EAAOP-3). 27<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> October 2013, Almeria (Spain).

- **Ortega Gómez, E.**, Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M. Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J.A. Disinfection of secondary effluent from WWTP by solar photo-Fenton process at neutral pH. Oral. 2<sup>nd</sup> International Conference on Photocatalytic and Advanced Oxidation Technologies for Treatment of Water, Air, Soil and Surfaces (PAOT-2). 9<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> September 2013, Gdansk (Poland).
  - **Ortega Gómez, E.**, Fernández Ibáñez, P., Esteban García, B., Ballesteros Martín, M.M., Sánchez Pérez, J.A. Wastewater effluents disinfection by photo-Fenton. ISBN: 978-84-15487-33-3. Oral. X meeting of the Spanish water treatment committee (META 2012). 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> October 2012, Almeria (Spain).
  - Sánchez Pérez, J.A. **Ortega Gómez, E.**, Esteban García, B., Fernández Ibáñez, P., Ballesteros Martín, M.M. *Enterococcus faecalis* complete disinfection by solar photo-Fenton process. ISBN: 978-989-97667-3-0 and ISBN 978-989-97667-4-7. Poster. 7<sup>th</sup> European meeting on solar chemistry and photocatalysis environmental applications (SPEA7). 17<sup>th</sup> -20<sup>th</sup> June 2012, Porto (Portugal).
  - **Ortega Gómez, E.**, Ballesteros Martín, M.M., Fernández Ibáñez, P., Sánchez Pérez, J.A. Effect of the temperature on wastewater disinfection by photo-Fenton process. Poster. I Mini-Symposium of Research in Experimental Science. 15<sup>th</sup> November 2011, Almeria (Spain).
  - **Ortega Gómez, E.**, Cabrera Reina, A., Carra Ruiz, I., Ballesteros Martín, M.M., Santos-Juanes Jordá, L. Effect of the temperature on wastewater disinfection by photo-Fenton process: *Enterococcus faecalis* inactivation . ISBN: 978-84-694-9814-9. Oral. VII Conference. "La investigación ante la sociedad del conocimiento. Sostenibilidad y medioambiente". 9<sup>th</sup> - 11<sup>th</sup> November 2011, Alcoy (Spain).
  - **Ortega Gómez, E.** Cabrera Reina, A., Santos-Juanes Jordá, L., Ballesteros Martín, M.M., Casas López, J.L., Román Sánchez, M.I., Sánchez Pérez, J.A. Effects of photo-Fenton operational variables on wastewater disinfection. Poster. 8<sup>th</sup> IWA International Conference on Water Reclamation and Reuse. 26<sup>th</sup> - 29<sup>th</sup> September 2011, Barcelona (Spain).
-

- **Ortega Gómez, E.**, Santos-Juanes Jordá, L., Ballesteros Martín, M. M., Cabrera Reina, A., Román Sánchez, I. M., Sánchez Pérez, J. A. Water disinfection by photo-Fenton: Effects of experimental parameters on *E. Faecalis* survival. Poster. IWA (International Water Association) – Specialist Conference 2011, Water & Industry. 1<sup>st</sup> - 4<sup>th</sup> May 2011, Valladolid (Spain).



# ÍNDICE DE CONTENIDOS





## ÍNDICE

<b>RESUMEN/SUMMARY.....</b>	<b>1</b>
-----------------------------	----------

## **PARTE I: INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL, MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Capítulo 1**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Problemática general del agua .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2. Consumo de agua en agricultura .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Reutilización de efluentes depurados. Empleo para riego en agricultura .....</b>	<b>17</b>
1.3.1. La reutilización de aguas depuradas en España para su uso en agricultura .....	19
<b>1.4. Indicadores microbiológicos de calidad del agua.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5. La reutilización de aguas en el marco legislativo .....</b>	<b>28</b>
1.5.1. Ley Española de reutilización de aguas.....	30
1.5.2. Comparación de los criterios de calidad del RD 1620/2007 con las recomendaciones de la OMS y la USEPA .....	32
<b>1.6. Tratamientos terciarios para la desinfección de aguas .....</b>	<b>34</b>
1.6.1. Filtración con membranas .....	34
1.6.2. Cloración .....	35
1.6.3. Ozonización.....	36
1.6.4. Luz ultravioleta (UV-C).....	37
1.6.5. Tratamientos terciarios de desinfección usados en España .....	37
<b>1.7. Aplicación de la radiación solar a los procesos de desinfección de aguas .....</b>	<b>38</b>
1.7.1. Efecto en la inactivación de microorganismos .....	38
1.7.2. Captadores Solares tipo CPC.....	40
<b>1.8. Proceso foto-Fenton solar .....</b>	<b>44</b>
1.8.1. Introducción a los procesos de oxidación avanzada.....	44
1.8.2. El proceso foto-Fenton .....	46
1.8.3. Química del hierro en agua.....	48
1.8.4. Variables involucradas en la desinfección mediante foto-Fenton solar .....	49
<b>1.9. Revisión del estado actual del proceso de desinfección mediante foto-Fenton a pH neutro.....</b>	<b>52</b>

### **Capítulo 2**

<b>2. OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL.....</b>	<b>63</b>
<b>2.1. Objetivos.....</b>	<b>63</b>
2.1.1. Objetivos generales .....	63
2.1.2. Objetivos específicos .....	64

**2.2. Plan de trabajo ..... 65**

### **Capítulo 3**

**3. MATERIALES Y MÉTODOS.....73**

**3.1. Microorganismos ..... 73**

3.1.1. *Enterococcus faecalis* ..... 73

3.1.2. Determinación de la concentración de microorganismos presentes en efluentes procedentes del tratamiento secundario de una EDAR (ESEDAR) ..... 74

3.1.3. Colifago MS2 ..... 76

3.1.4. *Echovirus* ..... 79

**3.2. Tipos de matrices acuosas utilizadas en el trabajo experimental ..... 80**

3.2.1. Medio isotónico ..... 80

3.2.2. Agua enriquecida con resorcinol como modelo de materia orgánica ..... 80

3.2.3. Agua simulada del efluente de una Estación Depuradora de Aguas Residuales ..... 80

3.2.4. Efluente del tratamiento secundario de EDAR (ESEDAR) ..... 81

3.2.5. Disolución de tampón carbonato (DTC) ..... 81

3.2.6. Agua natural de lago ..... 81

**3.3. Descripción de los reactores..... 83**

3.3.1. Reactor tubular ..... 83

3.3.2. Reactor tanque agitado ..... 83

3.3.3. Reactores tanque agitado encamisados ..... 84

3.3.4. Reactor solar CPC ..... 85

**3.4. Fuentes de fotones utilizadas ..... 86**

3.4.1. Luz solar artificial ..... 86

3.4.2. Luz solar natural ..... 87

**3.5. Procedimiento experimental..... 87**

**3.6. Medidas analíticas ..... 89**

3.6.1. Medida del Carbono Orgánico Disuelto (COD) ..... 89

3.6.2. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC/UV-DAD) ..... 90

3.6.3. Medida de aniones inorgánicos ..... 92

3.6.4. Medida de la turbidez ..... 93

3.6.5. Medida de la concentración de hierro (ISO 6332) ..... 94

3.6.6. Medida de la concentración de peróxido de hidrógeno ..... 95

3.6.7. Método de adición de Catalasa para la eliminación del peróxido de hidrógeno ..... 96

3.6.8. Medida del oxígeno disuelto, temperatura y pH ..... 97

## **PARTE II: RESULTADOS Y DUSCUSIÓN, CONCLUSIONES**

### **Capítulo 4**

**4. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA INACTIVACIÓN BACTERIANA MEDIANTE FOTO-FENTON A pH NEUTRO..... 103**

---

4.1. Efecto individual y combinado de los factores involucrados en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton a pH neutro .....	103
4.2. Efecto de la temperatura en la inactivación de <i>E. faecalis</i> mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro .....	109
4.3. Modelo cinético.....	113

## **Capítulo 5**

<b>5. EFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA EN LA INACTIVACIÓN BACTERIANA MEDIANTE FOTO-FENTON SOLAR A pH NEUTRO .....</b>	<b>119</b>
5.1. Estudio de la interacción del resorcinol con luz solar, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Fe <sup>2+</sup> .....	119
5.2. Efecto de la luz solar y la combinación luz solar/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y luz solar/Fe <sup>2+</sup> en la inactivación de <i>E. faecalis</i> en presencia y ausencia de resorcinol.....	121
5.3. Inactivación de <i>E. faecalis</i> en presencia y ausencia de resorcinol mediante la reacción de Fenton .....	124
5.4. Inactivación de <i>E. faecalis</i> mediante foto-Fenton solar a pH neutro. Efecto de la presencia de resorcinol.....	127
5.5. Inactivación de <i>E. faecalis</i> mediante foto-Fenton solar en reactores tipo CPC y con diferentes tipos de matrices .....	133
5.5.1. Efecto de las variables individuales y combinadas involucradas en la inactivación de <i>E. faecalis</i> mediante foto-Fenton solar a pH neutro en disolución salina .....	134
5.5.2. Inactivación de <i>E. faecalis</i> mediante foto-Fenton solar a pH neutro en diferentes tipos de matrices .....	135

## **Capítulo 6**

<b>6. EFECTO DE LA IRRADIANCIA Y DE LA ENERGÍA SOLAR ACUMULADA EN LA INACTIVACIÓN BACTERIANA MEDIANTE FOTO-FENTON SOLAR A pH NEUTRO.....</b>	<b>143</b>
6.1. Estudio del efecto de la intensidad de radiación en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar .....	143
6.2. Estudio de la influencia de la energía acumulada en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar .....	148

## **Capítulo 7**

<b>7. INACTIVACIÓN DE BACTERIAS ENTÉRICAS NATURALES PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO MUNICIPAL MEDIANTE FOTO-FENTON A pH NEUTRO .....</b>	<b>153</b>
7.1. Efecto individual y combinado del pH, estrés mecánico, luz solar, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y Fe <sup>2+</sup> .....	153
7.2. Desinfección mediante foto-Fenton solar a pH neutro .....	157

7.3. Cumplimiento de la normativa actual en materia de regeneración de aguas residuales .....	158
7.4. Efecto de la concentración natural de bicarbonato en el tratamiento foto-Fenton .....	161
7.5. Efecto de la adición de hierro en el proceso foto-Fenton .....	162
7.6. Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno en la eficiencia de foto-Fenton .....	164
7.7. Efecto de la variabilidad estacional del efluente secundario de una estación depuradora de aguas residuales .....	165

## **Capítulo 8**

<b>8. PRINCIPALES PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA INACTIVACIÓN DE VIRUS MEDIANTE EL PROCESO FOTO-FENTON SOLAR A pH NEUTRO Y CONCENTRACIONES <math>\mu\text{M}</math> DE <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> Y <math>\text{Fe}^{2+/3+}</math> .....</b>	<b>169</b>
--	------------

8.1. Influencia del $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , exposición solar y sus combinaciones en la inactivación del virus MS2 .....	169
8.1.1. Efecto de las variables individuales: $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ y exposición solar .....	170
8.1.2. Efecto del proceso Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ y $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ ) .....	172
8.1.3. Efecto combinado de la radiación solar y $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	174
8.1.4. Efecto combinado de la exposición solar y $\text{Fe}^{2+/3+}$ .....	175
8.2. Inactivación de MS2 mediante el proceso foto-Fenton a pH neutro .....	177
8.3. Aplicabilidad del proceso foto-Fenton en la inactivación de virus .....	182
8.4. Mecanismos involucrados en la inactivación de MS2 por foto-Fenton neutro .....	184

## **Capítulo 9**

<b>9. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>	<b>189</b>
--	------------

<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>195</b>
--------------------------	------------

## **AGRADECIMIENTOS**

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1:

**Figura 1.1.** Disponibilidad del agua per cápita en el mundo desde 1950 hasta 2025 (Human Development Report, UNDP, 2006).

**Figura 1.2.** Desglose del uso del agua dulce en los diferentes continentes (Water at a Glance, FAO, 2011).

**Figura 1.3.** EDAR con sistemas de reutilización en España (●), (CEDEX, 2008).

**Figura 1.4.** Tratamientos terciarios de desinfección usados en España (CEDEX, 2008).

**Figura 1.5.** Principales daños biológicos producidos por las distintas franjas del espectro UV (adaptado de Malato *et al.*, 2009).

**Figura 1.6.** Esquema de diseño de la curva del captador CPC (Blanco, 2002a).

**Figura 1.7.** Diagrama de rayos de la radiación reflejada en la superficie de un espejo CPC (Blanco *et al.*, 2000; 2002a).

**Figura 1.8.** Irradiancia mensual media en la PSA: relación entre medida en plano inclinado y horizontal (espectro global y UV), (Navntoft *et al.*, 2012).

**Figura 1.9.** Especies de hierro férrico presentes en solución acuosa a diferentes valores de pH a una concentración de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , calculado con constante de equilibrio de Flynn (1984) a una temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Capítulo 3:

**Figura 3.1.** Sistema experimental utilizado en el estudio del efecto de la temperatura en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro.

**Figura 3.2.** Montaje experimental utilizado en el estudio del efecto de la radiación en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro.

**Figura 3.3.** Planta de fotorreactores solares CPC. a) Esquema, b) Fotografía.

**Figura 3.4.** Piranómetro LP UVA 02 de Delta OHM utilizado para la medida de la radiación UV.

**Figura 3.5.** Equipo utilizado para la determinación de CT, CIT, COT y NT.

---

**Figura 3.6.** Equipo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución utilizado para el seguimiento de la concentración de resorcinol.

**Figura 3.7.** Cromatógrafo iónico utilizado para la determinación de la concentración de aniones del efluente de secundario de la EDAR.

**Figura 3.8.** Turbidímetro portátil HI 93703 C de HANNA Instruments.

#### **Capítulo 4:**

**Figura 4.1. a)** Inactivación de *E. faecalis* en el reactor a 20°C frente a: i) Estrés mecánico (-▲-), ii) radiación solar artificial (-△-), iii) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-■-), iv) Fe<sup>2+</sup> (-◆-), v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup> (Fenton, -●-), vi) radiación UVA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-), vii) Radiación UV y Fe<sup>2+</sup> (-◇-) y viii) photo-Fenton (-○-). **b)** Descomposición de peróxido de hidrógeno en el proceso: i) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-▲-), ii) radiación UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-■-), iii) Fenton, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (-▼-) y iv) foto-Fenton, UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (-●-). Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=120 mg L<sup>-1</sup> y concentración de Fe<sup>2+</sup> = 10 mg L<sup>-1</sup>.

**Figura 4.2.** Inactivación de *E. faecalis* por foto-Fenton con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 20 mg L<sup>-1</sup> (-■-), 70 mg L<sup>-1</sup> (-●-) y 120 mg L<sup>-1</sup> (-▲-). Concentración de Fe<sup>2+</sup>: 10 mg L<sup>-1</sup>. Temperatura: 20 °C.

**Figura 4.3.** Evolución de: **a)** concentración de Fe<sup>2+</sup> y **b)** concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH inicial neutro a diferentes temperaturas: 10 °C (-▲-), 20 °C (-●-), 30 °C (-■-) y 40 °C (-▼-).

**Figura 4.4.** Inactivación de *E. Faecalis* mediante el proceso foto-Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 120 mg L<sup>-1</sup> y Fe<sup>2+</sup> = 10 mg L<sup>-1</sup>) a diferentes temperaturas: 10 °C (-▲-), 20 °C (-●-), 30 °C (-■-) y 40 °C (-▼-).

**Figura 4.5.** Valores de  $k_{max}$  frente a  $1/T^a$ . Los valores del eje de abscisas corresponden a las temperaturas ensayadas (10 – 40 °C).

#### **Capítulo 5:**

**Figura 5.1.** Degradación de 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol en presencia de: i) una irradiancia solar de 30 W m<sup>-2</sup> de UV-A (foto-degradación) (-■-), ii) 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> (-●-) y iii) 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-▲-).

**Figura 5.2.** Precipitación del hierro en presencia de 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol y 2.5 (-■-), 5 (-●-), 10 (-▲-) y 20 (-◆-) mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>.

---



**Figura 5.3.** Evolución de la concentración de peróxido de hidrógeno en presencia de 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol y 10 (-■-), 20 (-●-) y 50 (-▲-) mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Figura 5.4.** Efecto del resorcinol en el proceso luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en función de la concentración inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>): 0 (-◆-), 10 (-●-), 20 (-■-) y 50 (-▲-) en: **a)** la inactivación de *E. faecalis* y **b)** concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Símbolos cerrados: 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol. Símbolos abiertos: sin resorcinol.

**Figura 5.5.** Inactivación de *E. faecalis* mediante luz solar/Fe<sup>2+</sup> con 2.5 (-●-), 5 (-■-) y 20 (-▲-) mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>. Símbolos cerrados: 10 mg L<sup>-1</sup> resorcinol. Símbolos abiertos: sin resorcinol.

**Figura 5.6. a)** Inactivación de *E. faecalis* mediante la reacción de Fenton a dos niveles de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (mg L<sup>-1</sup>): 5/2.5 (-●-) y 50/20 (-■-), **b)** Evolución de la concentración de hierro disuelto, **c)** Evolución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y **d)** Evolución de la concentración de resorcinol. Símbolos cerrados: con 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol. Símbolos abiertos: sin resorcinol.

**Figura 5.7.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton: **a)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>: 5/2.5 (-○-), 10/5 (-□-), 20/10 (-△-) y 50/20 (-◇-) mg L<sup>-1</sup> sin resorcinol y **b)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>: 5/2.5 (-●-), 10/5 (-■-), 20/10 (-▲-) y 50/20 (-◆-) mg L<sup>-1</sup> con resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup>).

**Figura 5.8.** Concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-●-), Fe<sup>2+</sup> (-■-) y resorcinol (-▲-) durante la desinfección de *E. faecalis* mediante foto-Fenton en presencia de resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup>) a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>: **a)** 5/2.5, **b)** 10/5, **c)** 20/10 y **d)** 50/20 mg L<sup>-1</sup>. Símbolos abiertos: sin resorcinol añadido.

**Figura 5.9.** Degradación del resorcinol durante el proceso foto-Fenton en ausencia de bacteria a las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> de: (-●-) 5/2.5, (-■-) 10/5, (-▲-) 20/10 y (-◆-) 50/20 mg L<sup>-1</sup>

**Figura 5.10.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>: 10/5 mg L<sup>-1</sup>) con 10 (-●-), 20 (-■-), 30 (-▲-) y 40 (-◆-) mg L<sup>-1</sup> de resorcinol.

**Figura 5.11.** Inactivación de *E. faecalis* en reactores tipo CPC en una matriz de disolución salina i) estrés mecánico (oscuridad) (■); ii) pH 3.5 (◆); iii) luz solar (●); iv) luz solar y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mg L<sup>-1</sup>) (▲) y v) Fenton (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) (▼).

**Figura 5.12.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar en reactor tipo CPC (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) en: **a)** disolución salina; **b)** disolución salina y resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup> de COD) y **c)** Efluente simulado de EDAR. *E. faecalis* UFC mL<sup>-1</sup> (●); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup> (□); ajuste de los datos

experimentales de la inactivación de *E. faecalis* al modelo cinético de Chick-Watson modificado (-).

### **Capítulo 6:**

**Figura 6.1.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro a diferentes intensidades de radiación UV-A: **a)** 10, **b)** 20 y **c)** 30 W m<sup>-2</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50 mg L<sup>-1</sup>, [Fe<sup>2+</sup>] = 20 mg L<sup>-1</sup>. T<sup>a</sup> = 25 °C.

**Figura 6.2.** Evolución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro llevado a cabo a diferentes intensidades de radiación UV-A: **a)** 10, **b)** 20 y **c)** 30 W m<sup>-2</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50 mg L<sup>-1</sup>, [Fe<sup>2+</sup>] = 20 mg L<sup>-1</sup>. T<sup>a</sup> = 25 °C.

**Figura 6.3.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro frente a la dosis de energía acumulada alcanzada a diferentes intensidades de radiación UV-A: **a)** 10 (-●-), **b)** 20 (-▲-) y **c)** 30 W m<sup>-2</sup> (-■-). [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50 mg L<sup>-1</sup>, [Fe<sup>2+</sup>] = 20 mg L<sup>-1</sup>. T<sup>a</sup> = 25 °C.

### **Capítulo 7:**

**Figura 7.1.** Efecto del pH (2.8 (-▲-), 5 (-●-) y 7 (-■-)) en la viabilidad de coliformes totales (símbolos cerrados) y *E. coli* (símbolos abiertos).

**Figura 7.2.** Inactivación de coliformes totales en fotorreactores CPC. Experimentos en oscuridad: estrés mecánico (-○-), 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-), 100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-△-), 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> (-▽-), Fenton (-◇-). Experimentos con radiación solar: UV-A (-●-), UV-A/20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> (-■-) y UV-A/50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-◆-).

**Figura 7.3.** Inactivación de coliformes totales y *E. coli* mediante el tratamiento UV-A con 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (símbolos abiertos) y el proceso foto-Fenton (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) (símbolos cerrados). Coliformes totales (-○-), *E. coli* (-◇-) y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-).

**Figura 7.4.** Efecto de la concentración de bicarbonato en la desinfección de agua mediante foto-Fenton (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>). Coliformes totales (-○-), *E. coli* (-◇-) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-). Símbolos abiertos, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 100 ± 5 mg L<sup>-1</sup>. Símbolos cerrados, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 250 ± 12 mg L<sup>-1</sup>.

**Figura 7.5.** Efecto de la dosificación de hierro en la desinfección por foto-Fenton. Coliformes totales (-○-), *E. coli* (-◇-) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-). Símbolos abiertos, adiciones de hierro 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>, a t=0; 10 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>, a t=5 min; 10 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>, a t=10 min. Símbolos sólidos, con una adición de 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>.

---

**Figura 7.6.** Desinfección de agua con concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno. Símbolos abiertos, UV-A/100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Símbolos cerrados, foto-Fenton (100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>). Coliformes totales (-○-), *E. coli* (-◇-) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-).

**Figura 7.7.** Inactivación de coliformes totales mediante foto-Fenton (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>), replicas con ESEDAR obtenidas en 5 días diferentes de un año: ESEDAR1 (-■-), ESEDAR2 (-●-), ESEDAR3 (-◆-), ESEDAR4 (-□-) y ESEDAR5 (-▲-).

## Capítulo 8:

**Figura 8.1.** Inactivación de MS2 en DTC a pH 8 mediante el efecto individual del estrés mecánico (-□-), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-▲-), Fe<sup>2+</sup> (-◆-), Fe<sup>3+</sup> (-◇-) y la radiación solar (-●-) y el efecto combinado de luz solar/Fe<sup>2+</sup> (-■-). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1 mg L<sup>-1</sup>, Fe<sup>2+/3+</sup> = 1 mg L<sup>-1</sup> y I<sub>UV</sub> = 30 W m<sup>-2</sup>).

**Figura 8.2.** Inactivación de MS2 en DTC a pH 8 mediante la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (reacción de Fenton) (-◆-), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> (reacción de Fenton) (-▲-), luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-), luz solar/Fe<sup>3+</sup> (-○-), luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (reacción de foto-Fenton) (-■-) y luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> (reacción de foto-Fenton) (-●-) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1 mg L<sup>-1</sup>, Fe<sup>2+/3+</sup> = 1 mg L<sup>-1</sup> y I<sub>UV</sub> = 30 W m<sup>-2</sup>).

**Figura 8.3.** Inactivación de MS2 a pH 8 con: **a)** 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup> y 15 (-▲-), 30 (-■-) y 45 (-●-) W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A; **b)** 30 W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A y 0.1 (-▲-), 0.5 (-●-) y 1 (-■-) mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>.

**Figura 8.4.** Inactivación de MS2 mediante el proceso foto-Fenton con 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup> y 30 W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A a pH 6 (-▲-), pH 7 (-●-) y pH 8 (-■-). Viabilidad de MS2 a pH 6, 7 y 8 (símbolos abiertos).

**Figura 8.5.** Inactivación de MS2 mediante foto-Fenton a pH 8 con: **a)** 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup> y 15 (-▲-), 30 (-■-) y 45 (-●-) W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A; **b)** 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>, 30 W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A y 0.1 (-▲-), 0.5 (-●-) y 1 (-■-) mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **c)** 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A y 0.1 (-▲-), 0.5 (-●-) y 1 (-■-) mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>.

**Figura 8.6.** Inactivación de MS2 utilizando como matriz agua natural del lago Lemán: UV-A (-□-), UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-▲-), UV-A/Fe<sup>3+</sup> (-◆-) y foto-Fenton a pH 8 (-■-). Inactivación de *Echovirus* por foto-Fenton a pH 8 en una matriz DTC (-●-). Límites de detección para las medidas de concentración de MS2 (-) y *Echovirus* (-). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1 mg L<sup>-1</sup>, Fe<sup>3+</sup> = 1 mg L<sup>-1</sup> y I<sub>UV</sub> = 30 W m<sup>-2</sup>).

**Figura 8.7.** Representación mecanística de las posibles vías involucradas en la inactivación del bacteriófago MS2 por foto-Fenton.

## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo 1:

**Tabla 1.1.** Volumen de aguas depuradas procedentes de EDAR que se reutilizan en España en función de la Comunidad Autónoma (CEDEX, 2008).

**Tabla 1.2.** Usos del agua regenerada en España (CEDEX, 2008).

**Tabla 1.3.** Tratamientos terciarios realizados en las depuradoras españolas (CEDEX, 2008).

**Tabla 1.4.** Ejemplos de EDAR que proporcionan agua de riego a partir de agua depurada a comunidades de regantes. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 1.5.** Indicadores microbianos e indicadores patogénicos asociados con enfermedades transmitidas por el agua y fuentes comunes de contaminación (Naidoo y Olaniran, 2014).

**Tabla 1.6.** Legislación española relacionada con el RD de reutilización de aguas.

**Tabla 1.7.** Comparación de los criterios de calidad microbiológicos requeridos por el RD de reutilización español, las directrices de la OMS y las directrices de la USEPA para el empleo de las aguas reutilizadas según su uso.

**Tabla 1.8.** Publicaciones de inactivación de microorganismos presentes en agua mediante foto-Fenton solar a pH neutro.

### Capítulo 3:

**Tabla 3.1.** Caracterización química y microbiológica del efluente real de EDAR (El Bobar, Almería, España). Muestras tomadas durante el periodo febrero 2012- febrero 2013.

**Tabla 3.2.** Caracterización química del agua procedente del lago Lemán, Suiza. Media de tres muestras tomadas entre febrero y Octubre 2002 (Rincón y Pulgarín, 2004b).

### Capítulo 4:

**Tabla 4.1.** Parámetros cinéticos obtenidos de la inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton a diferentes temperaturas y según la Ecuación 4.4.

---

**Capítulo 7:**

**Tabla 7.1.** Valores máximos admisibles para los criterios biológicos de calidad para la reutilización de las aguas según sus usos. Las casillas en gris son aquellas en las que el efluente de ESEDAR, tras el tratamiento por foto-Fenton solar a pH neutro, cumple los valores máximos admisibles.

**Tabla 7.2.** Constantes cinéticas de inactivación para la desinfección de coliformes totales mediante foto-Fenton a diferentes días durante las estaciones de otoño e invierno.

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>APHA</b>	Asociación Americana de Salud Pública (American Public Health Association)
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>CA</b>	Carbón Activo
<b>CE</b>	Comunidad Europea
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CEE</b>	Comunidad Económica Europea
<b>CEDEX</b>	Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas
<b>CI</b>	Cromatografía Iónica
<b>CIT</b>	Carbono Inorgánico Total
<b>CIESOL</b>	Centro de Investigaciones en Energía Solar
<b>COD</b>	Carbono Orgánico Disuelto
<b>COT</b>	Carbono Orgánico Total
<b>CT</b>	Carbono Total
<b>CPC</b>	Captadores Parabólicos Compuestos
<b>DMA</b>	Directiva Marco de Aguas
<b>DTC</b>	Disolución de Tampón Carbonato
<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Aguas Residuales
<b>EDDS</b>	Ácido etilendiamina-N,N'-disuccinico
<b>ESEDAR</b>	Efluente Simulado de una Estación Depuradora de Aguas Residuales
<b>FAO</b>	Organización de la Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
<b>FC</b>	Factor de Concentración
<b>LB</b>	Luria-Bertani, medio de cultivo
<b>LD</b>	Límite de Detección

---

<b>LED</b>	Diodo Emisor de Luz (Light-Emitting Diode)
<b>MBR</b>	Biorreactor de Membranas (Membrane Biorreactor)
<b>MON</b>	Materia Orgánica Natural
<b>NMPUCP</b>	Número Más Probable de Unidades Citopáticas
<b>NT</b>	Nitrógeno Total
<b>OD</b>	Oxígeno Disuelto
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PET</b>	Tereftalato de Polietileno (poly ethylene terephthalate)
<b>PNUMA</b>	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP, United Nations Environment Programme)
<b>POA</b>	Proceso de Oxidación Avanzada
<b>PSA</b>	Plataforma Solar de Almería
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno, comercialmente Teflón
<b>R<sup>•</sup></b>	Radical Orgánico
<b>RD</b>	Real Decreto
<b>RDPH</b>	Reglamento del Dominio Público Hidráulico
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
<b>SODIS</b>	Proceso de Desinfección Solar (Solar Disinfection)
<b>SOMCPH</b>	Colifagos Somáticos (Somatic Coliphages)
<b>TCLM</b>	Transferencia de Carga Ligando-Metal
<b>TLD</b>	Tiempo en alcanzar el Límite de Detección
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UFP</b>	Unidades Formadoras de Placas
<b>UNDP</b>	Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (United Nations Development Programme)
<b>UNFPA</b>	Fondo de Población de las Naciones Unidas (United Nations Population Fund)
<b>UNT</b>	Unidades Nefelométricas de Turbidez
<b>UPLC</b>	Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución (Ultra Performance Liquid

---



Chromatography)

**USEPA** Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (Unites States Environmental Protection Agency)

**UV** Ultravioleta

**UV-A** Ultravioleta-A, longitud de onda en el rango 320-380 nm

**UV-B** Ultravioleta-B, longitud de onda en el rango 290-320 nm

**UV-C** Ultravioleta-C, longitud de onda en el rango 190-290 nm

**Vis** Visible

**WHO** Organización Mundial de la Salud (World Organization Health)

---



# RESUMEN/SUMMARY





## RESUMEN/SUMMARY

### RESUMEN

La escasez de agua dulce en el planeta, principalmente debida a la sequía y a la contaminación de sus fuentes, supone uno de los principales problemas medioambientales que afectan actualmente a la población humana. En las últimas décadas, la fuerte demanda de agua con calidad adecuada para su utilización en diversas actividades, ha obligado a buscar soluciones alternativas que implican grandes esfuerzos a nivel científico, político, económico y social. En particular, la reutilización del agua residual depurada, tras un tratamiento adecuado, surge recientemente como fuente de abastecimiento para sectores en los que se consumen grandes cantidades de agua, como es la agricultura, que produce el 60% de la alimentación mundial según la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). Sin embargo, para poder evolucionar en este sentido es necesario desarrollar tratamientos que permitan asegurar la calidad microbiológica del agua reutilizada conforme a la legislación vigente y solventar los problemas o desventajas que presentan los tratamientos utilizados actualmente.

Entre las nuevas tecnologías disponibles para la regeneración de aguas residuales cabe destacar, por su elevada eficiencia, los procesos de oxidación avanzada (PPOA). Asimismo, son especialmente interesantes aquellos que son capaces de emplear la luz solar como fuente de radiación, destacando el proceso fotocatalítico homogéneo, foto-Fenton solar. De modo general, durante las reacciones de Fenton, un oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reacciona con un catalizador ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y genera radicales hidroxilo, especie altamente oxidante y no selectiva que causa la inactivación de diferentes microorganismos. La presencia de fotones UV-A en la luz solar conduce a la regeneración del catalizador y a la producción de más radicales hidroxilo.

Uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación ha sido mejorar el conocimiento sobre el proceso de inactivación de microorganismos mediante foto-Fenton solar a pH neutro, escasamente estudiado, para su aplicación como tratamiento terciario en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Con este fin, se ha utilizado como indicador de contaminación fecal la bacteria *Enterococcus faecalis* (microorganismo Gram-positivo) puesto que ha sido poco estudiada hasta el momento y podría ser mejor indicador que *Escherichia coli* por su mayor resistencia a los tratamientos desinfectantes. Esta bacteria se ha empleado como microorganismo modelo para estudiar en detalle el efecto de variables como la temperatura, la intensidad de radiación y la composición de la matriz acuosa. Asimismo, se ha comprobado la eficiencia del proceso foto-Fenton solar a pH neutro en condiciones reales de aplicación,

utilizando microorganismos propios del agua residual de una EDAR en lugar de microorganismos de colección. También se ha investigado la eficiencia del tratamiento foto-Fenton en otros indicadores de contaminación fecal como los virus, en los que este proceso había sido evaluado escasamente.

Los estudios del efecto de la temperatura y la irradiancia en la inactivación bacteriana mediante el proceso foto-Fenton se han llevado a cabo manteniendo constantes el resto de variables que afectan a la eficiencia del proceso fotocatalítico, a fin de eliminar posibles interferencias. Los resultados experimentales alcanzados han permitido obtener para cada caso un modelo cinético de primer orden que permite predecir la velocidad de inactivación bacteriana. Además, se ha realizado un estudio exhaustivo para determinar si la irradiancia o la energía acumulada son adecuadas para la estandarización y automatización de tratamientos de desinfección solares.

Otro de los principales parámetros que afecta al proceso de desinfección mediante foto-Fenton solar es la composición de la matriz acuosa. A este respecto, en primer lugar se ha estudiado la interacción entre los procesos simultáneos de desinfección de microorganismos y degradación de la materia orgánica evaluando la posible competencia por las principales especies oxidantes generadas durante el proceso foto-Fenton. Con este estudio se comprobó que existe un efecto competitivo, que tiene una marcada influencia en los resultados de desinfección siendo determinantes las concentraciones de reactivos empleadas. Como indicador de contaminación fecal se ha utilizado *E. faecalis* y como modelo de materia orgánica, resorcinol. En segundo lugar, con las concentraciones de reactivos que proporcionaron mejores resultados en el estudio anterior, se ha evaluado el efecto de diferentes matrices acuosas en la inactivación de *E. faecalis*: i) una disolución salina de NaCl al 0.9%, ii) agua destilada con resorcinol como modelo de materia orgánica y iii) un agua que simula el efluente del secundario de una estación depuradora de aguas residuales (ESEDAR). Estos ensayos se han llevado a cabo en fotorreactores tipo CPC, con un volumen de trabajo de 7L, para poder obtener resultados extrapolables a los esperados en planta a mayor escala. Con los resultados obtenidos, se ha podido demostrar que el aumento en la complejidad de la composición de la materia orgánica mejora la cinética de desinfección, reduciendo el tiempo de tratamiento necesario para alcanzar el límite de detección. Esta característica hace del proceso foto-Fenton una opción interesante para su aplicación como tratamiento terciario en una EDAR, donde la complejidad de la matriz acuosa es elevada. Finalmente, en los mismos fotorreactores se ha realizado un estudio detallado de la inactivación mediante foto-Fenton solar a pH neutro de microorganismos propios

de un efluente del tratamiento secundario de una EDAR urbana ("El Bobar", Almería). Se ensayaron diferentes estrategias de operación y se demostró que se alcanza el límite de detección en tiempos cortos de tratamiento. Además, se evaluó la eficiencia de este proceso frente a variaciones estacionales de la contaminación, y se demostró que el agua tratada cumple con los parámetros microbiológicos de calidad del agua regenerada acorde a la legislación española para su posterior reutilización como agua de riego en agricultura.

Finalmente, se ha llevado a cabo el estudio de los mecanismos involucrados en la inactivación mediante foto-Fenton solar de otros indicadores importantes de contaminación fecal como son los virus. Para ello, se realizó un estudio exhaustivo de los procesos involucrados en la inactivación del colifago MS2 mediante el tratamiento foto-Fenton (UV/Fe, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe y UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe) y se evaluó la influencia de las principales variables del proceso foto-Fenton, como el estado de oxidación del Fe empleado (Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>), pH, concentración de Fe y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e intensidad de radiación UV. Se demostró que el proceso foto-Fenton también es eficiente para alcanzar límites de detección bajos con este tipo de microorganismos. Además, se verificó su eficiencia en agua natural del lago Lemán (Suiza) y en la inactivación de un virus humano como *Echovirus*.

Los resultados obtenidos en esta investigación ponen de manifiesto que mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro, se alcanza la inactivación de microorganismos presentes en aguas residuales depuradas hasta los niveles de carga biológica admitidos por la legislación, cumpliendo las especificaciones de calidad establecidas en materia de reutilización de aguas regeneradas. Además, los tiempos cortos de tratamiento, junto con el uso de luz solar como fuente de radiación, una baja cantidad de reactivos y la ausencia de subproductos tóxicos, hacen del proceso foto-Fenton una alternativa muy prometedora frente a los tratamientos terciarios actualmente implantados en las EDAR urbanas con el fin de regenerar aguas depuradas para su posterior uso en agricultura.





**SUMMARY**

The global fresh water shortage, caused mainly by the drought and the pollution of sources, is one of the main environmental problems currently affecting the human race. Over the last few decades, water quality requirements for use in different activities has obliged us to find alternative solutions which requires a concerted effort at a scientific as well as political, economic and social level. In particular, treated wastewater recycling has come up recently as a source provision for sectors where high water quantities are consumed. In this regard, the main sector to benefit is agriculture, which produces the 60% of global food, according to Food and Agriculture Organization (FAO). As such, treatments that are able to guarantee water microbiological quality, as stated by governing law, are necessary and resolve disadvantages or problems with current treatments.

Amongst new technologies available for wastewater regeneration, a noteworthy point is the high level of efficiency in Advanced Oxidation Processes (AOPs). Furthermore, those that are capable of using sunlight as a radiation source are of special interest, particularly the homogeneous photocatalytic process, solar photo-Fenton. Generally speaking, in Fenton reactions, an oxidant agent ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reacts with a catalyst ( $\text{Fe}^{2+}$ ) generating hydroxyl radicals, which are high oxidant and non-selective species causing the inactivation of several microorganisms. The presence of UV-A photons in sunlight leads to catalyst regeneration and the production of more hydroxyl radicals.

One of the main goals of this research work has been to improve the knowledge about the microorganism inactivation process through solar photo-Fenton at neutral pH, which has been scarcely studied, for application as a tertiary treatment in a wastewater treatment plant (WWTP). With this aim in mind, the bacteria *Enterococcus faecalis* (Gram-positive microorganism) has been used as a fecal pollution indicator since it has not been studied in great detail until now. It is a more able and better indicator than *Escherichia coli* due to its higher resistance to disinfectant treatments. This bacterium has been used as model microorganism in order to study at length the effect of variables such as temperature, radiation intensity and the water matrix composition. Furthermore, the efficiency of solar photo-Fenton process at neutral pH under real conditions has been tested, using microorganisms from wastewater coming from a WWTP instead of a microorganism collection. Also the efficiency of the photo-Fenton treatment in other fecal pollution indicators, such as viruses, which had very little research dedicated to it, has now been investigated.

Studies of the effect of temperature and irradiance on bacteria inactivation through the photo-Fenton process have been carried out, whilst keeping constant other variables affecting the efficiency of the photocatalytic process, with the purpose of removing interference. Experimental results allowed a first order kinetic model to be achieved in each case, for the prediction of bacterial inactivation rate. Moreover, an in-depth study has been carried out to determine whether the irradiance or the accumulated energy is appropriate for the standardization and automation of solar disinfection treatments.

Another of the main parameters affecting the disinfection process by solar photo-Fenton is the water matrix composition. On that count, the interaction between simultaneous processes of microorganism disinfection and organic matter degradation has been studied, firstly evaluating the possible competence for the main oxidant species generated during the photo-Fenton process. Within this study a competitive effect has been tested. This greatly affects the disinfection results and proves that the concentrations of reactive agents are decisive. *E. faecalis* and resorcinol have been used as a pollution indicator and as an organic matter model, respectively. Secondly, based on reactive agent concentrations, at which the best results were attained, the effect of several water matrices on the *E. faecalis* inactivation has been evaluated: i) saline solution (0.9% NaCl), ii) distilled water with resorcinol as organic matter model and iii) WWTP secondary effluent simulated water. These experiments were carried out in 7L CPC photoreactors with the aim of gaining comparable results to those expected at large-scale. These results demonstrated that as the complexity of the organic matter composition increases, the disinfection kinetic improves, reducing the time needed for the treatment to achieve the detection limit. This feature makes the photo-Fenton process an option of interest for the use as tertiary treatment in WWTPs, where the complexity of the water matrix is high. Finally, a study of wild microorganism inactivation from a WWTP ("El Bobar", Almeria) secondary effluent by solar photo-Fenton at neutral pH was been carried out in the same photoreactors. Several operation strategies were tested demonstrating that the detection limit was achieved in short treatment times. Furthermore, the efficiency of this process was evaluated under different seasonal pollutant conditions, establishing that treated water follows the microbiological quality parameters for regenerated water according to Spanish law for its subsequent recycling as irrigation water in agriculture.

Finally, a study of the mechanisms involved in virus inactivation by solar photo-Fenton has been also carried out. To this end, implicated processes in coliphage MS2 inactivation by photo-Fenton treatment (UV/Fe, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe) have been studied in great

detail. Also the influence of the main variables of the photo-Fenton process, such as the Fe oxidation state ( $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$ ), pH, Fe and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations and UV radiation intensity, has been evaluated. The photo-Fenton process proved to be suitable in achieving low detection limits for this microorganism. Moreover, its efficiency in water from Lake Lemman (Switzerland) was verified, along with the inactivation of the human virus *Echovirus*.

The results obtained in this research reveal that the solar photo-Fenton process at neutral pH allows the inactivation of microorganisms from treated wastewater up to a biological load accepted by the law, following the specifications established in water recycling. In addition, short treatment times, combined with i) the use of sunlight as a radiation source, ii) a low reactive agents quantity and iii) the lack of toxic derivatives, makes the photo-Fenton process a suitable alternative for tertiary treatments currently used in urban WWPTs with the aim of regenerating treated water for it to be subsequently used in agriculture.



# PARTE I

---

## INTRODUCCIÓN OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL MATERIALES Y MÉTODOS





# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUCCIÓN





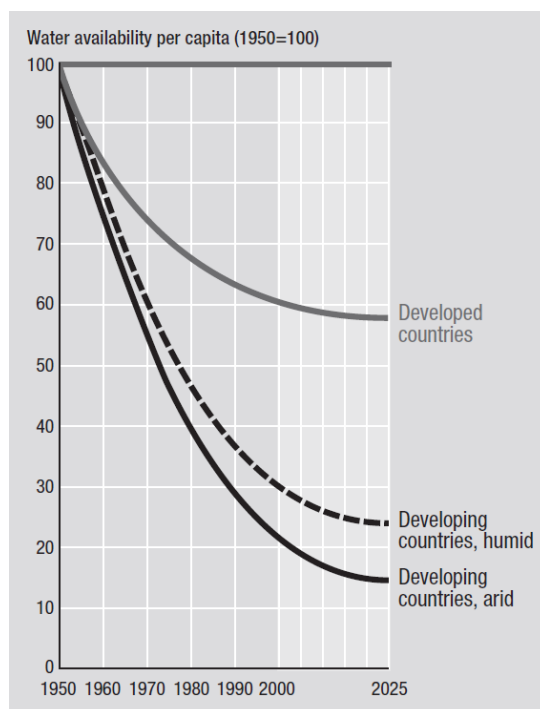


## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Problemática general del agua

El agua susceptible de ser utilizada por el hombre para su consumo proviene de lagos, corrientes, pantanos, humedales y acuíferos accesibles. Las recargas de agua de forma natural por precipitación para renovar estos recursos hídricos son limitadas, llegándose a alcanzar el límite en la obtención y extracción de los mismos. Hay que tener en cuenta que no todas las entradas de agua computan en la recarga del recurso, puesto que aproximadamente un tercio de ellas se pierde por evaporación; otro tercio se fija en el suelo por la vegetación y los organismos que componen la biosfera; y otro tercio llega a cauces y lagos superficiales y subterráneos y finalmente, al mar. Ejemplos de impactos importantes sobre la excesiva explotación del agua se pueden observar en áreas de los Estados Unidos, China, India y España, donde se está consumiendo agua subterránea con más rapidez de la que se repone, y por tanto, los niveles hidrostáticos disminuyen constantemente. Algunos ríos, tales como el Rio Colorado en el oeste de los Estados Unidos y el Rio Amarillo en China, con frecuencia se secan antes de llegar al mar (British Broadcasting Corporation).

Asimismo, los recursos hídricos no están disponibles de forma homogénea y, aunque existe cierta incertidumbre en las valoraciones estadísticas derivadas del uso del agua y de los recursos renovables, se ha podido estimar que el 85% de la población mundial reside en las zonas más secas de la tierra. Esto se traduce en más de 2.5 billones de personas con acceso restringido a los recursos hídricos renovables en el año 2015 (WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme (JMP) for Water Supply and Sanitation). Actualmente, un tercio de esta población vive en países que sufren estrés hídrico de moderado a alto (donde el consumo supera el 10 % de los recursos renovables de agua dulce). En el informe del Desarrollo Humano presentado en 2006 por el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (UNDP) se estima la disponibilidad de agua per cápita a nivel mundial. En la Figura 1.1 se observa el fuerte descenso en la disponibilidad de agua que han sufrido países en vías de desarrollo y se prevé que esta tendencia continúe al menos hasta el año 2025, aunque con un descenso menos pronunciado (Water at a Glance, FAO, 2011).



**Figura 1.1.** Disponibilidad del agua per cápita en el mundo desde 1950 hasta 2025 (Human Development Report, UNDP, 2006).

Sin embargo, para una gran parte de la población mundial, no solo la falta de acceso es un problema, sino que una de las mayores amenazas para su salud radica en el consumo continuado de agua no potable. Al ritmo actual, el acceso universal al agua potable no podrá asegurarse hasta el año 2025 en Asia, 2040 en América Latina y el Caribe y 2050 en África. Mientras que el porcentaje de población que puede disponer de agua potable aumentó del 79% en 1990 al 82% en el año 2000 según la Organización Mundial de la Salud (OMS), a finales de 2011, 2500 millones de personas carecían de acceso a una instalación de saneamiento mejorada. De éstas, 761 millones utilizaban instalaciones de saneamiento públicas o compartidas y otros 693 millones instalaciones que no cumplen las normas mínimas de higiene (instalaciones de saneamiento no mejoradas). Los 1000 millones restantes (el 15% de la población mundial) aún defecan al aire libre. La mayoría (el 71%) de las personas que carecen de acceso a instalaciones de saneamiento viven en zonas rurales, donde tiene lugar el 90% de la defecación al aire libre (WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme (JMP) for Water Supply and Sanitation).

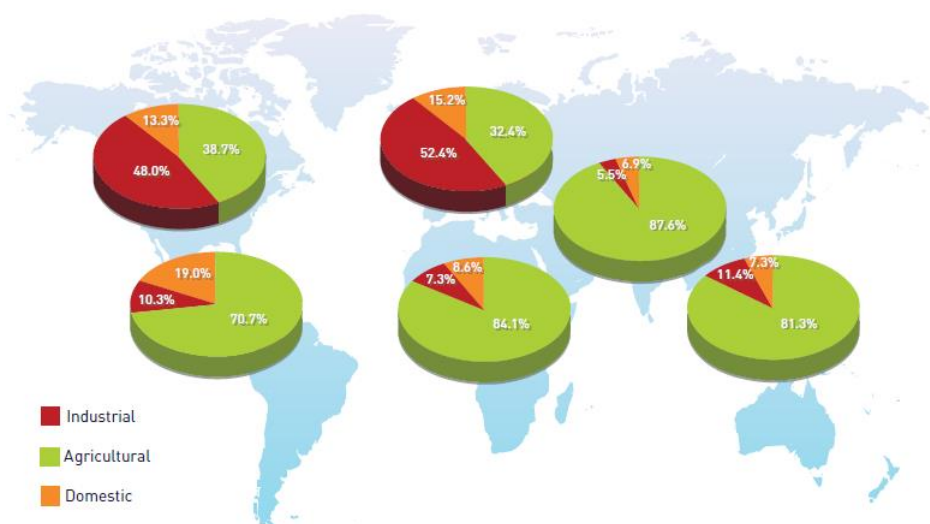
Otros datos preocupantes recogidos por la OMS relacionados con el acceso al agua potable y al saneamiento son (UN-water global analysis and assessment of sanitation and drinking-water, WHO, 2014):

- La falta de agua potable genera cientos de millones de casos de enfermedades y más de 5 millones de muertes cada año.
- La diarrea y el cólera son las principales causas de muerte en niños menores de 5 años.
- Con el suministro adecuado de agua potable y de saneamiento, la incidencia de algunas enfermedades y consiguiente muerte podría reducirse hasta en un 75%.
- 31 países carecen totalmente de acceso a fuentes de agua limpia.
- De cada cuatro personas una no dispone de agua potable.
- Cada ocho segundos muere un niño por beber agua contaminada.

El agua es importante para la seguridad alimentaria entendida como el acceso regular de las personas a alimentos de alta calidad para llevar una vida activa y saludable. Esto es especialmente así en países desarrollados donde las personas que tienen un mejor acceso al agua tienden a tener menores niveles de desnutrición. Si el agua es un ingrediente clave para la seguridad alimentaria, su falta puede ser causa de hambruna o desnutrición, fundamentalmente en áreas donde las personas dependen de la agricultura local para alimentos e ingresos. También, precipitaciones irregulares y diferencias estacionales en la disponibilidad del agua pueden causar temporalmente escasez de alimentos, inundaciones y sequías.

## **1.2. Consumo de agua en agricultura**

Las principales actividades humanas que conllevan altos consumos de agua se dividen en tres sectores principales: industrial, doméstico y agrícola. La Figura 1.2 muestra los porcentajes estimados del consumo de agua en función de estos tres usos para cada uno de los continentes, donde puede observarse que, de manera generalizada, la agricultura es el sector que consume el mayor porcentaje de agua, seguido del uso industrial y finalmente, el uso doméstico (Water at a Glance, FAO, 2011). El aumento del consumo industrial de agua está motivado por el crecimiento de la población y por el incremento de países de rápida industrialización como China. En este país, el consumo industrial del agua se ha duplicado desde 1980 y las perspectivas actuales indican que la demanda aumentará un 20% más hasta el año 2030 (Human Development Report, UNDP, 2006).



**Figura 1.2.** Desglose del uso del agua dulce en los diferentes continentes (Water at a Glance, FAO, 2011).

En octubre de 2011 se alcanzó un total de 7 mil millones de personas habitando el planeta, de acuerdo con los datos del Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA), y este dato sigue aumentando por lo que se pronostica que la población humana llegará a alcanzar los 9 mil millones de habitantes en 2050 (Estado de la Población Mundial, UNFPA, 2011). Si el consumo de agua estimado de un ser humano se promedia en  $50 \text{ L d}^{-1}$  para realizar actividades cotidianas tales como beber, cocinar, lavar y sanearse, el uso doméstico incrementará sustancialmente el porcentaje de agua requerida para este fin. El consumo urbano también aumenta con la renta per cápita, debido al incremento de usos recreativos como campos de golf, parques, jardines, etc. y las actividades derivadas del turismo.

La agricultura es la actividad humana responsable del consumo promedio del 70 % del agua dulce, llegando a ser del 95% en áreas en vías desarrollo donde la gestión de los recursos es menos eficiente, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2006), siendo este sector el que produce el 60% de la alimentación mundial. Se prevé que para el año 2050 la producción mundial de alimentos aumentará un 70 % y casi el 100 % en los países en desarrollo. Este aumento de la demanda de alimentos, aunado a la competencia de la demanda por otros usos, ejercerá una presión sin precedentes en muchos sistemas de producción agrícola en todo el mundo. El agua de riego procede generalmente de acuíferos subterráneos y aguas embalsadas o estancadas. En muchos países, el agua subterránea se ha convertido en el sostén principal de las actividades agroalimentarias. El 33% de la

población mundial, sobre todo la rural, depende del agua subterránea para la irrigación y la extracción abusiva del agua está provocando que los niveles freáticos de agua dulce estén descendiendo a un ritmo muy alarmante. Los problemas principales que caracterizan la utilización del agua subterránea son el agotamiento debido a un exceso de extracción de este recurso, las inundaciones y la salinización causada por un drenaje insuficiente. El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) informó que la tasa de pérdida de tierras regadas por anegamiento y salinidad es de 1,5 millones de hectáreas al año (Tolba, 1992). La superficie afectada por la salinidad, como porcentaje del área total de regadío, se estima en un 10 % en México, un 11 % en la India, un 21 % en Pakistán, un 23 % en China y un 28 % en los Estados Unidos (Umali, 1993).

El excesivo consumo de agua por parte de la agricultura es debido a los requerimientos para la producción de alimentos y a la deficiencia de la mayoría de los sistemas de riego. La huella hídrica es un indicador del consumo de agua que tiene en cuenta el uso directo e indirecto por parte de un consumidor o productor. De esta forma, se estiman que son necesarios 1000-3000 m<sup>3</sup> de agua por tonelada de cereal cosechado. Así, para dar cobertura a las necesidades alimentarias diarias de una persona se necesitan 2000-5000 L de agua (Water at a Glance, FAO, 2011. [www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf](http://www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf)). La deficiencia en la mayoría de los sistemas de riego supone pérdidas del 60 % del agua por evaporación o reflujos a ríos y mantos acuíferos. El riego por embalsado es una práctica muy extendida que día a día va siendo sustituida por otras técnicas más eficientes como el riego localizado. Un riego ineficiente desperdicia agua y provoca riesgos ambientales y de salud, tales como la pérdida de tierra agrícola productiva debido a la saturación o transmisión de enfermedades por riego de aguas estancadas.

### **1.3. Reutilización de efluentes depurados. Empleo para riego en agricultura**

En las últimas décadas ha crecido el interés por el aprovechamiento de las aguas residuales depuradas, tanto urbanas como industriales, que han recibido tratamientos avanzados de depuración. La convicción de que estas aguas deben ser aprovechadas y no desperdiciadas, junto con la escasez creciente de aguas y los problemas de protección medioambiental, crean un entorno realista para considerar viable la reutilización de las aguas residuales depuradas en muchas áreas del mundo que se enfrentan a la escasez del agua.

Son muchos los beneficios que se pueden destacar de la reutilización de agua residual convenientemente tratada, además del aporte adicional a los recursos hídricos habituales, ya

sea en forma de recursos netos, o bien de recursos alternativos que permiten usar agua de mejor calidad para otros usos más exigentes. Dicha reutilización provoca una disminución de la presión ejercida sobre los acuíferos preservando el agua procedente de los mismos y contribuyendo a su recuperación. También pueden disminuirse los costes de tratamiento y de vertido del agua residual depurada. Esto ocurre siempre que las exigencias de calidad de la alternativa de reutilización considerada sean menos restrictivas que las definidas por los objetivos de calidad del medio receptor en el que normalmente se venía realizando el vertido del agua depurada. Otra de las ventajas del uso del agua tratada es una reducción del aporte de contaminantes a los cursos naturales de agua. Además, aporta una mayor fiabilidad y regularidad del caudal de agua disponible. El flujo de agua depurada es generalmente mucho más fiable que el de la mayoría de los cauces naturales de agua. No hay que obviar, en todo caso, que en el proceso de reutilización de aguas depuradas, puede existir riesgo de naturaleza sanitaria si no se realiza con las medidas de protección necesarias. En este sentido, el tratamiento de las aguas residuales depuradas para fines de reutilización debe tener como enfoque principal la reducción o eliminación de los microorganismos patógenos (Reutilización de las aguas residuales para riego. Centro Tecnológico de la energía y del Medio Ambiente, 2005).

Si bien las posibilidades de reutilización de las aguas residuales tratadas son numerosas, sin duda la reutilización con fines agrícolas es la práctica más extendida. La aplicación al suelo de aguas residuales depuradas como agua de riego conlleva la revalorización de un residuo, puesto que se aumenta la disponibilidad de recursos hídricos en un sector en el que la demanda de agua es ingente. Además, se aprovechan los constituyentes del agua depurada, tales como la materia orgánica y otros nutrientes necesarios en la agricultura. Por otro lado, el efecto depurador que tiene el sistema suelo/planta puede actuar como un tratamiento avanzado o terciario.

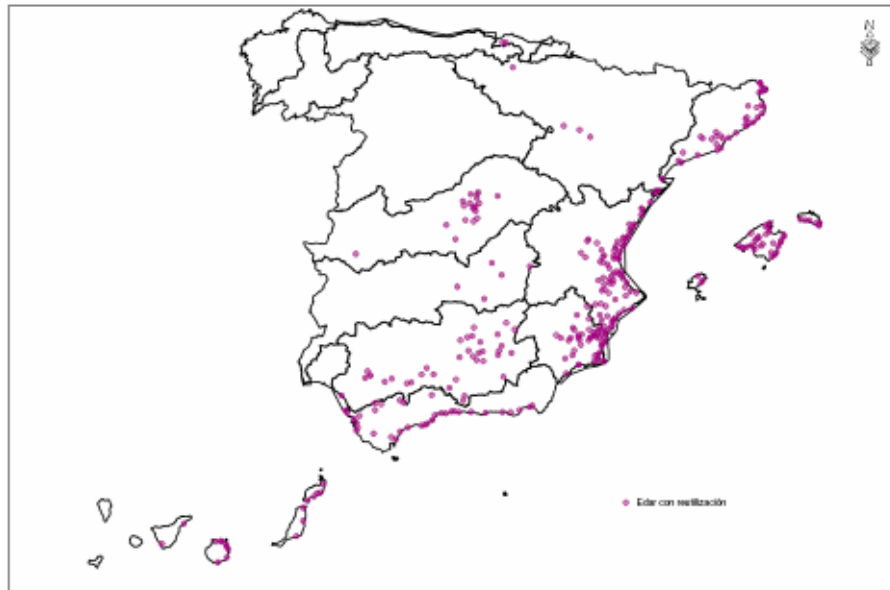
Por otra parte, las aguas residuales generadas por ciertas actividades industriales presentan unas características que desde el punto de vista agrícola pueden ser muy interesantes. En concreto, las aguas residuales o una parte importante de las aguas generadas por la industria agroalimentaria (conservas vegetales y manipulación de productos hortofrutícolas) pueden constituir un aporte de agua muy aprovechable para su uso agrícola. En este tipo de actividades generalmente no se utilizan ni se incorporan productos o reactivos que puedan dejar residuos de naturaleza tóxica en las aguas residuales (salvo el hidróxido sódico utilizado para el pelado químico que es perjudicial para el sistema suelo/planta). Asimismo, desde el punto de vista agrícola, estas aguas residuales presentan un contenido muy valioso en

materia orgánica y nutrientes (nitrógeno y fósforo). Por tanto, las aguas residuales de estas actividades, en principio, con ciertas precauciones y posiblemente con pequeñas modificaciones de proceso, son perfectamente recuperables para su uso como agua de riego agrícola siempre que se les proporcione el tratamiento de depuración adecuado.

### *1.3.1. La reutilización de aguas depuradas en España para su uso en agricultura*

La climatología en España, donde existen zonas de baja pluviometría y largos periodos de sequía, obliga a racionalizar y optimizar la gestión del agua. Esta condición, junto con el aumento de la demanda, provoca la necesidad de buscar nuevos recursos complementarios o alternativos como el uso de aguas residuales depuradas y regeneradas. En zonas costeras, la reutilización permite un incremento neto del recurso en los casos en los que el agua depurada se vierte al mar o se pierde a través de la evaporación. En zonas de interior permite sustituir al agua potable en los usos que requieren una calidad menor reservando la de mayor calidad para la red de abastecimiento de agua potable. Una de las mayores ventajas de la reutilización directa del agua es la garantía del caudal y calidad del agua disponible, no dependiendo de la estacionalidad del recurso ni de las épocas de sequía.

Según el Centro de Estudios Hidrográficos perteneciente al Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX, Ministerio de Fomento y Medio Ambiente), en España existen 322 sistemas de reutilización instalados en estaciones depuradoras de aguas residuales, cuya mayoría se encuentran emplazados en la vertiente mediterránea (Figura 1.3). El volumen total de agua reutilizada es de 368 Hm<sup>3</sup>/año, estando distribuido como se muestra en la Tabla 1.1. Las comunidades autónomas que reutilizan más agua depurada procedente de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), un 64% del total, se encuentran en la Comunidad Valenciana (148 Hm<sup>3</sup>/año) y Murcia (84 Hm<sup>3</sup>/año). Teniendo en cuenta los sistemas actuales, en construcción y en proyecto, se puede estimar que en 4 años la capacidad de regeneración será de unos 1.100 Hm<sup>3</sup>/año. El uso del agua depurada en España, se divide en urbano, recreativo, industrial, ambiental y en riego agrícola, representando este último un 70% del total (Tabla 1.2).



**Figura 1.3.** EDAR con sistemas de reutilización en España (●), (CEDEX, 2008).

**Tabla 1.1.** Volumen de aguas depuradas procedentes de EDAR que se reutilizan en España en función de la Comunidad Autónoma (CEDEX, 2008).

Comunidad Autónoma	Caudal de agua reutilizado (Hm <sup>3</sup> /año)
Andalucía	24.21
Aragón	0.17
Baleares	28.24
Canarias	17.80
Castilla - La mancha	2.96
Cataluña	44.16
Valencia	148.66
Extremadura	0
Madrid	5.48
Murcia	84.52
País Vasco	12
<b>Total</b>	<b>368.2</b>



**Tabla 1.2.** Usos del agua regenerada en España (CEDEX, 2008).

<b>USOS</b>	<b>Volumen (Hm<sup>3</sup>/año)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Riego agrícola	261.36	71.0
Usos urbanos	14.68	4.0
Usos recreativos	25.98	7.0
Usos ambientales	65.14	17.7
Usos industriales	1.01	0.3
<b>Total</b>	<b>368.20</b>	<b>100</b>

Para minimizar el riesgo de infección por la reutilización de efluentes depurados es necesario un tratamiento de regeneración adecuado. Sin embargo, según fuentes del CEDEX, el 39% del agua depurada es reutilizada sin tratamiento adicional, lo que podría derivar en un daño importante al consumidor. En la Tabla 1.3 se presentan los tratamientos o líneas de tratamiento a los que son sometidos los efluentes depurados para su regeneración.

Para el empleo de las aguas regeneradas para el riego de cultivos es necesario la promoción y ejecución de las infraestructuras de riego y adecuación de la planta de tratamiento terciario de la EDAR. En España, los órganos competentes para otorgar la concesión de las aguas regeneradas procedentes de una EDAR a una o varias comunidades de regantes para su explotación, son las consejerías. En la Tabla 1.4 se muestran ejemplos de EDAR que suministran agua regenerada para riego a diferentes comunidades de regantes. Los gastos de ejecución son asumidos por el Plan Nacional de Regadíos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y mediante las consejerías de las comunidades autónomas a través de subvenciones a las comunidades de regantes. Estas subvenciones derivan en la mejora y consolidación de los regadíos, la mejora de la gestión y la planificación del uso del agua, la utilización de agua desalinizada y la reutilización de aguas residuales depuradas o de cualquier otra procedencia. Otra parte del coste la asumen directamente las comunidades de regantes, que se financian con los ingresos de las tarifas del uso del agua de riego.

**Tabla 1.3.** Tratamientos terciarios realizados en las depuradoras españolas (CEDEX, 2008).

Línea de tratamiento	Nº de estaciones regeneradoras	Porcentaje (%)
<b>Sin desalación</b>	<b>133</b>	<b>89.3</b>
Desinfección	18	12.0
Filtración + Desinfección	58	39.0
Físico-químico (con decantación) + Filtración + Desinfección	28	18.9
Físico-químico (con decantación) + Filtración + Filtración con membranas	9	6.0
Filtración con membranas (MBR)	2	1.4
Sistemas naturales	18	12.0
<b>Con desalación</b>	<b>16</b>	<b>10.7</b>
Filtración + Electrodiálisis reversible + Desinfección	4	2.6
Físico-químico (con decantación) + Filtración + Electrodiálisis reversible + Desinfección	2	1.4
Filtración con membranas + Osmosis inversa	3	2.0
Filtración + Filtración con membranas + Osmosis inversa	4	2.6
Físico-químico (con decantación) + Filtración + Osmosis inversa	2	1.4
Físico-químico (con decantación) + Filtración + Filtración con membranas + Osmosis inversa	1	0.7
<b>TOTAL</b>	<b>149</b>	<b>100</b>

**Tabla 1.4.** Ejemplos de EDAR que proporcionan agua de riego a partir de agua depurada a comunidades de regantes. Fuente: Elaboración propia.

EDAR	Comunidad de regantes beneficiada	Volumen de agua depurada al año (Hm <sup>3</sup> )	Hectáreas de cultivos regadas con agua regeneradas
El Bobar (Almería)	Comunidad de Regantes Las Cuatros Vegas de Almería y la Comunidad General de Regantes del Bajo Andarax	14.2	2189
EDAR de Jumilla (Murcia)	Comunidad de Regantes Miraflores (1329 Hectáreas) – Hermanos González Simón	1.9	> 1350
EDAR de Ibi y Castalla	Comunidad de regantes Virgen de la Paz de Agost	2.0	-
EDAR de Abarán (Murcia)	Comunidad de Regantes de Casablanca, Abarán	-	838
EDAR de Torreveja (Alicante)	Comunidad de Regantes Torremiguel	6.5	-
EDAR Palma 1 y EDAR Palma 2 (Palma de Mallorca)	Comunidad de Regantes del Pla de Sant Jordi	14.3	1500
EDAR Los Alcázares	Comunidad de Regantes del Campo de Cartagena	2.6	11000
EDAR de l'Alacantí Nord (Alicante)	-	2	-
EDAR de Requena (Valencia)	Comunidades de Regantes de Fuente del Pino y Gollizno	-	40
EDAR de Pinedo (Valencia)	Comunidad de Regantes del Canal de Río Turia	30	-

#### 1.4. Indicadores microbiológicos de calidad del agua

Los patógenos que contaminan el agua transmiten enfermedades a unos 250 millones de personas cada año, lo que resulta en entre 10 y 20 millones de muertes en todo el mundo (Zamxaka *et al.*, 2004; Wilkes, 2009). Comprobar todos los posibles patógenos existentes en cada matriz acuosa no es viable desde el punto de vista económico y temporal. Por tanto, se utilizan indicadores representativos asociados con la contaminación humana y animal como un medio simplificado para detectarla (Barrell *et al.*, 2000). La evaluación de la calidad

microbiológica del agua aspira a proteger a los consumidores de las enfermedades debidas al consumo de aguas que contienen patógenos tales como bacterias, virus, algas y protozoos. En la Tabla 1.5 se muestra un resumen de indicadores microbianos y patogénicos asociados con enfermedades transmitidas por el agua y fuentes de contaminación comunes.

**Tabla 1.5.** Indicadores microbianos e indicadores patogénicos asociados con enfermedades transmitidas por el agua y fuentes comunes de contaminación (Naidoo y Olaniran, 2014).

	<b>MICROORGANISMO</b>	<b>ENFERMEDAD</b>	<b>FUENTE DE INFECCIÓN</b>
Bacteria	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	Fiebre tifoidea	Heces humanas
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi	Fiebre paratifoidea	Heces Humanas
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis y <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	Salmonelosis/ Gastroenteritis	Heces animales/humanas
	<i>Shigella</i> sp. ( <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Shigella sonnei</i> )	Disentería	Heces humanas
	<i>Vibrio cholera</i>	Cólera	Heces humanas
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis	Heces animales/humanas
	<i>E. coli</i> ( <i>E. coli</i> O:148; O:157; O:124)	Gastroenteritis	Heces humanas
Virus	<i>Campylobacter</i> sp.	Gastroenteritis	Heces animales/humanas
	<i>Clostridium perfringens</i>	Gastroenteritis	Heces animales/humanas
	Faecal streptococci		Heces animales/humanas
	Enterococci		Heces animales/humanas
			Heces animales/humanas
Protozoos	Poliovirus	Poliomielitis	Heces humanas
	Rotavirus	Diarreas, vómitos	Heces humanas
	Adenovirus	Gastroenteritis	Heces humanas
	Norwalk virus	Diarreas, vómitos	Heces humanas
	Hepatitis A	Hepatitis	Heces humanas
Protozoos	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Diarreas	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería amebiana	Heces humanas
	<i>Giardia lamblia</i> cysts	Diarreas	

Los indicadores de la calidad microbiológica del agua suelen ser generalmente una especie específica o grupos de microorganismos que se introducen en el sistema acuoso junto a las heces y deben tener algunas propiedades particulares:

- Estar universalmente presente en las heces de los humanos y animales de sangre caliente; poder ser detectados mediante métodos simples
- No crecer en aguas naturales, medio ambiente en general o en sistemas de distribución de agua

- Ser persistentes en agua
- El grado en el cual es eliminado por el tratamiento del agua debe ser comparable al de aquellos patógenos transmitidos por el agua

La determinación de organismos indicadores está presente en la mayoría de las directrices de calidad del agua (Colford *et al.*, 2006). Actualmente, los indicadores bacterianos coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, estreptococos fecales y enterococos se utilizan en la gestión de la calidad del agua y evaluación de los riesgos para la salud porque son mucho más fáciles de medir y menos costosos de detectar y enumerar que los propios patógenos (Meays *et al.*, 2004). Los indicadores bacterianos más empleados para el control de la calidad microbiológica del agua en países desarrollados son coliformes totales, coliformes fecales y/o *E. coli*. También se han utilizado otros organismos, como enterococos y estreptococos fecales como alternativa de indicadores de calidad del agua ya que están presentes en el medio ambiente en un alto porcentaje.

#### *Coliformes totales y coliformes fecales como indicadores de la contaminación fecal del agua*

Los coliformes son un grupo de bacterias anaerobias facultativas, Gram-negativas y con forma de vástago. La detección de coliformes totales y fecales en aguas brutas puede ser indicativa de los cambios de calidad del agua. Los métodos clásicos para la detección de coliformes totales y fecales en aguas naturales incluyen el número más probable y/o la técnica de filtración por membrana en agar selectivo (APHA, 1998). Aunque los test son simples de llevar a cabo, consumen tiempo por su elevada manipulación y se requieren 48 h para obtener los resultados.

Los coliformes están reconocidos como indicadores de calidad en los procesos de tratamiento y desinfección. El uso de coliformes como indicadores bacterianos de la calidad microbiológica del agua se basa en que estos se encuentran altamente presentes en heces humanas u otros animales de sangre caliente. Si las heces o sus lixiviados han pasado al agua de consumo es posible que las bacterias también se hayan transferido, incluso después de una dilución significativa. Salvo algunas excepciones, el grupo de bacterias que conforman los coliformes totales no están consideradas como un riesgo para la salud, pero su presencia puede indicar que hay contaminación fecal y que como resultado haya patógenos presentes en el medio acuático. Sin embargo, los coliformes totales presentan alguna desventaja para ser usados como indicador, puesto que tienen la capacidad de crecer en el ambiente acuoso y en sistemas de distribución de agua potable (LeChevallier, 1990; Camper *et al.*, 1991; Szewzyk *et al.*, 1994). Además, muchos autores han constatado brotes de enfermedades transmitidas en aguas

que satisfacen los reglamentos de coliformes totales (Payment *et al.*, 1997; Gofti *et al.*, 1999; Ootsubo *et al.*, 2003).

#### *E. coli* como indicador de calidad del agua

*E. coli* es una de las especies mayoritarias detectadas en las heces humanas y animales. La mayoría de las cepas de *E. coli* son bacterias comensales del tracto gastrointestinal de los animales con sangre caliente. Actualmente hay unos 160 grupos reconocidos, la mayoría de los cuales no causan ninguna enfermedad (Wilson *et al.*, 2011). El hecho de que la enzima  $\beta$ -glucuronidasa sea específica para el 94-97% de *E. coli* (Huang *et al.*, 1997) permitió desarrollar un método simple, rápido, sensible y fiable para su detección.

Sin embargo, algunas desventajas de este indicador son que la contaminación por *E. coli* no siempre tiene lugar debido a la contaminación fecal directa. También pueden causar su propagación el almacenamiento inadecuado o una distribución inapropiada de aguas conteniendo esta bacteria. Además, es igualmente reconocido que *E. coli* es un indicador de contaminación fecal pero no es adecuada como indicador de otros patógenos entéricos tales como protozoos y virus.

#### *Streptococos fecales y enterococos como indicadores complementarios de la contaminación fecal del agua*

Los estreptococos fecales son estreptococos comúnmente presentes en las heces de humanos y animales. El género *Enterococcus* ha sido recientemente definido para incluir todos aquellos estreptococos que comparten ciertas propiedades bioquímicas y que tienen cierta tolerancia a condiciones de crecimiento adversas. Existen métodos simples y rápidos para la detección y enumeración de estreptococos/enterococos fecales como la técnica del número más probable y la filtración por membrana, basadas en su viabilidad de crecer en presencia de azida sódica y su fermentación de carbohidratos para producir ácido láctico.

Con el propósito de evaluar la calidad de las aguas, los estreptococos fecales y enterococos pueden considerarse como indicadores de contaminación fecal, puesto que presentan numerosas ventajas como indicadores respecto a coliformes totales y *E. coli* (Geldreich *et al.*, 1996). Estas ventajas son: i) se encuentran de manera relativamente numerosa en excrementos humanos y de otros animales de sangre caliente (Feachem *et al.*, 1983), ii) están presentes en aguas residuales y aguas contaminadas, iii) ausencia en la vida humana y animal, iv) son persistentes sin multiplicarse en el medioambiente (McFeters *et al.*, 1974).

Entre los enterococos intestinales predomina *Enterococcus faecalis*. De acuerdo con las directrices de calidad del agua de la OMS, *E. faecalis* puede ser considerada como indicador de la contaminación fecal en agua. Incluso, algunos autores han investigado recientemente la inactivación de *E. faecalis* extrapolando sus resultados para este modelo de microorganismos al consorcio de bacterias de una EDAR (Jiménez-Hernández *et al.*, 2006; Van Grieken *et al.*, 2010; Backhaus *et al.*, 2010).

Las diversidades estructurales en la pared celular de las bacterias generan diferencias a la hora de su inactivación. Las bacterias Gram-negativas tienen una membrana citoplasmática, una fina capa de polisacáridos y una membrana exterior que contiene lipo-polisacáridos. Por otro lado, las bacterias Gram-positivas tienen únicamente una membrana lipídica citoplasmática. La capa de peptidoglicano es más gruesa que la de la bacteria Gram-negativa y por tanto, es mucho más difícil dañarla (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2013).

#### *Bacteriófagos como indicadores de la contaminación viral del agua*

Los virus entéricos humanos son los patógenos más pequeños, por lo que se hace muy difícil su eliminación mediante procesos físicos como la filtración. Algunos virus presentan mayor resistencia a la desinfección que las bacterias en general y algunos protozoos. El uso de virus humanos en el laboratorio es realmente complicado, caro y arriesgado, por lo que se hace necesario identificar sustitutos (modelos virales) que representen la respuesta de la mayoría de los virus de interés en este campo.

Los colifagos son virus bacteriófagos que infectan exclusivamente a bacterias coliformes. Los fagos son valiosos prototipos de virus entéricos porque comparten propiedades fundamentales y características de composición, morfología, estructura, tamaño y sitio de replicación. Entre los colifagos usados en la evaluación de la calidad del agua son mayoritarios los colifagos somáticos y fagos F-ARN. Su detección puede llevarse a cabo por el método de placa de doble capa y capa simple de agar. Además, su resistencia a factores medioambientales y frecuencia en ambientes acuáticos hacen que los colifagos puedan ser más aplicables que las bacterias fecales para indicar contaminación fecal en aguas (Grabow, 2001; Contreras-Coll *et al.*, 2002; Jurzik *et al.*, 2010). Algunos estudios proponen los colifagos somáticos (SOMCPH), o los ARN-bacteriófagos (F-específicos) (F-ARN) y otros bacteriófagos que infectan bacterias como indicadores de contaminación viral (AWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, 1991). Otras investigaciones con virus humanos presentan resultados muy variables respecto a la resistencia a la desinfección de diversos virus: el rotavirus humano y F-ARN fagos como el f2 y

el MS2 muestran valores similares de resistencia, mientras que el virus de la encefalomiocarditis tiene un comportamiento similar al colifago somático (Wegelin *et al.*, 1994). Por ello, existe la tendencia a trabajar con SOMCPH naturales y también con el fago MS2.

Sin embargo, las recomendaciones más actuales de la OMS sobre el uso de indicadores virales en aguas de consumo humano, proponen de forma clara el uso del colifago MS2 o el de phi-X 174 (Evaluating Household Water Treatment Options: Health based targets and microbiological performance specifications, OMS, 2011). Los criterios de esta elección se basan en las distintas resistencias que ofrecen los diferentes virus a posibles procesos de tratamiento, ya que los virus entéricos también varían enormemente según su tamaño, punto isoeléctrico, tipos de ácidos nucleicos, presencia de lípidos y estructura de las proteínas y cápsida. Además, los estudios sobre eliminación de virus llevados a cabo con diferentes métodos de desinfección, como por ejemplo filtración con carbón activo (CA), sistemas de lámparas UV-C, etc, muestran que algunos virus son más fáciles de eliminar por adsorción (CA) que otros, mientras que algunos virus son más susceptibles al tratamiento UV-C. Por ello, no existe un único modelo viral propuesto hasta la fecha, aunque la OMS propone el uso de dos bacteriófagos, cuyas características y respuestas a diversos procesos de tratamiento son variadas para la evaluación de la eficacia de procesos de purificación de agua de bebida (Guidelines for Drinking-water Quality, OMS, 2011). Estos dos modelos, MS2 y phiX-174, se utilizan ampliamente en estudios de eliminación de virus entéricos humanos. Además de su elevada resistencia a diversos agentes desinfectantes, se pueden manipular en el laboratorio sin riesgos para la salud y son relativamente fáciles de detectar y enumerar sin necesidad de utilizar reactivos muy caros.

El colifago MS2, elegido para este estudio, tiene 24 nm de diámetro, es un virus ARN de cadena simple, con bajo punto isoeléctrico (3.9), por lo que posee menor tendencia a adherirse o adsorberse que otros virus con punto isoeléctrico mayor. Es uno de los virus más hidrofóbicos, y no contiene lípidos. MS2 es muy resistente a la radiación UV-C de baja presión y se ha utilizado como modelo en fotorreactores UV.

### **1.5. La reutilización de aguas en el marco legislativo**

Para hacer frente a la escasez de agua y asegurar la calidad de ésta, numerosos organismos internacionales proponen la reutilización del agua como un recurso adicional que debe incluirse en los planes de gestión del agua. En la Cumbre de las Naciones Unidas, celebrada en septiembre de 2000, se aprobó la Declaración del Milenio en la que se incluían ocho ambiciosos objetivos entre los cuales se encontraba “Garantizar la sostenibilidad del medio ambiente”



estableciendo como meta “reducir a la mitad la proporción de población sin un acceso sostenible al agua potable segura”. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su documento “*WHO Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*” relaciona los Objetivos de Desarrollo del Milenio con la reutilización del agua. Considera la reutilización del agua como un recurso estratégico y de especial valor en zonas donde existe estrés hídrico, siempre y cuando se asegure la salud pública y la protección del medio ambiente

En la Cumbre Mundial sobre Desarrollo Sostenible de Johannesburgo, celebrada en 2002, el agua y el saneamiento fueron dos de los grandes temas a tratar. Se incluyó la gestión integral del agua en el marco de la política internacional y se puso de manifiesto el importante papel que la reutilización del agua juega especialmente en regiones susceptibles de experimentar períodos de sequía. Debido a que las aguas de la Comunidad Europea están sometidas a la progresiva presión que supone el continuo crecimiento de su demanda y calidad para todos los usos, surgió la necesidad de tomar medidas para proteger las aguas tanto en términos cualitativos como cuantitativos y garantizar así su sostenibilidad. A nivel comunitario, El Parlamento y el Consejo Europeo incluyeron en la Directiva Marco de Aguas (DMA) la reutilización del agua entre las acciones complementarias del programa de medidas a aplicar en cada demarcación hidrográfica. Esta Directiva Marco Europea del Agua (DMA, 2000/60/CE) nace como respuesta a la necesidad de unificar las actuaciones en materia de gestión de agua en la Unión Europea. Además, la DMA permitió establecer unos objetivos medioambientales homogéneos entre los Estados Miembros.

La trasposición de la Directiva 2000/60/CE en España se realizó mediante la Ley 62/2003, de 30 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y del orden social que incluye, en su artículo 129, la modificación del texto refundido de la Ley de Aguas (Real Decreto Legislativo 1/2001) por la que se incorpora al derecho español la Directiva 2000/60/CE, estableciendo un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

En la Directiva Europea 2000/60/EC, se incorporó la reutilización del agua con el fin de cumplir los objetivos del artículo 4 de la DMA. En el Anexo VI parte B de esta directiva se enumeran las medidas complementarias que cada demarcación hidrográfica puede incluir. Previa a esta normativa, en el Anexo I de la Directiva 91/271/CEE del 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas, se fijaron las condiciones de calidad de las aguas urbanas.

### 1.5.1. Ley Española de reutilización de aguas

A nivel nacional la reutilización del agua tratada se regula a través del Real Decreto de Reutilización 1620/2007 aprobado el 7 de diciembre de 2007 modificándose parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico (RDPH) aprobado por Real Decreto 849/1986, de 11 de abril mediante la derogación de los artículos 272 y 273 del RDPH que regulaban la reutilización de las aguas. Este Real Decreto tiene por objetivo establecer el régimen jurídico para la reutilización de aguas depuradas y establece las condiciones de calidad que debe cumplir el agua regenerada para su uso indicando los usos permitidos y prohibidos.

La calidad requerida depende del uso previsto del agua. En el Anexo I.A del RD 1620/2007 de reutilización se contemplan un total de 13 tipos, agrupadas en cinco usos: urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales. Esta norma también describe en su Capítulo II la prohibición de usar aguas reutilizadas para el consumo humano, salvo en situaciones catastróficas; usos propios de la industria alimentaria excepto para aguas de proceso y limpieza; uso en instalaciones hospitalarias; para el cultivo de moluscos filtradores en acuicultura; uso recreativo como aguas de baño; uso en torres de refrigeración y condensadores evaporativos, excepto lo previsto en este uso industrial en la norma; uso en fuentes y láminas ornamentales en espacios públicos o interiores de edificios públicos; y cualquier otro uso que las autoridades consideren que conlleva riesgos para la salud o perjuicio para el medio ambiente.

El Real Decreto de reutilización cumple con lo establecido en la Ley de Aguas donde insta al Gobierno al desarrollo de las condiciones básicas de la reutilización. El Anexo I.A incluye los criterios de calidad exigidos en función de cada uno de los usos posibles. Los parámetros que propone controlar son: Nematodos intestinales, *Escherichia coli*, sólidos en suspensión y turbidez. Los dos primeros como indicadores microbiológicos y los otros dos como físico-químicos. Asimismo, y dependiendo del tipo de aplicación o destino del agua regenerada, este Real Decreto exige controlar otro tipo de parámetros, como por ejemplo, *Legionella spp.* en caso de que se produzca aerosolización, o nitrógeno y el fósforo total en el caso de recarga de acuíferos o llenado de estanques con riesgo de eutrofización. Según la autorización de vertido será necesario controlar el resto de parámetros que en ella se limiten. Cuando se trate de sustancias peligrosas, se deberá asegurar el respeto de las Normas de Calidad Ambiental.

A nivel estatal El RD de reutilización está vinculado con otras disposiciones como pueden ser las relativas a depuración, planificación hidrológica, sanidad y las distintas normativas que

regulan los usos posibles del agua regenerada. En la Tabla 1.6 se muestra una recopilación de estas disposiciones y la descripción del nivel de correspondencia con el RD de reutilización.

**Tabla 1.6.** Legislación española relacionada con el RD de reutilización de aguas.

NORMATIVA	DESCRIPCIÓN
<b>Reglamento del Dominio Público Hidráulico RD 849/1986</b>	Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. Con el RD 1620/2007 se derogan los artículos 272 y 273 de dicho Reglamento, pero rige el procedimiento para solicitar las concesiones o autorizaciones, la cesión de derechos, el Registro de Aguas y el régimen sancionador.
<b>Real Decreto Ley 11/1995</b>	Real Decreto Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las Normas Aplicables al Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas. Esta norma es el resultado de la transposición de la Directiva 91/271/CEE.
<b>Real Decreto 509/1996</b>	Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, modificado por el Real Decreto 2116/1998 de 2 de octubre
<b>Ley de Aguas RD 1/2001</b>	Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. En el artículo 109 establece que el Gobierno debe desarrollar las condiciones básicas de la reutilización y precisar la calidad exigible a las aguas regeneradas según los usos previstos. Asimismo, establece que el titular de la concesión debe sufragar los costes necesarios para tratar el agua y obtener el nivel de calidad exigido. Por otra parte, establece la obligación de obtener una concesión administrativa para la reutilización de aguas regeneradas salvo que sea solicitada por el titular de una autorización de vertido de aguas ya depuradas, que necesitará únicamente una autorización administrativa.
<b>Real Decreto 907/2007</b>	Real Decreto 907/2007, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica. En esta norma la reutilización de aguas está incluida en los criterios para la estimación de las demandas de agua, el estudio de los sistemas de explotación, las medidas para fomentar el uso eficiente y sostenible del agua y las medidas complementarias que deban aplicarse para la consecución de objetivos medioambientales o para alcanzar una protección adicional de las aguas.

### 1.5.2. Comparación de los criterios de calidad del RD 1620/2007 con las recomendaciones de la OMS y la USEPA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2006 la tercera edición de sus “*Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater in Agriculture and Aquaculture*”. En este documento, estructurado en cuatro volúmenes, se establecen recomendaciones para la reutilización de aguas en la agricultura y acuicultura de forma que sean lo suficientemente flexibles para poder adaptarlas a las condiciones locales, sociales, económicas y ambientales. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (USEPA), por su parte, publicó en 2004 una edición revisada del documento “*Guidelines for Water Reuse*” publicado en 1992. Dicho documento se compone de unas directrices para la reutilización de aguas basado en múltiples experiencias realizadas en todo el mundo. Estas directrices incluyen la reutilización para usos urbanos, industriales, agrícolas, ambientales y recreativos. A continuación, se muestra una tabla en la que se comparan los criterios de calidad del RD 1620/2007 con los establecidos por las anteriores recomendaciones a fin de determinar el grado de similitud entre ellos (Tabla 1.7). Como puede observarse en la Tabla 1.7, las recomendaciones recogidas en el Real Decreto español de reutilización de aguas son más restrictivas que las recogidas en las otras directrices por lo que, cumpliendo con la legislación española se asegura el cumplimiento de las otras dos.

**Tabla 1.7.** Comparación de los criterios de calidad microbiológicos requeridos por el RD de reutilización español, las directrices de la OMS y las directrices de la USEPA para el empleo de las aguas reutilizadas según su uso.

Parámetro	ESPAÑA Real Decreto de reutilización RD 1620/2007	OMS Directrices 2006	USEPA Directrices 2004
Huevos de nematodos intestinales (huevos/10 L)	Usos agrícolas (2): < 1 Usos urbanos (1): < 1 Usos industriales (3.1.a y 3.1.b): no se fija límite. Usos industriales (3.1.c y 3.2): < 1 Usos recreativos (4.1): < 1 y (4.2): no se fija límite. Usos ambientales (5.1 y 5.3): no se fija límite. Usos ambientales (5.2): < 1	Riego con o sin restricciones: $\leq 10$ reducido a $\leq 1$ (es decir, no detectable) cuando hay niños menores de 15 años expuestos.  Riego localizado: no hay recomendaciones.  Otros usos: No hay recomendaciones	No hay recomendaciones

Tabla 1.7. Continuación.

Parámetro	ESPAÑA Real Decreto de reutilización RD 1620/2007	OMS Directrices 2006	USEPA Directrices 2004
<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 mL)	<p>Usos agrícolas (2.1): &lt;100</p> <p>Usos agrícolas (2.2): &lt;1000</p> <p>Usos agrícolas (2.3): &lt; 10000</p> <p>Usos urbanos (1.1): 0</p> <p>Usos urbanos (1.2): &lt; 200</p> <p>Usos industriales (3.1.a y 3.1.b): &lt;10<sup>4</sup></p> <p>Usos industriales (3.1.c): &lt;1000</p> <p>Usos industriales (3.2): 0</p> <p>Usos recreativos (4.1): &lt; 200</p> <p>Usos recreativos (4.2): &lt; 10<sup>4</sup></p> <p>Usos ambientales (5.1): &lt; 1000</p> <p>Usos ambientales (5.2): 0</p> <p>Usos ambientales (5.3): no se fija límite</p> <p>Usos ambientales (5.4): se estudiará en cada caso</p>	<p>Riego sin restricciones: ≤1000 (aumentada a ≤10<sup>4</sup> cuando la cosecha de raíz no haya crecido)</p> <p>Riego con restricciones ≤10<sup>5</sup> en conjunción con técnicas de control de exposición humana. Reducida a ≤10<sup>4</sup> cuando puedan exponerse niños menores de 15 años. Puede aumentarse a 10<sup>6</sup> cuando la agricultura local esté altamente mecanizada.</p> <p>Riego localizado: no hay recomendaciones</p>	<p>Usos agrícolas: cultivos comestibles que no se procesan industrialmente: no detectable.</p> <p>Usos agrícolas: cultivos comestibles que se procesan comercialmente; cultivos no comestibles: &lt; 200</p> <p>Riego en áreas de acceso restringido, construcción; uso industrial; uso ambiental: ≤200</p> <p>Usos urbanos; masas de agua recreativas; agua potable: no detectable.</p>
<i>Legionella</i> spp. (UFC/L)	<p>Usos urbanos (1.1 y 1.2): si hay riesgo de aerosolización: &lt;100</p> <p>Uso agrícolas (2.1): &lt;1000</p> <p>Uso industriales (3.1): &lt;100</p> <p>Usos recreativos (4.2): &lt;1000</p>	No hay recomendaciones	No hay recomendaciones
<i>T. saginata</i> / <i>T. solium</i> (huevos/L)	Usos agrícolas (2.2): <1	No hay recomendaciones	No hay recomendaciones
Enterovirus, <i>Giardia</i> sp. y <i>Cryptosporidium</i> sp.	No hay recomendaciones	No hay recomendaciones	No hay recomendaciones

## 1.6. Tratamientos terciarios para la desinfección de aguas

Los tratamientos terciarios dentro del tratamiento de las aguas residuales tanto urbanas como industriales, constituyen un amplio campo de sistemas y tecnologías diversas. La finalidad de este tipo de tratamientos es la de mejorar el grado de depuración del agua, conseguido con los tratamientos anteriores, haciéndola aprovechable para el fin que se desee, principalmente para una reutilización específica. La reutilización de agua residual depurada comporta un riesgo sanitario, tanto para el público como para los trabajadores del sistema, ya que la exposición a microorganismos patógenos y sustancias tóxicas es más elevada en estos casos que en aquellos en donde se utilicen aguas no contaminadas. Para ello, se han desarrollado sistemas de desinfección de este agua residual depurada de forma que se consiga la eliminación de estos microorganismos hasta niveles seguros para el correcto empleo de la misma.

Generalmente los tratamientos terciarios ayudan a eliminar aquellos constituyentes y microorganismos patógenos del agua residual tales como coliformes fecales, estreptococos, *Salmonella* sp. y virus entéricos que no son eliminados en tratamientos previos. Los tratamientos terciarios para desinfección pueden ser divididos en: químicos, físicos y los que emplean radiación UV. Estos pueden emplearse de forma aislada o combinando tratamientos como cloración y exposición a la luz ultravioleta u ozonización. La elección depende de la calidad del efluente a tratar, simplicidad y coste de la instalación, mantenimiento y operación, así como los efectos en la flora, fauna y usuarios del efluente final (USEPA, 1999).

### 1.6.1. Filtración con membranas

La filtración mediante membranas está basada en la separación de partículas en función de su tamaño de poro. Según la membrana elegida se pueden separar sólidos en suspensión, bacterias, virus, parásitos y quistes, así como proteínas, pesticidas y ácidos húmicos entre otros, de forma que aplicando esta tecnología se puede obtener agua libre de patógenos y compuestos químicos (LeChevallier y Au, 2004). La retirada de partículas del agua mediante el uso de membranas se basa en ejercer una presión transmembrana para conducir el agua a través de las mismas, generándose dos corrientes, la del agua tratada o permeado y la del rechazo que contiene las partículas y los sólidos separados. Las membranas pueden clasificarse en función del material (acetato de celulosa, polisulfonas, compuestos de polivinilo, así como materiales cerámicos o aceros inoxidable), su forma y disposición (plana, tubular, transversal o tangencial) y tamaño de poro (microfiltración, ultrafiltración, nano filtración y ósmosis inversa).

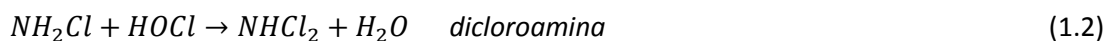
La tecnología de membrana se ha desarrollado en los últimos años con fines industriales para obtener concentrados o para aprovechar el permeado. En este sentido su aplicación en el tratamiento de aguas presenta un gran interés basado principalmente en las nuevas necesidades que precisa este sector, tales como altos estándares de calidad, reducido impacto medioambiental de los efluentes tratados, mínimo espacio disponible para las instalaciones y amplio rango de aplicación. Las principales ventajas de esta tecnología son la separación continua, su posible combinación con otros procesos de separación y un escalado relativamente sencillo. Sin embargo, presenta el inconveniente de la colmatación de la membrana (*fouling* y *biofouling*), que obliga a su limpieza regular para no reducir la eficacia y, periódicamente, a su sustitución. Además, su uso se encuentra limitado debido a las altas inversiones y los elevados costes de operación asociados.

### 1.6.2. Cloración

El empleo del cloro y sus derivados es el método de desinfección más usado en aguas superficiales y subterráneas, puesto que previene el recrecimiento microbiano y proporciona protección continua durante el proceso de distribución del agua gracias a su efecto residual. Entre los factores que afectan a la eficiencia de la desinfección con cloro se encuentran el tipo y la concentración de microorganismos, la naturaleza y concentración del desinfectante, el tiempo de contacto, temperatura, pH y contenido en materia orgánica.

El cloro en su forma gaseosa es un fuerte oxidante que es comúnmente usado en grandes plantas de tratamiento puesto que es más rentable que otros tratamientos terciarios y permite una aplicación fácil y precisa. Cuando el cloro entra en contacto con agua es hidrolizado a ácido hipocloroso e hipoclorito, siendo el ácido hipocloroso uno de los agentes oxidantes más fuertes. El hipoclorito de calcio está disponible como gránulos, en polvo y en tableta mientras que el hipoclorito de sodio, también conocido como lejía de uso doméstico es una solución al 13% de cloro.

Las cloraminas se obtienen por la reacción de cloro y amoníaco resultando un producto antiséptico muy estable cuya acción es menos potente que la del cloro pero su persistencia en el agua es muy superior (Ecuaciones 1.1 y 1.2). Entre las desventajas de la desinfección con cloraminas se encuentran la formación de subproductos de desinfección, incluidos compuestos basados en nitrógeno, la necesidad de mayores dosis y tiempos de contacto que el cloro y la generación de amoniaco residual, que puede promover la formación de bacterias y algas.



El dióxido de cloro es más eficiente que el cloro y la cloramina ya que puede atravesar la membrana celular de la bacteria y dañarla. Su capacidad germicida se produce en un amplio rango de pH (3 a 9) y esta capacidad aumenta con la acidez, siendo más potente que el cloro en un tiempo de contacto más corto. Presenta una excelente acción germicida contra los virus al ser absorbido y penetrar en la capa proteica de la cápsida viral, reaccionando con su ARN. No reacciona con el nitrógeno amoniacal para formar aminas cloradas ni con material oxidable para formar compuestos organoclorados. Sus principales desventajas son la descomposición en subproductos inorgánicos (clorito y, en menor grado, clorato) y que requiere equipos de generación y manejo de productos químicos en el lugar de uso.

Sin embargo, una de las mayores desventajas asociadas con el uso del cloro o sus derivados en el proceso de desinfección de efluentes acuosos para su posterior reutilización es la producción de subproductos tóxicos, cancerígenos, tales como triclorometanos y otras cloraminas (Tchobanoglous *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 2007).

### 1.6.3. Ozonización

El ozono en solución acuosa puede reaccionar, al igual que con la mayoría de compuestos orgánicos, directamente con los microorganismos y causar su inactivación debido a su alto poder oxidante. Debido a su naturaleza inestable, debe ser generado *in situ* mediante el paso del oxígeno a través de un campo eléctrico de alto voltaje (Ecuaciones 1.3 y 1.4). La dosis de ozono requerida depende de una serie de factores, siendo lo más importante el tipo de efluente que va a ser tratado. El ozono no forma subproductos de desinfección organoclorados, pero pueden aparecer compuestos bromados si el agua contuviera bromuros, además de otros productos orgánicos como aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, quininas y peróxidos que son potencialmente cancerígenos y mutagénicos. Además, a pesar de su elevada capacidad germicida, la implantación de este proceso se ve limitada por los altos costes de inversión y operación (Tchobanoglous *et al.*, 2005).





#### 1.6.4. Luz ultravioleta (UV-C)

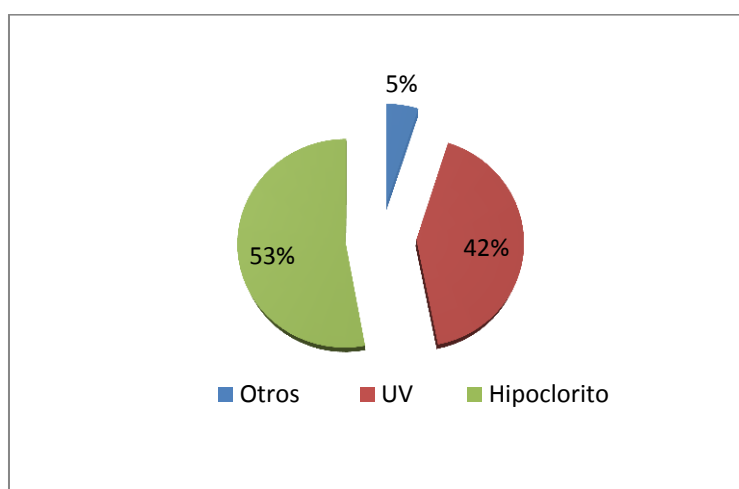
La desinfección mediante luz ultravioleta está basada en el alto poder germicida de la radiación UV-C. Este método se basa en el uso de lámparas de vapor de mercurio que emiten en longitudes de onda de 200 a 280 nm donde la energía electromagnética es transferida al material genético de los organismos presentes en el agua residual. La radiación UV-C es absorbida por los nucleótidos, promoviendo la formación de enlaces entre nucleótidos adyacentes, con la consiguiente formación de dímeros, siendo los más comunes los de timina-timina, y en menor proporción los de citosina-citosina, citosina-timina y de uracilo en el caso del ARN. La formación de un número suficiente de dímeros impide el mecanismo de replicación en el microorganismo y, por tanto, conduce a su inactivación (Bolton y Linden, 2003).

El uso de la luz ultravioleta como método de desinfección está siendo cada vez más utilizado debido a sus reducidos riesgos en materia de seguridad y baja toxicidad ambiental. Al ser una forma física de desinfección, elimina la necesidad de manipulación, transporte o almacenamiento de productos químicos tóxicos o corrosivos. Además, el potencial para generar subproductos se reduce en gran medida, eliminando cualquier efecto residual en humanos o vida acuática (Baus *et al.*, 2007). Sin embargo, la acción germicida de la luz UV-C depende, aparte del grado de absorción por los diferentes microorganismos, de la calidad del efluente a tratar, por lo que su uso no es extensible a cualquier tipo de efluente. La presencia de sólidos en suspensión puede dificultar la incidencia de la radiación sobre los microorganismos, así como las partículas minerales (de hierro, calcio y magnesio) o compuestos orgánicos pueden producir incrustaciones en las paredes de las lámparas y absorber parte de la radiación UV-C. La dosis de radiación recibida por los microorganismos es un parámetro clave en este proceso debido a la capacidad de algunos de revertir el daño producido. Esto es fundamentalmente debido a los mecanismos de reparación de los ácidos nucleicos denominados mecanismos de foto-reactivación o foto-reparación, en los que una enzima foto-reactiva, tras absorber radiación rompe el dímero formado (Grocock, 1984; Masschelein, 2002).

#### 1.6.5. Tratamientos terciarios de desinfección usados en España

En España los tratamientos más utilizados son la desinfección mediante hipoclorito o radiación ultravioleta (Figura 1.4). Por ejemplo, la depuradora de Boadilla del Monte (Madrid), cuenta con un sistema de ultrafiltración, un tratamiento posterior de rayos UV, y una ligera post-cloración para asegurar su calidad antes de su distribución. La EDAR de Reus (Tarragona) está equipada con un sistema de desinfección mediante lámparas ultravioleta activadas mediante energía

microondas (sin electrodos de encendido y sin conexiones eléctricas cercanas al agua). Por otro lado, la EDAR de Arcos de la Frontera (Cádiz), cuenta con un sistema de tratamiento terciario pionero en España, consistente en filtración por telas y desinfección por luz ultravioleta, cuya agua regenerada llega al campo de golf Arcos Gardens. Las EDAR de Ponteareas (Vigo) o del Baix Llobregat (Barcelona), incorporan un sistema de desinfección mediante lámparas UV-C que está ideado para el sostén del caudal ecológico del río, sustitución del riego agrícola y el mantenimiento de humedales. También, aunque de manera muy poco usual, se emplea el uso de ozono para la desinfección, como es en el caso de la depuradora de Castellón.



**Figura 1.4.** Tratamientos terciarios de desinfección usados en España (CEDEX, 2008).

## 1.7. Aplicación de la radiación solar a los procesos de desinfección de aguas

### 1.7.1. Efecto en la inactivación de microorganismos

A la superficie de la tierra llegan fotones de longitudes de onda comprendidas entre 320 y 2000 nm, correspondientes a la radiación UV-B lejana, UV-A, radiación visible e infrarroja. De toda la radiación que incide sobre la superficie terrestre, la densidad superficial de energía radiante se distribuye en un 4 % de ultravioleta, un 47.3 % de visible y un 44.9 % de infrarroja (Fernández-Ibáñez *et al.*, 2004) suma de dos componentes, directa y difusa. La radiación directa no sufre interacciones al atravesar la masa atmosférica. Sin embargo, la radiación difusa llega al nivel del suelo con una dirección distinta a la directa, debido a los procesos de dispersión de la luz que tienen lugar a su paso por la atmósfera. En general, la irradiancia solar ultravioleta presenta una proporción de componente difusa en relación con la global relativamente elevada (alrededor del 30%) si se compara con la visible. Esto es debido a que la presencia de nubes y vapor de agua

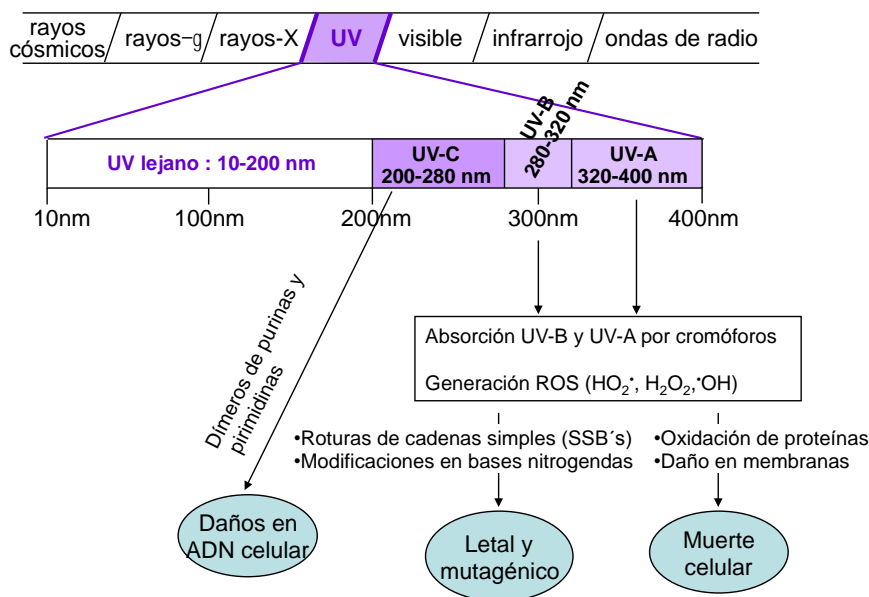
dispersa los fotones UV, aunque estos no son absorbidos. En un emplazamiento determinado, la radiación UV está sometida a variaciones en su intensidad por las posibles alteraciones de los agentes atmosféricos que la atenúan, así como por las condiciones climatológicas siempre cambiantes, siendo la presencia de nubes, el factor predominante de atenuación en la región UV (Blanco, 2002a).

Aunque se puede establecer un valor promedio estimado de irradiancia global UV recibida, los valores de densidad de energía UV varían con la localización del emplazamiento (longitud y latitud) y con el tiempo. Por ello, es muy importante medir en cada localización estos valores durante los experimentos solares, y para ello se emplean piranómetros de radiación UV global.

Cada fracción del espectro UV genera diferentes daños sobre las células, de modo que se divide en las siguientes franjas:

- UV-Vacío (100-200 nm): no tiene efectos sobre las células porque es rápidamente disipada en el agua en distancias cortas y además no alcanza la superficie terrestre.
- UV-C (200-280 nm): es la más energética y peligrosa para las células ya que comprende la longitud de onda de máxima adsorción del ADN. No alcanza la superficie terrestre porque es retenida principalmente en la capa de ozono. Esta radiación, como ya se ha mencionado anteriormente, es empleada para desinfección de agua mediante el uso de lámparas.
- UV-B (280-320 nm): Al igual que la UV-C queda casi totalmente retenida por la capa de ozono y puede provocar alteraciones en el ADN, sin embargo una pequeña parte de la radiación UV-B (variable del 4-5% de toda la radiación UV solar terrestre) llega a la superficie terrestre provocando daños sobre tejidos vivos (carcinomas de piel) o sobre microorganismos (parte del efecto bactericida del proceso SODIS).
- UV-A (320-400 nm): la fracción mayoritaria del rango UV solar que alcanza la superficie terrestre, y sus efectos son similares a los del UV-B pero algo menos dañinos al ser menos energética, por lo que requiere de mayores dosis para generar el mismo efecto.

La Figura 1.5 resume los principales daños generados sobre las células por la fracción del espectro solar que corresponde a cada rango de radiación ultravioleta. La inactivación de células microbianas por exposición a la radiación UV obedece a distintos mecanismos que dependen del rango UV empleado.



**Figura 1.5.** Principales daños biológicos producidos por las distintas franjas del espectro UV (adaptado de Malato *et al.*, 2009).

La luz del sol utilizada durante la desinfección solar se compone principalmente de los rayos UV-A (sólo un 4,5 % de la radiación UV solar es UV-B) y el mecanismo de inactivación principal es un proceso foto-oxidante debido a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Las ROS pueden provocar la peroxidación de lípidos e incluso lesiones del ADN mediante la formación de dímeros de pirimidina. Asimismo, dañan al ADN rompiendo la hebra u oxidando las bases nitrogenadas pudiendo ser letal para el microorganismo. Además, se pueden oxidar proteínas y provocar daños en la membrana que conducen a la muerte celular (Spuhler *et al.*, 2010).

### 1.7.2. Captadores Solares tipo CPC

Los reactores tipo CPC (Captadores Parabólicos Compuestos) surgieron en los años 80 para concentrar radiación solar mediante dispositivos fijos. Estos sistemas combinan características de los sistemas parabólicos de alta concentración y alta temperatura (por encima de 400 °C) y los sistemas planos fijos no concentradores (hasta 150 °C). Las ventajas de este sistema para su aplicación a la fotocatalisis solar se resumen a continuación (Romero *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2000; Malato *et al.*, 2002a; 2002b; 2004; Robert y Malato, 2002):

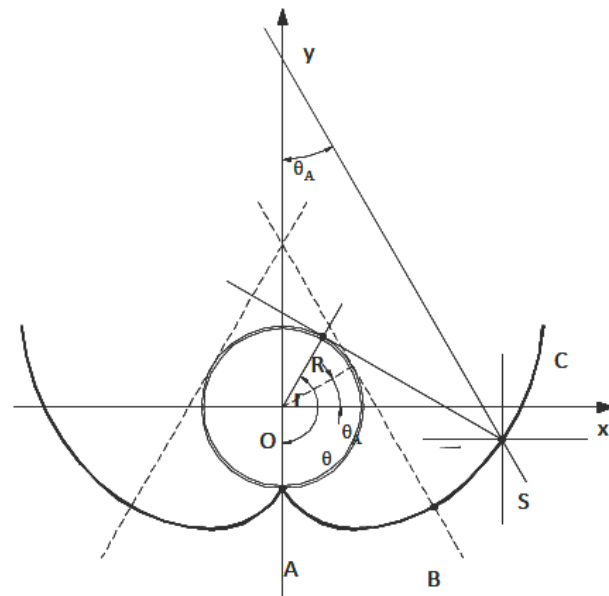
- Aprovechamiento de radiación directa y difusa, frente a los de seguimiento de la trayectoria solar, que sólo captan la directa.

- Su rendimiento óptico es muy alto ya que aprovechan toda la radiación que les llega y, puesto que no recibe un flujo fotónico excesivo, se obtiene una eficiencia en las reacciones de fotocatalisis muy elevada.
- No se producen aumentos de temperatura importantes en el seno de la reacción fotocatalítica, por lo que se evitan problemas de pérdidas o volatilización de compuestos orgánicos.
- Permite el uso de reactores presurizados, tanto para evitar pérdidas de volátiles como para aumentar la concentración de O<sub>2</sub>, si fuese necesario.
- Requiere el uso de un reactor tubular evitando los problemas de los sistemas no concentradores, que tienen flujo laminar y ofrecen una transferencia de materia muy baja. En el tubular se puede producir flujo turbulento, favorable para la fotocatalisis.
- Sus costes de construcción, instalación y mantenimiento son inferiores a los de los captadores de seguimiento.

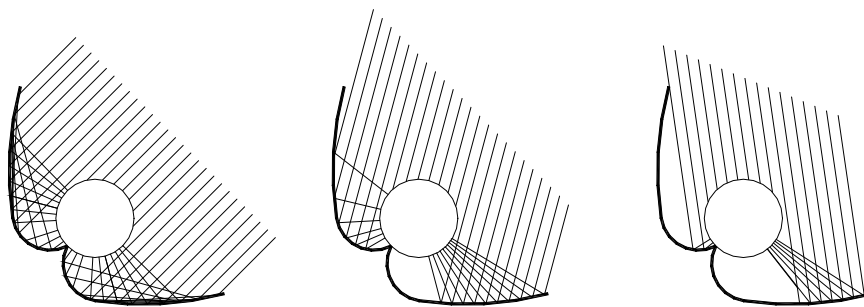
Los captadores CPC son estáticos y presentan una superficie reflectante cuya sección es una curva compuesta por, a su vez, dos curvas que para el caso de un receptor cilíndrico son una parábola y la involuta del receptor. En el caso de aplicaciones fotocatalíticas, el receptor es un reactor cilíndrico transparente, lo que permite el bombeo del agua. Los captadores CPC consiguen concentrar sobre el receptor toda la radiación solar que incide sobre los mismos por debajo del ángulo de aceptación ( $2\theta_A$ , Figura 1.6) y permiten obtener un factor de concentración (FC) de 1 (Collares-Pereira *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 2002a). Esto ocurre cuando el semiángulo de aceptación es  $90^\circ$ , lo que permite captar toda la radiación UV, directa y difusa, que alcanza al área de apertura del CPC. El factor de concentración de un captador CPC de dos dimensiones viene dado por la Ecuación 1.5.

$$FC_{CPC} = \frac{1}{\sin \theta_A} = \frac{A}{2\pi r} \quad (1.5)$$

donde ( $\theta_A$ ) es el semi-ángulo de aceptación,  $r$  es el radio del receptor y  $A$  es la apertura del captador. El semi-ángulo de aceptación ( $\theta_A$ ), para aplicaciones fotocatalíticas es  $60^\circ - 90^\circ$ . Este amplio ángulo de aceptación permite que el receptor pueda recoger tanto radiación directa como una gran parte de la radiación difusa. La luz reflejada por el espejo CPC se distribuye en todo el tubo receptor de modo que toda la circunferencia del tubo receptor está iluminada de forma homogénea con la totalidad de la luz UV que entra en la apertura del CPC (Figura 1.7).



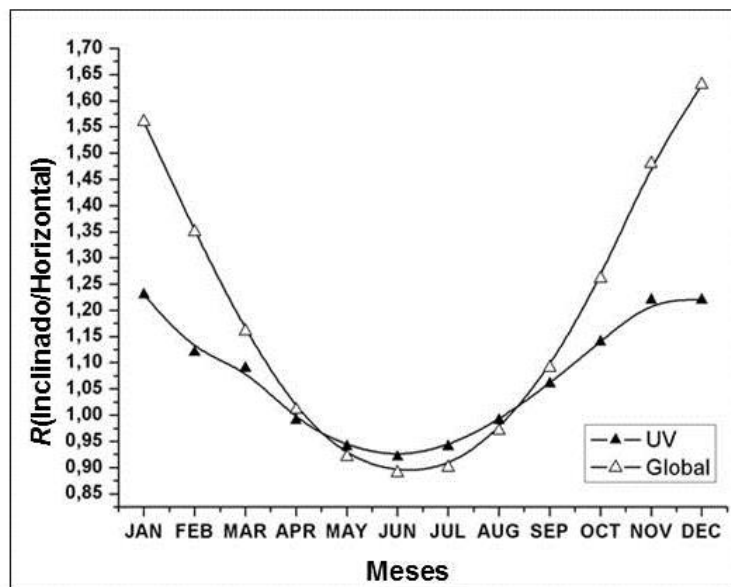
**Figura 1.6.** Esquema de diseño de la curva del captador CPC (Blanco, 2002a).



**Figura 1.7.** Diagrama de rayos de la radiación reflejada en la superficie de un espejo CPC (Blanco *et al.*, 2000; 2002a).

La energía UV global anual recibida sobre un plano aumenta con la inclinación fija del captador solar. Este incremento depende de varios factores como las condiciones climáticas, inclinación, orientación y la cantidad de radiación solar directa y difusa en una determinada localización (Duffie y Beckman, 2006). La inclinación del reactor hacia el ecuador favorece la captación de la radiación solar directa en detrimento de la difusa. La inclinación óptima coincide con la latitud del emplazamiento donde se ubica el captador. Los reactores tipo CPC ubicados en el edificio CIESOL (latitud: 36°49'49.1"N, 2°24'26.0"O), se encuentran inclinados 37° sobre la horizontal y orientados hacia el sur. Según Duffie y Beckman, la ganancia anual de radiación solar global es de un 10 % en el plano inclinado respecto al horizontal (Duffie y Beckman, 2006). Este balance positivo se debe a que el espectro global que alcanza la superficie terrestre presenta una elevada fracción de radiación directa cuya captación se ve favorecida en el plano

inclinado. En la Figura 1.8 se representa la relación de la irradiancia mensual medida en la Plataforma Solar de Almería (PSA) en el plano inclinado respecto al horizontal del espectro global y UV.



**Figura 1.8.** Irradiancia mensual media en la PSA: relación entre medida en plano inclinado y horizontal (espectro global y UV), (Navntoft *et al.*, 2012).

Las medidas de irradiancia solar realizadas en la PSA (Almería, a 40 km del lugar donde se han realizado los ensayos de esta tesis) durante varios años en plano horizontal e inclinado ( $37^\circ$ ) y en el espectro global y UV muestran que durante los meses de agosto a abril, la ganancia de radiación solar oscila entre 1 y 1,25 en el rango UV y de 1 a 1,55 en el global. Por otro lado, en los meses de mayo a julio se da una pérdida en esta relación de hasta 0,95 (UV) y 0,85 (global) (Figura 1.8) (Navntoft *et al.*, 2012).

Los dispositivos CPC para aplicaciones fotocatalíticas se fabrican generalmente con reflectores de aluminio anodizado, ya que se trata de una superficie de alta reflectividad en el UV que además es resistente a elevados niveles de radiación solar y a las condiciones meteorológicas adversas (Malato *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2000; 2002b). El sistema completo debe ser cerrado, de modo que el medio acuoso pueda mantenerse sin alterarse al pasar por el sistema de tuberías, y que el material empleado para este objetivo no se vea afectado por el tipo de reactivo, los distintos valores de pH o por temperaturas ligeramente altas. El material generalmente utilizado en el sistema de tuberías y valvulería es el polietileno. También debe permitir la fluidez del líquido a una mínima presión y máxima homogeneidad. El

movimiento del agua a lo largo del sistema se lleva a cabo con bombas centrífugas cuya potencia se escoge en función del volumen total del reactor y el máximo flujo requerido para el tratamiento fotocatalítico (normalmente es un régimen turbulento). Adicionalmente, es deseable que sea resistente a la intemperie y fácil de manejar y de limpiar por el usuario.

Desde el punto de vista de su transparencia en el rango UV el mejor material para el tubo reactor es el cuarzo, aunque su precio es muy elevado. Por ello, y para cumplir todas las exigencias anteriores, se utiliza el vidrio borosilicatado, a pesar de que cierta cantidad de hierro, que puede llegar a absorber alrededor del 8% de los fotones de longitud de onda inferior a 400 nm (Blanco *et al.*, 2002b). Sin embargo, una reducción en la cantidad de hierro (<50 mg kg<sup>-1</sup> de vidrio) permite obtener vidrios de alta transmisividad en el rango UV de 300 a 400 nm (Blanco *et al.*, 2000). Tanto los espejos CPC como los tubos de vidrio de boro-silicato se montan sobre un marco que, a su vez, es el soporte para la conexión de los tubos, válvulas, bombas, etc. (Blanco *et al.*, 2000).

Son muy numerosos los trabajos científicos que demuestran que el uso de reactores solares tipo CPC tienen un gran potencial para degradar contaminantes persistentes en agua mediante procesos fotocatalíticos (Agüera *et al.*, 2000; Herrmann *et al.*, 2002; Augliaro *et al.*, 2002; Malato *et al.*, 2000; 2000b; 2009). Recientemente también se ha demostrado su capacidad para la desinfección de aguas (Navntoft *et al.*, 2008; Ubomba-Jaswa *et al.*, 2010; Argulló-Barceló *et al.*, 2013; Polo-López *et al.*, 2014).

### 1.8. Proceso foto-Fenton solar

#### 1.8.1. Introducción a los procesos de oxidación avanzada

En las últimas décadas, los procesos de oxidación avanzada (POA) han surgido como una tecnología alternativa para la eliminación eficiente de contaminantes orgánicos presentes en aguas depuradas que tienen una alta estabilidad y/o baja biodegradabilidad y han adquirido una relevancia importante por su uso como tratamiento terciario (Bernabeu *et al.*, 2011). La efectividad de estos métodos se basa en la generación radicales hidroxilo (HO<sup>•</sup>) que tienen un alto potencial oxidante ( $E_0 = 2,80$  V) y que producen la descomposición de los contaminantes orgánicos en productos no tóxicos como dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas (Malato *et al.*, 2009). Además, estos radicales no son selectivos, por lo que son muy apropiados para el tratamiento de una amplia variedad de contaminantes.



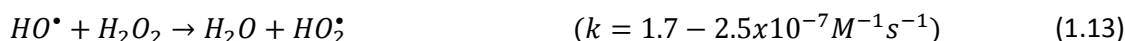
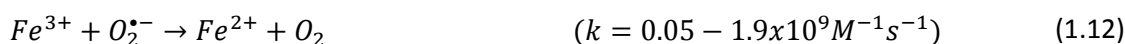
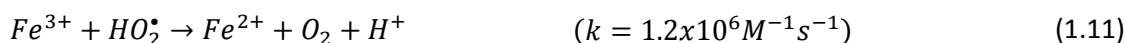
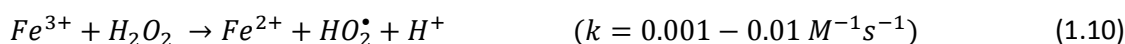
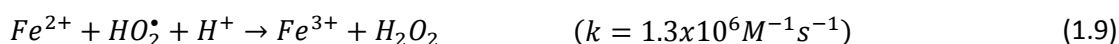
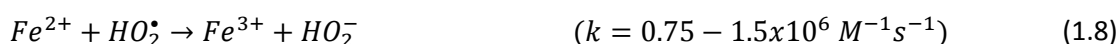
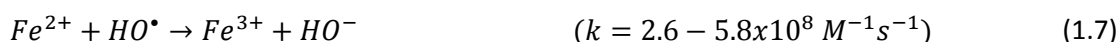
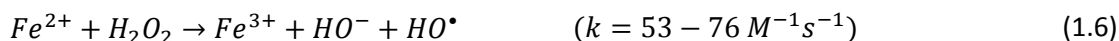
Entre los diversos POA tienen especial importancia los procesos fotocatalíticos en los que una especie química es alterada como resultado de la absorción de radiación por parte de una especie fotosensible o fotocatalizador. El concepto de fotocatalisis heterogénea se basa en el uso de un sólido semiconductor irradiado con fotones de longitud de onda apropiada para generar una reacción en la interfase sólido/líquido o sólido/gas. En este sentido los fotocatalizadores más investigados hasta el momento son los óxidos metálicos semiconductores y, particularmente, el  $\text{TiO}_2$  que presenta una elevada estabilidad química y es apto para trabajar en un amplio rango de pH. En la fotocatalisis homogénea (foto-Fenton), todos los componentes se encuentran en la misma fase, generalmente disueltos en la fase líquida y se emplean sales de hierro, cobre, etc. Además, el empleo de la energía solar como fuente de energía es un valor añadido puesto que aúna dos ventajas importantes: es una fuente de energía inagotable y es gratuita.

La fotocatalisis heterogénea y homogénea se ha empleado exitosamente en la degradación de contaminantes peligrosos en aguas (Pignatello, 2006; Malato *et al.*, 2009). Asimismo, en los últimos años, estos procesos han sido estudiados para llevar a cabo la inactivación de una amplia variedad de microorganismos como bacterias, hongos, nematodos y virus (Spuhler *et al.*, 2010; Nieto-Juárez *et al.*, 2010; Polo-López *et al.*, 2012). La capacidad de desinfección de estos procesos tiene un gran potencial en varias áreas: salud medioambiental, aplicaciones biológicas y médicas, laboratorios y hospitales, industria farmacéutica y alimentaria, tratamiento de aguas residuales depuradas y desinfección de agua de bebida (Zhang y Gamage *et al.*, 2010).

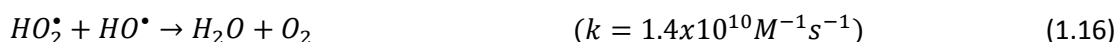
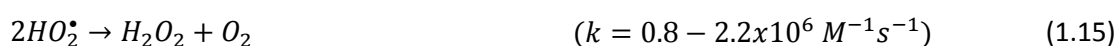
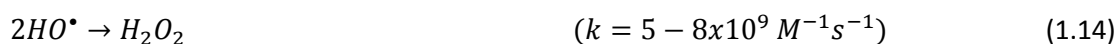
Desde el punto de vista de la desinfección de aguas, entre todos los POA, el proceso más investigado ha sido la fotocatalisis heterogénea con  $\text{TiO}_2$ . La eficiencia de este proceso sobre la inactivación microbiana ha sido ampliamente estudiada desde 1985. Sin embargo, en los últimos años, se ha incrementado el interés por el proceso fotocatalítico homogéneo o foto-Fenton ya que se han obtenido resultados muy prometedores. La eficiencia del proceso de foto-Fenton puede ser explicada por la gran cantidad de radicales hidroxilo generados a través del ciclo catalítico de los iones de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ) combinado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los fotones UV-vis (Malato *et al.*, 2009). Los radicales hidroxilo generados en el proceso causan la inactivación de los microorganismos incluyendo bacterias, virus, esporas y protozoos (Spuhler *et al.*, 2010; Agulló-Barceló *et al.*, 2013; Polo-López *et al.*, 2014).

## 1.8.2. El proceso foto-Fenton

El reactivo de Fenton, una mezcla de ion ferroso (catalizador) y peróxido de hidrógeno (oxidante), es un poderoso oxidante para contaminantes orgánicos. En la reacción de Fenton se produce la activación del peróxido de hidrógeno mediante un ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) dando lugar a la formación de radicales hidroxilo en una compleja secuencia de reacciones (Ecs. 1.6-1.13), (Malato *et al.*, 2009).

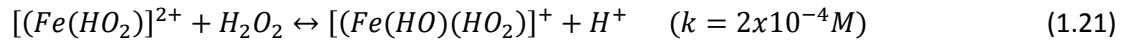


Reacciones entre radicales (Malato *et al.*, 2009):

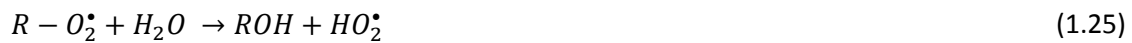
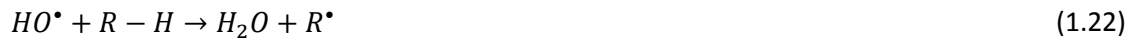


También deben de considerarse las siguientes reacciones de equilibrio (Malato *et al.*, 2009):





En presencia de un substrato orgánico (R-H), el radical hidroxilo sustrae un átomo de hidrógeno de R-H y se genera un radical orgánico (R<sup>•</sup>) (Ec. 1.22), que posteriormente se somete a un serie de transformaciones químicas para formar varios productos de oxidación (Ecs. 1.23-1.25), (Malato *et al.*, 2009).

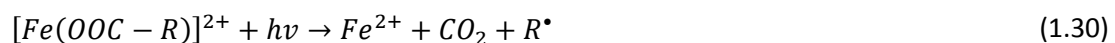


Los radicales hidroxilo pueden reaccionar con la materia orgánica con el peróxido de hidrógeno o con otros radicales. Estas reacciones paralelas son en la mayoría de los casos generadoras de oxígeno, mientras que otras etapas de oxidación son consumidoras de oxígeno. Por tanto, la evolución de la concentración del oxígeno disuelto puede indicar cambios en el proceso de foto-Fenton (Santos-Juanes *et al.*, 2011b).

En presencia de radiación UV-vis, tiene lugar el proceso foto-Fenton donde los iones férricos (Fe<sup>3+</sup>) producidos en la Ecuaciones 1.6-1.9 son foto-catalíticamente convertidos a iones ferrosos (Fe<sup>2+</sup>), con la formación de un equivalente adicional de radical hidroxilo (Ec. 1.26).

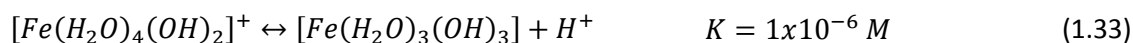
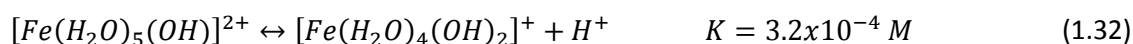


La foto-reducción del ion férrico es una reacción de transferencia de carga ligando-metal (TCLM). El ligando puede ser cualquier base de Lewis capaz de formar un complejo con Fe<sup>3+</sup> (HO-, H<sub>2</sub>O, R-COO-, etc) (Pignatello *et al.*, 2006). Las Ecuaciones 1.27-1.30 describen las principales reacciones involucradas en el proceso de foto-Fenton.

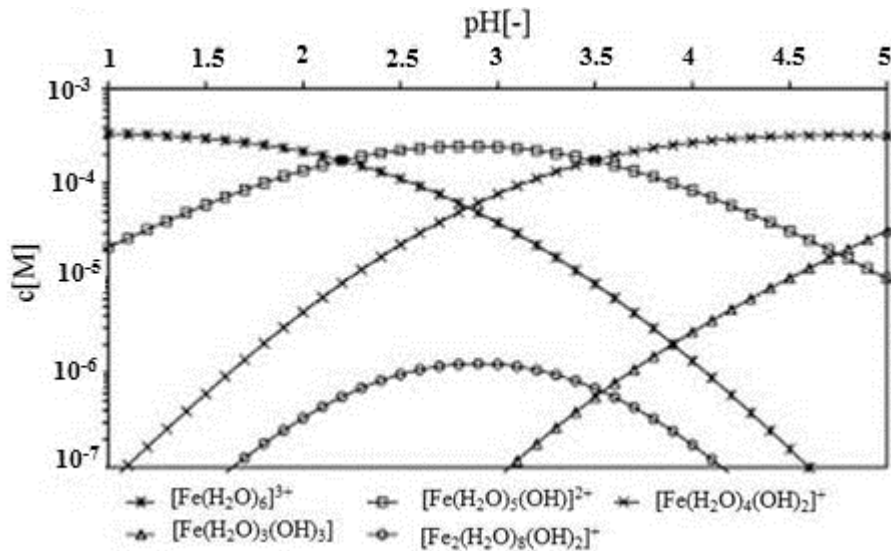


### 1.8.3. Química del hierro en agua

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, después del oxígeno, silicio y aluminio. Presenta números de oxidación de -II a +VI y números de coordinación de entre 3 y 8 (Hawker *et al.*, 1994). La especie de hierro más abundantes en solución acuosa tienen un número de oxidación de +II (ion ferroso) y +III (ión férrico). Los cationes de hierro, en ausencia de cualquier otro ligando que no sea agua, forman acuo-complejos de hierro hexacoordinados (ej:  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+/3+}$ ) en los que la polarización de las moléculas de agua coordinadas es fuertemente dependiente de la carga y tamaño del catión. Esto hace que los acuo-complejos férricos sean más ácidos que los ferrosos, y por tanto la desprotonización (o hidroxilación) de los complejos de  $\text{Fe}^{2+/3+}$  tenga lugar a diferentes rangos de pH (7-9 para el  $\text{Fe}^{2+}$  y 1-5 para  $\text{Fe}^{3+}$ ). Por tanto, el hierro férrico es la especie de hierro crítica en el proceso foto-Fenton puesto que sus hidróxidos precipitan a valores de pH más bajos que los del hierro ferroso. El equilibrio ácido/base para los acuo-complejos de hierro férrico se encuentra descrito en las Ecuaciones 1.31-1.34 (Malato *et al.*, 2009).



La Figura 1.9 muestra las concentraciones de equilibrio de los acuo-complejos de hierro férrico más importantes en ausencia de otras sustancias complejantes a diferentes valores de pH para una concentración de hierro férrico de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Como se puede observar a valores de pH entre 2.5 y 3 las especies predominantes son las especies de hierro soluble parcialmente hidrolizadas como  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$ , que es activa bajo UV-A/vis solar (Faust y Hoigne, 1990; Catastini *et al.*, 2002).



**Figura 1.9.** Especies de hierro férrico presentes en solución acuosa a diferentes valores de pH a una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup>, calculado con constante de equilibrio de Flynn (1984) a una temperatura de 20 °C.

A valores de pH entre 4 y 8 están presentes especies ferrosas como  $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ ,  $[Fe(OH)(H_2O)_5]^+$  y  $[Fe(OH)_2(H_2O)_4]$  que son rápidamente oxidadas mediante el oxígeno disuelto en el agua (Barona *et al.*, 2015). Los complejos ferrosos con carga cero  $[Fe(OH)_2(H_2O)_4]$  pueden ser formados a valores de pH cercanos al neutro pero son altamente inestables por su facilidad de oxidación e instantáneamente formen compuestos férricos sólidos tales como magnetita, goethita, lepidocrocita o ferroxihita. El compuesto férrico precipitado depende de las condiciones físico-químicas como la acidez, potencial redox, temperatura, fuerza iónica, presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos y actividad bacteriana (Jolivet *et al.*, 2006). En aguas que contienen materia orgánica natural (MON) disuelta el  $Fe^{3+}$  puede formar complejos con algunos de estos compuestos orgánicos. Los complejos orgánicos- $Fe^{3+}$  son estables a pH neutro, por lo que el proceso foto-Fenton puede llevarse a cabo sin necesidad de trabajar a valores de pH ácidos.

#### 1.8.4. Variables involucradas en la desinfección mediante foto-Fenton solar

Uno de los principales variables en el proceso foto-Fenton es el pH, estando el óptimo en el rango de 2 a 4. A valores de pH mayores de 4 los iones de  $Fe^{2+}$  son fácilmente oxidados a  $Fe^{3+}$ , formando complejos hidroxilados que precipitan desfavoreciendo el proceso. Asimismo, el  $H_2O_2$  se descompone en oxígeno y agua a valores altos de pH, disminuyendo sus propiedades oxidativas. Sin embargo, condiciones muy ácidas, así como cantidades altas de  $H_2O_2$ , pueden

resultar tóxicas o letales para los microorganismos. El uso de una cantidad excesiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$  junto a un bajo pH puede ser más dañino para la célula que el propio proceso Fenton (Gogate y Pandit, 2004). Adicionalmente, se eliminan los costes de operación asociados con la acidificación y posterior neutralización del agua para su uso o vertido si se realiza la desinfección con foto-Fenton a pH neutro (Klamerth *et al.*, 2012). Por tanto, uno de los mayores desafíos para los científicos en este campo es investigar las condiciones que proporcionen la mayor eficiencia al proceso de desinfección mediante foto-Fenton a pH neutro o cercano a la neutralidad.

Diversos autores han desarrollado algunas estrategias para evitar la precipitación del hierro en disolución a pH neutro. Moncayo-Lasso *et al.* usaron una malla de sílice inmovilizado cargada con iones de hierro para la inactivación de *E. coli* K12 a pH neutro mediante foto-Fenton. En estas condiciones, obtuvieron un descenso en la concentración de bacterias de  $10^5$  a  $10^3$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  en 4 h de reacción con tan solo una pequeña cantidad de iones de hierro en disolución ( $1.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Moncayo-Lasso *et al.*, 2008). También, Ramírez *et al.* sugirieron la inmovilización de iones ferrosos en carbón activo poroso (Ramírez *et al.*, 2007). Cho *et al.* utilizaron un sistema de desinfección basado en el foto-ferrioxalato (iones oxalato y luz UV-vis) permitiendo así al  $\text{Fe}^{3+}$  estar en disolución a pH neutro y la inactivación eficiente de *E. coli* (Cho *et al.*, 2004). Otra de las opciones estudiadas consiste en el uso de diferentes complejantes del hierro como el ácido etilendiamina-N,N'-disuccinico (EDDS) (Klamerth *et al.*, 2013). Klamerth *et al.* mostraron que la complejación del hierro con EDDS conduce a la solubilización y estabilización del hierro a pH natural aunque la inactivación bacteriana que se alcanzó no fue completa. Recientemente, también se ha estudiado una nueva estrategia de operación a pH neutro basada en la adición secuencial de hierro (Carra *et al.*, 2013). Carra *et al.* consiguieron obtener similares velocidades de reacción y grados de mineralización para el tratamiento por foto-Fenton a pH neutro y pH 3 de un agua residual depurada enriquecida con una mezcla de plaguicidas. Sin embargo, hasta la fecha este sistema no se ha estudiado en la inactivación microbiana.

La desinfección de aguas residuales depuradas mediante un proceso fotocatalítico solar se lleva a cabo en condiciones ambientales de temperatura. Dependiendo del valor de temperatura la reacción de foto-Fenton puede ser más o menos eficiente (Malato *et al.*, 2009). El proceso foto-Fenton puede por tanto ocurrir en un amplio rango de temperaturas ambientales comunes durante el día en lugares donde la luz solar puede ser usada para las reacciones fotoquímicas. Por tanto, el comportamiento de estos procesos debería de ser estudiado a estas temperaturas, puesto que la temperatura no solo afectará a la reacción foto-

química sino también a la respuesta de los microorganismos al tratamiento y por tanto a la velocidad de desinfección. Por esta razón, la temperatura puede llegar a ser un parámetro clave en la reducción del coste de reactivos y tiempo de tratamiento.

La presencia de diferentes iones tales como el carbonato ( $CO_3^{2-}$ ), fosfato ( $PO_4^{4-}$ ), sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) y cloruro ( $Cl^-$ ) tienen un efecto en el equilibrio del hierro en agua, y por tanto, un impacto negativo en el proceso foto-Fenton (Spuhler *et al.*, 2010; Polo-López *et al.*, 2012; Agulló-Barceló *et al.*, 2013). En particular, los carbonatos y fosfatos tienen un doble efecto perjudicial en la reacción fotocatalítica, puesto que favorecen la precipitación del hierro y actúan como capturadores de radicales hidroxilo. Marugán *et al.*, mostraron que la presencia de ácidos húmicos e iones bicarbonato conduce a un importante descenso en la velocidad de desinfección de *E. coli* usando fotocatalisis heterogénea ( $TiO_2$ ) (Marugán *et al.*, 2011). En el caso de los fosfatos, Pignatello *et al.*, mostraron que incluso una baja concentración de fosfatos conlleva una fuerte reducción en la velocidad de desinfección debido a la competencia por los radicales hidroxilo y a la formación de hidróxidos de hierro con la subsecuente precipitación y pérdida de hierro disuelto. En el proceso foto-Fenton las formas de hierro insolubles se complejan con los fosfatos parando la reacción (Pignatello *et al.*, 2006). Ndounla *et al.*, pusieron de manifiesto la significativa variación del estado de los compuestos de nitrógeno durante los procesos de foto-desinfección, lo que debe ser tenido en cuenta para el posterior reúso del agua (Ndounla *et al.*, 2014).

El proceso foto-Fenton llevado a cabo a pH cercanos al neutro puede ser mejorado por la presencia de MON en el agua. Esto se debe a que, dependiendo de las características de esta materia orgánica y de la presencia de ciertos compuestos, el  $Fe^{3+}$  puede formar complejos orgánicos que absorben la luz del espectro solar y son estables al pH natural del agua, lo que puede evitar la necesidad de trabajar a valores de pH ácidos en los sistemas tradicionales de foto-Fenton. Los complejos foto-activos formados están formados por grupos carboxilato o policarboxilato (oxalato, malato, citrato, etc.) ya que son los grupos funcionales más comunes de la materia orgánica disuelta en aguas naturales. Un ejemplo de MON es el resorcinol, que ha sido usado como modelo de materia orgánica en la inactivación fotocatalítica de *E. coli* mediante  $TiO_2$  (Rincón y Pulgarín, 2004a) y foto-Fenton a pH neutro (Spuhler *et al.*, 2010). El resorcinol y sus intermedios de degradación forman complejos con el hierro que son foto-activos a pH neutro (Spuhler *et al.*, 2010).

Uno de los principales objetivos en la desinfección de aguas depuradas conteniendo materia orgánica es conseguir al mismo tiempo la degradación de la materia orgánica, la

descontaminación química y la inactivación microbiana durante el tratamiento fotocatalítico. La presencia de sustancias orgánicas presentes naturalmente en el agua tales como isómeros dihidroxibencenos (resorcinol entre otros) muestra un efecto negativo en la desinfección fotocatalítica de *E. coli* con  $\text{TiO}_2$  (Rincón y Pulgarín, 2004a). Cho *et al.*, consiguieron la inactivación de *E. coli* mediante  $\text{TiO}_2$  en presencia de metanol como capturador de radicales hidroxilo. Sus resultados mostraron que el metanol inhibe significativamente la inactivación de *E. coli* (inactivaciones menores de 0.5-log en 60 min). Marugán *et al.*, estudiaron la oxidación química del azul de metileno y la inactivación de *E. coli* mediante tratamiento fotocatalítico con  $\text{TiO}_2$ . Concluyeron que los cambios observados en la oxidación de la molécula orgánica no pueden ser extrapolados al proceso de desinfección fotocatalítica (Marugán *et al.*, 2010). Sin embargo, los estudios de Chen *et al.* indicaron que hay una aparente correlación entre los procesos de descomposición del formaldehído y la inactivación de *E. coli* mediante el tratamiento fotocatalítico con  $\text{TiO}_2$  (Chen *et al.*, 2009).

### **1.9. Revisión del estado actual del proceso de desinfección mediante foto-Fenton a pH neutro**

Existen numerosas publicaciones basadas en la degradación de compuestos orgánicos en agua mediante foto-Fenton (Malato *et al.*, 2009). Sin embargo, las primeras aplicaciones de este proceso en la desinfección de aguas datan del año 2005 y desde entonces se han publicado únicamente unas tres decenas de artículos. La Tabla 1.8 recopila todas las publicaciones referentes a la desinfección de microorganismos mediante foto-Fenton a pH neutro. Asimismo, se incluye la novedad o aportación más relevante de cada trabajo y la condición más eficiente. La comparación de los resultados mostrados en la Tabla 1.8 es complicada puesto que las condiciones experimentales en cada trabajo son muy diferentes. Así, los estudios se han realizado con diversos tipos de matriz acuosa, fuentes (luz solar, luz solar artificial) e intensidad de radiación, tipos de microorganismos, tipos de reactores (reactor discontinuo secuencial, botella PET, CPC u otros), concentraciones de reactivos, temperaturas o valores de pH.

Las primeras aportaciones a la desinfección de aguas mediante foto-Fenton las realizaron Rincón y Pulgarín, demostrando que la presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  acelera la inactivación bacteriana por el efecto combinado de los complejos de hierro foto-activos y la acción directa de la radiación solar sobre la bacteria. Asimismo, demostraron que el proceso foto-Fenton presenta una mayor eficiencia que el tratamiento UV/ $\text{TiO}_2$  (Rincón y Pulgarín, 2006; Rincón y Pulgarín, 2007a; Rincón y Pulgarín, 2007b). Posteriormente, Moncayo-Lasso *et al.* realizaron por primera vez la aplicación simultánea del proceso foto-Fenton a pH neutro para la inactivación bacteriana



y la eliminación de materia orgánica en aguas depuradas, poniendo de manifiesto el efecto de competencia entre ambos procesos por los radicales hidroxilo (Moncayo-Lasso *et al.*, 2009).

Los primeros estudios de foto-Fenton solar a pH neutro han enfocado su aplicación en la desinfección de agua de bebida. Sin embargo, en los últimos 3-4 años se han publicado trabajos orientados a su aplicación como tratamiento terciario de plantas depuradoras de aguas residuales, usando efluentes simulados de EDAR (Polo-López *et al.*, 2012, Rodríguez-Chueca *et al.*, 2012; Rodríguez-Chueca *et al.*, 2013; Giannakis *et al.*, 2015) o utilizando efluentes reales como matriz acuosa (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2013; Argulló-Barceló *et al.*, 2013; Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014; Ruiz-Aguirre *et al.*, 2014; Pólo-López *et al.*, 2014).

Las reacciones de foto-Fenton han sido estudiadas para la inactivación de diferentes microorganismos tales como bacterias (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *E. faecalis*, coliformes totales, *Clostridium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*), hongos (*Fusarium solani*, *Phyophthora capsici*), nematodos y virus bacteriófagos (MS2). Entre estos microorganismos el que más se ha usado como modelo de contaminación fecal es *E. coli*, aunque cada vez más estudios demuestran que este no es un buen indicador debido a su gran sensibilidad (Siacca *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2012; Rodríguez-chueca *et al.*, 2013; Rodríguez-chueca *et al.*, 2014). Además, la mayoría de las investigaciones se encuentran focalizadas en la inactivación de microorganismos de colección y son pocas aquellas que se llevan a cabo con especies entéricas y autóctonas de las fuentes naturales de agua (Siacca *et al.*, 2010; Ndounla *et al.*, 2013, Ndounla *et al.*, 2014, Ndounla y Pulgarín, 2014) o del agua residual de EDAR (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2013; Argulló-Barceló *et al.*, 2013).

**Tabla 1.8.** Publicaciones de inactivación de microorganismos presentes en agua mediante foto-Fenton solar a pH neutro (inactivación por foto-Fenton que muestra el mejor resultado).

Autores, año	Microorganismo	Inactivación más rápida alcanzada mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro	Aportaciones, conclusiones relevantes
Rincón y Pulgarín, 2006	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar simulada Matriz: agua desionizada [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]= 10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=0.3 mg L <sup>-1</sup> TLD: 60 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La presencia de Fe<sup>3+</sup> acelera la inactivación bacteriana por el efecto combinado de los complejos de hierro fotoactivos y la acción directa de la radiación solar sobre la bacteria.</li> <li>- En el agua de lago la desinfección fotocatalítica y fotocatalítica es más rápida que con agua mili-Q.</li> <li>- La velocidad de inactivación mediante fotocálisis con TiO<sub>2</sub> es mayor que en foto-Fenton cuando la concentración de TiO<sub>2</sub> es mayor de 0.1 g L<sup>-1</sup>.</li> </ul>
Rincón y Pulgarín, 2007 (b)	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactor CPC Matriz: agua natural de lago [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]= 10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=0.3 mg L <sup>-1</sup> Inactivación completa con una dosis de energía de 2.5 kJ L <sup>-1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En comparación con la mera acción de la luz solar, la desinfección bacteriana mediante los sistemas UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> (foto-Fenton), UV/TiO<sub>2</sub> y UV/TiO<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> permite la inactivación bacteriana completa con ausencia de recrecimiento.</li> <li>- La desinfección más efectiva se alcanzó mediante el proceso foto-Fenton.</li> </ul>
Rincón y Pulgarín, 2007 (a)	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactor CPC Matriz: agua natural de lago [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]= 10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=0.3 mg L <sup>-1</sup> TLD: 90 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El sistema UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> (foto-Fenton) es más eficiente que el sistema UV/TiO<sub>2</sub> y UV/TiO<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup></li> </ul>
Moncayo-Lasso et al., 2008	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar simulada [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=0.1 mg L <sup>-1</sup> TLD: 180 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primer estudio en el que se lleva a cabo el proceso foto-Fenton heterogéneo. Inmovilizaron iones de hierro en una maya de sílice.</li> </ul>
Moncayo-Lasso et al., 2009	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactor CPC Matriz: agua de río [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=0.6 mg L <sup>-1</sup> Inactivación completa (11 kJ L <sup>-1</sup> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aplicación del proceso foto-Fenton simultáneamente para la desinfección y eliminación de materia orgánica en aguas naturales.</li> </ul>

Tabla 1.8. Continuación.

Autores, año	Microorganismo	Inactivación más rápida alcanzada mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro	Aportaciones, conclusiones relevantes
Sichel <i>et al.</i> , 2009a	<i>Fusarium</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactor CPC y tanque agitado Matriz: agua destilada y de pozo [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=0	- Aplicación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con radiación solar para acelerar la foto-inactivación de esporas de <i>Fusarium</i> . Se atribuye a procesos de foto-Fenton interno en el interior de la espora.
Sciacca <i>et al.</i> , 2010	*Coliformes totales * <i>Salmonella sp.</i>	Fuente de fotones: luz solar Botellas de PET Matriz: aguas superficiales [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; 0.3 mg L <sup>-1</sup> (del agua) Coliformes totales y <i>salmonella sp.</i> TLD: 30 min (C <sub>0</sub> =10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup> )	- <i>E. Coli</i> no es un buen indicador de contaminación fecal. - La adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en aguas que contienen hierro natural y bajo la acción de la luz solar conducen a la inactivación microbiana mediante foto-Fenton
Spuhler <i>et al.</i> , 2010	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar simulada [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=0.6 mg L <sup>-1</sup> Matriz: Agua mili-Q enriquecida con resorcinol TLD: 65 min	- Se estudia el efecto de la materia orgánica y de la fuente de hierro empleada (Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup> ) en la inactivación de <i>E. Coli</i> mediante foto-Fenton a pH neutro. - Se realiza una interpretación mecánica de la desinfección solar del agua catalizada por el hierro que estudia las posibles vías involucradas en la foto-inactivación de <i>E. coli</i> en presencia de Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
Nieto-Juarez <i>et al.</i> , 2010	colifago MS2	Fuente de fotones: luz solar simulada Matriz: solución tampón de carbonato [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=50µM; [Fe <sup>3+</sup> /Cu <sup>2+</sup> ]=1-10 µM	- Ensayan dos sistemas: I <sub>uv</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>3+</sup> y I <sub>uv</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Cu <sup>2+</sup> - El sistema con Cu soluble es el que contribuye a la inactivación, mientras que en el caso del hierro es el hierro coloidal y no el disuelto el que participa en la inactivación. Esto tiene importante implicaciones en los mecanismos de inactivación. - La presencia de radiación solar mejora el proceso H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>3+</sup> . - En el sistema H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Cu <sup>2+</sup> el principal oxidante son los radicales hidroxilo mientras que en el sistema H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>3+</sup> el principal oxidante son las especies ferrilo.

Tabla 1.8. Continuación.

Autores, año	Microorganismo	Inactivación más rápida alcanzada mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro	Aportaciones, conclusiones relevantes
Bandala et al., 2011	Huevos de helmintos <i>E. coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fuente de fotones: Luz solar Matriz: Agua desionizada [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=280 mM; [Fe <sup>2+</sup> ]=10 mM Huevos helmintos: >5-log (140 kJ L <sup>-1</sup> ) [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=140 mM; [Fe <sup>2+</sup> ]=5 mM <i>E. coli</i> anda <i>P. aeruginosa</i> : >6-log (10 kJ L <sup>-1</sup> )	- Se desarrolla un indicador dosimétrico ( <i>Acid orange 24</i> ) que proporciona un cambio de color correspondiente a la dosis de energía recibida. De éste modo puede conocerse cuando el proceso de desinfección ha sido completado.
Moncayo-Lasso et al., 2012	<i>E. coli</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Fuente de fotones: luz solar simulada pH 5 Matrices: a) 10 mg L <sup>-1</sup> resorcinol y b) 10 mg L <sup>-1</sup> hidroquinona [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=60 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=1 mg L <sup>-1</sup> <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i> : En ausencia de compuestos orgánicos: TLD: 40 min. En presencia de compuestos orgánicos: descenso de 4-log en 40 min	- Estudiaron el efecto de la degradación de compuestos orgánicos en presencia de bacterias y viceversa. - Los resultados mostraron un porcentaje mayor de degradación en ausencia de bacterias y un porcentaje mayor de inactivación en ausencia de materia orgánica. - Demostraron que el proceso foto-Fenton es menos sensible que la fotocatalisis heterogénea con TiO <sub>2</sub> a la presencia simultánea de bacterias y compuestos orgánicos.
Polo-López et al., 2012	<i>Fusarium solani</i>	Fuente de fotones: luz solar Matriz: efluente simulado de EDAR Fusarium: aislada del agua de lluvia sobre el río Andarax [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ]=5 mg L <sup>-1</sup> Inactivación: C <sub>0</sub> =10 <sup>3</sup> UFC mL <sup>-1</sup> / C <sub>f</sub> = 20 UFC mL <sup>-1</sup> tras 5 h	- Primera vez que se evalúa el proceso de inactivación de <i>F. solani</i> mediante foto-Fenton usando como matriz un efluente simulado de EDAR.
Bandala et al., 2012	Huevos de helmintos	Fuente de fotones: Luz solar Matriz: Agua desionizada [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=280 mM; [Fe <sup>2+</sup> ]=10 mM Inactivación >5-log	- Se desarrolla un indicador dosimétrico ( <i>Acid orange 24</i> ) que proporciona un cambio de color correspondiente a la dosis de energía recibida. De éste modo se puede conocer cuando el proceso de desinfección se ha completado.

Tabla 1.8. Continuación.

Autores, año	Microorganismo	Inactivación más rápida alcanzada mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro	Aportaciones, conclusiones relevantes
Klammerth <i>et al.</i> , 2012	Bacterias totales Coliformes totales	Fuente de fotones: luz solar. Matriz: EDAR; Reactor tipo CPC [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=50 mg L <sup>-1</sup> ; 0.1 mM de Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> + [EDDS] = 0.2 mM <i>Bacterias totales</i> : 2-log <i>Coliformes totales</i> : 3-log	- Realizan la complejación del hierro mediante ácido etilidiaminotetraacético lo cual favorece la solubilización del hierro a pH neutro. - La capacidad de foto-Fenton con EDDS no es lo suficientemente fuerte como para frenar el crecimiento de las bacterias debido a la alta carga de materia orgánica presente en el agua.
García-Fernández <i>et al.</i> , 2012	<i>E. coli</i> <i>F. solani</i>	Fuente de fotones: luz solar <i>Matriz agua destilada</i> A) [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ] =5 mg L <sup>-1</sup> <i>E. coli</i> : TLD en 10 min B) [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=5 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ] =2.5 mg L <sup>-1</sup> <i>Fusarium</i> : TLD en 180 min	- Este trabajo muestra por primera vez el exitoso tratamiento de agua contaminada con <i>F. solani</i> mediante el proceso foto-Fenton. - <i>E. coli</i> es más sensible al tratamiento que <i>F. solani</i> .
Rodríguez-Chueca <i>et al.</i> , 2012	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar simulada [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=20 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ] =5 mg L <sup>-1</sup> ; pH5 A) Matriz: agua destilada Inactivación 2.43-log B) Matriz: efluente simulado de EDAR Inactivación 5.81-log	- Diseño experimental factorial del que se concluye que: ◦ La irradiación es el factor más influyente en la inactivación de <i>E. coli</i> . ◦ La composición de la matriz tiene un marcado efecto en la inactivación. - Se obtiene un modelo empírico reducido que permite describir la inactivación de <i>E. coli</i> .
Ndounla <i>et al.</i> , 2013	* Coliformes totales/* <i>E. coli</i> * <i>Salmonella spp</i>	Matriz: Agua de pozo [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=8.5 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] =0.6 mg L <sup>-1</sup> Hierro natural del agua = 0.07 mg L <sup>-1</sup> a) pH 6.3. Reactor 90 mL. Luz solar artificial: C. totales/ <i>E. coli</i> : TLD: 120 min <i>Salmonella spp</i> : TLD: 90 min b) pH 6.3. Botellas PET 1.5 L. Luz solar: Coliformes totales/ <i>E. coli</i> : TLD: 90 min <i>Salmonella spp</i> : TLD: 90 min	- El hierro natural contenido en el agua (0.07 mg L <sup>-1</sup> ) fue suficiente para llevar a cabo el proceso foto-Fenton dando lugar a una inactivación total. - La adición de sales de hierro no tuvo un efecto de mejora en la inactivación bacteriana por foto-Fenton

Tabla 1.8. Continuación.

Autores, año	Microorganismo	Inactivación más rápida alcanzada mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro	Aportaciones, conclusiones relevantes
Rodríguez-Chueca <i>et al.</i> , 2013	* <i>Enterococcus faecalis</i> , * <i>P. aeruginosa</i> y * <i>E. coli</i>	pH 5 Fuente de fotones: luz solar simulada Matriz: efluente de EDAR alimentado con agua sintética [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=25mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>3+</sup> ]=15 mg L <sup>-1</sup> foto-Fenton solar previo tratamiento del agua con coagulación, floculación y decantación (CFD) <i>E. coli</i> : TLD: 4.61-log en 210 min <i>P. aeruginosa</i> : TLD: 210 min <i>E. faecalis</i> : 5.64-log en 210 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El proceso CFD/foto-Fenton demostró ser más efectivo que el tratamiento foto-Fenton/CFD.</li> <li>- Se demostró un efecto sinérgico entre el proceso CFD y el proceso foto-Fenton.</li> <li>- Las bacterias Gram-negativas (<i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>) son más sensibles al tratamiento que las bacterias Gram-positiva (<i>E. faecalis</i>)</li> </ul>
Agulló-Barceló <i>et al.</i> , 2013	* <i>E. coli</i> , *esporas de <i>clostridia</i> * <i>Colifagos somáticos</i> y * <i>bacteriófagos ARN F-específicos</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactor tipo CPC Matriz: EDAR [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=20mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ]=10 mg L <sup>-1</sup> <i>E. coli</i> : TLD: 150 min Bacteriófagos F-ARN: TLD: 210 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primer trabajo donde se lleva a cabo procesos de foto-oxidación avanzada empleando indicadores virales y esporas de clostridia naturales del agua residual.</li> </ul>
Polo-López <i>et al.</i> , 2013	<i>Phytophthora capsici</i>	Fuente de fotones: luz solar Matriz: Agua destilada [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+/3+</sup> ]=5 mg L <sup>-1</sup> Foto-Fenton con Fe <sup>2+</sup> : TLD 180 min Foto-Fenton con Fe <sup>3+</sup> : TLD 120 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ponen de manifiesto la relevancia de la fuente de hierro empleada.</li> <li>- La inactivación mediante foto-Fenton de <i>P. capsici</i> es más rápida usando nitrato férrico como fuente de hierro en lugar de sulfato férrico.</li> </ul>

Tabla 1.8. Continuación.

Autores, año	Microorganismo	Inactivación más rápida alcanzada mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro	Aportaciones, conclusiones relevantes
Nieto-Juárez et al., 2013	Virus MS2	Fuente de fotones: luz solar simulada Matriz: solución tampón de carbonato [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=1.7 mg L <sup>-1</sup> ; [hidróxidos de hierro]=200 mg L <sup>-1</sup> (α-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe(OH) <sub>3</sub> ; α-FeOOH, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) Mejor desinfección: 4-log con Fe(OH) <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las partículas de hidróxidos de hierro combinan la eliminación física de virus con la inactivación de virus.</li> <li>- De las partículas estudiadas Fe(OH)<sub>3</sub> es la más efectiva en la inactivación de MS2.</li> </ul>
Rubio et al., 2013	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: UV <sub>254</sub> y hv>290 nm Matrices: Agua miliQ, agua de lago y agua de mar simulada. [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ]=1 mg L <sup>-1</sup> TLD: 65 min en agua miliQ y hv>290 nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El efecto beneficioso de la materia orgánica disuelta no es apreciado en el proceso foto-Fenton con luz UV<sub>254</sub></li> <li>- El ión bicarbonato compite por los radicales hidroxilo generados desfavoreciendo el proceso foto-Fenton</li> </ul>
Teodoro et al., 2014	<i>P. aeruginosa</i>	Fuente de fotones: UV <sub>254</sub> Matriz: aguas grises pre-tratada en humedal [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=150 mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ]=10 mg L <sup>-1</sup> TLD: 20 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene más efecto en la inactivación que el ajuste de pH.</li> </ul>
Ndounla et al., 2014	* Coliformes totales/* <i>E. coli</i> * <i>Salmonella</i> spp	Fuente de fotones: luz solar Reactor tipo CPC Matriz: Agua de pozo [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10mg L <sup>-1</sup> ; hierro natural del agua = 0.01 mg L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+/3+</sup> y 0.23 mg L <sup>-1</sup> de óxidos de Fe Coliformes totales/ <i>E. coli</i> , TLD: 30 min <i>Salmonella</i> spp: TLD: 45 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La irradiación solar (y no la dosis) tiene una influencia significativa durante el proceso foto-Fenton.</li> <li>- Se estudia el efecto del pH y de la concentración de nitratos.</li> <li>- La actividad redox de los compuestos de nitrógeno lleva a aumentar la concentración de nitrito y también se observan variaciones importantes para el nitrito y amoniaco.</li> </ul>

Tabla 1.8. Continuación.

Autores, año	Microorganismo	Inactivación más rápida alcanzada mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro	Aportaciones, conclusiones relevantes
Rodríguez-Chueca <i>et al.</i> , 2014	<i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactores tipo CPC Matriz: Efluente simulado y real de EDAR [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=50mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ]=10 mg L <sup>-1</sup> <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> : efluente de EDAR 3-log en 3.5 h y en efluente simulado de EDAR 6-log en 2.5 h pH=5	- <i>E. faecalis</i> muestra una resistencia mayor que <i>E. coli</i> a los tratamientos de desinfección.
Ruiz-Aguirre <i>et al.</i> , 2014	<i>Clostridium sp</i>	Fuente de fotones: luz solar simulada Reactor tipo CPC Matriz: EDAR [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=20mg L <sup>-1</sup> ; adiciones hasta un total de 140 mg L <sup>-1</sup> ; Fe <sup>2+</sup> =10 mg L <sup>-1</sup> pH=4	- Primera vez que se realiza la combinación de destilación por membranas y proceso foto-Fenton
Ndounia <i>et al.</i> , 2014	*Coliformes totales/* <i>E. coli</i> * <i>Salmonella spp</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactor tipo CPC Matriz: Agua de pozo [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10mg L <sup>-1</sup> ; hierro natural del agua = 0.01 mg L <sup>-1</sup> Coliformes totales/ <i>E. coli</i> , TLD: 1h <i>Salmonella spp</i> : 1-log de reducción en 240 min	- Estudia el efecto de la dilución por agua de lluvia en el proceso foto-Fenton - Estudia el efecto de la concentración de bicarbonatos en la evolución del pH
Polo-López <i>et al.</i> , 2014	<i>Fusarium sp.</i>	Fuente de fotones: luz solar Reactor tipo CPC No se alcanzan inactivaciones significativas	- Se evaluó la eficiencia del proceso a pH 3 utilizando como fuentes de hierro sulfato ferroso y nitrato férrico. - Se concluyó que el Fe <sup>2+</sup> es la mejor opción para la inactivación de <i>Fusarium</i>
Giannakis <i>et al.</i> , 2015	<i>E. coli</i>	Fuente de fotones: luz solar simulada Matriz: Efluente simulado de EDAR [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=10mg L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ]=1 mg L <sup>-1</sup> TLD: 4 h	- Primera vez que se combinan la sonicación y el proceso foto-Fenton

\*Microorganismos propios de la matriz acuosa.



# CAPÍTULO 2

---

## OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL





## 2. OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL

### 2.1. Objetivos

#### 2.1.1. Objetivos generales

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar la desinfección de aguas depuradas mediante foto-Fenton solar a pH neutro para su aplicación como tratamiento terciario en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). En particular, el trabajo experimental se centra en analizar la inactivación de *E. faecalis* y de aquellas bacterias entéricas encontradas comúnmente en las aguas residuales, como *E. coli* y coliformes totales. Además en este estudio se profundiza en la inactivación de un virus modelo, el MS2, como prototipo representativo de virus entérico al compartir propiedades y características fundamentales.

La experimentación se ha desarrollado en reactores tanque agitado (0.1, 0.25 y 1 L) y, posteriormente, se ha aumentado la escala a fotorreactores solares piloto de 7 L de capacidad equipados con captadores solares tipo CPC. Se ha estudiado el efecto de los principales factores que afectan al proceso foto-Fenton como son la temperatura, irradiancia solar, pH, la concentración de hierro disuelto, la concentración de peróxido de hidrógeno y la composición de la matriz acuosa. Para el estudio de este último, se han utilizado diversas matrices: disolución salina de cloruro de sodio, disolución salina con resorcinol (modelo de materia orgánica natural), agua depurada sintética que simula el efluente de un tratamiento biológico de una estación depuradora de aguas residuales, y agua depurada real obtenida del decantador secundario de una EDAR. Para una mejor comprensión del proceso se ha llevado a cabo un análisis sobre el estado del arte, se han investigado experimentalmente los diferentes factores involucrados en la desinfección de agua mediante el tratamiento foto-Fenton solar a pH neutro: luz solar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luz solar/Fe<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> y se ha determinado la cinética de inactivación bacteriana. Finalmente, se propone una interpretación mecanística con las posibles rutas implicadas en la inactivación del virus MS2 en presencia de Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radiación solar y materia orgánica, basándose en los resultados experimentales obtenidos y una profunda revisión bibliográfica.

### 2.1.2. Objetivos específicos

Los objetivos generales de esta tesis pueden especificarse en los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el efecto de la temperatura en la velocidad de inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton a pH neutro.
2. Evaluar la influencia de la presencia de un modelo de materia orgánica natural (resorcinol) durante el proceso de desinfección de *E. faecalis* mediante Fenton y foto-Fenton solar a pH neutro.
3. Estudiar el efecto de diferentes tipos de matrices en el proceso foto-Fenton solar a pH neutro sobre la cinética de inactivación de *E. faecalis*.
4. Estudiar el efecto de la intensidad de radiación UV y de la dosis de energía acumulada en la velocidad de inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro.
5. Evaluar la capacidad bactericida del proceso foto-Fenton solar a pH neutro sobre bacterias naturales (*E. coli* y coliformes totales) presentes en aguas depuradas procedentes del decantador secundario de una EDAR. Asimismo, se pretende determinar si los valores de los parámetros microbiológicos del agua tratada mediante foto-Fenton cumplen con los requisitos exigidos en la legislación vigente en materia de utilización del agua regenerada.
6. Reducir el tiempo de inactivación de bacterias naturales en efluentes de EDAR mediante foto-Fenton solar a pH neutro empleando diferentes estrategias de operación como el incremento de las concentraciones de reactivos o la reducción de sustancias captadoras de especies oxidantes.
7. Estudiar la influencia de la variabilidad estacional del efluente secundario de EDAR (recogido durante los meses de invierno y otoño de un mismo año) en la inactivación de bacterias naturales mediante foto-Fenton solar a pH neutro.
8. Evaluar la eficiencia del proceso foto-Fenton solar a pH neutro en la desinfección de aguas que contienen virus (MS2). Estudiar la aplicabilidad del proceso en aguas contaminadas reales llevando a cabo la inactivación de un tipo de virus humano (*Echovirus*) y en una matriz de agua natural (agua de lago).
9. Proponer un modelo de interpretación para los mecanismos y las posibles rutas implicadas en la inactivación del virus MS2 en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , radiación solar y materia orgánica.

## 2.2. Plan de trabajo

Para la consecución de los objetivos enumerados en la sección anterior, ha sido necesario llevar a cabo el plan experimental que se detalla a continuación:

### Objetivo 1

El estudio del efecto de la temperatura en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro se llevó a cabo en un simulador solar y empleando un baño termostatzado con el fin de mantener constantes intensidad de radiación ( $32 \text{ W m}^{-2}$ ) y temperatura, respectivamente. El sistema experimental consiste en un reactor tubular de vidrio borosilicatado de 120 mL de volumen iluminado y 240 mL de volumen total. Las concentraciones de reactivos utilizadas fueron  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . En todos los ensayos se llevaron a cabo medidas en discontinuo de las concentraciones de peróxido de hidrógeno, hierro y bacteria. Con estas condiciones experimentales:

- i) Se evaluó el efecto aislado de las siguientes variables: luz solar,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y el efecto combinado de: luz solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , luz solar/ $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  (Fenton) a  $20^\circ\text{C}$ .
- ii) Se analizó la inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso de foto-Fenton a pH neutro a tres concentraciones diferentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 20, 70 y  $120 \text{ mg L}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .
- iii) Se estudió la evolución de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y *E. faecalis* durante el proceso foto-Fenton a pH neutro a cuatro temperaturas diferentes: 10, 20, 30 y  $40^\circ\text{C}$ .

### Objetivo 2

Para evaluar el efecto de la presencia de un modelo de materia orgánica natural en el proceso de desinfección de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro se trabajó con radiación solar natural en reactores tanque agitado de 250 mL de vidrio borosilicatado. Como modelo de materia orgánica se utilizó  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de resorcinol. En todos los experimentos se siguieron las concentraciones de peróxido de hidrógeno, hierro, bacteria y resorcinol. Los ensayos llevados a cabo fueron:

- i) Efecto de los procesos: luz solar, luz solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (10, 20 y  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) y luz solar/ $\text{Fe}^{2+}$  (2.5, 5 y  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) en presencia y ausencia de resorcinol.
- ii) Proceso Fenton a dos niveles de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 5/2.5 y 50/20  $\text{mg L}^{-1}$  en presencia y ausencia de resorcinol.
- iii) Proceso foto-Fenton en presencia y ausencia de resorcinol a cuatro niveles de concentración  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 5/2.5, 10/5, 20/10 y 50/20  $\text{mg L}^{-1}$ .

- iv) Proceso foto-Fenton con una relación de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  de 10/5  $\text{mg L}^{-1}$  a cuatro concentraciones diferentes de resorcinol: 10, 20, 30 y 40  $\text{mg L}^{-1}$ .

### Objetivo 3

Para el estudio del efecto de diferentes tipos de matrices en el proceso de inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro, y con el fin de operar en condiciones más cercanas a la realidad, la experimentación se realizó en una planta piloto con fotorreactores tipo CPC y un volumen de trabajo de 7 L. Las concentraciones de reactivos utilizadas fueron 50  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 20  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . En todos los ensayos se llevaron a cabo medidas en discontinuo de las concentraciones de peróxido de hidrógeno, hierro y bacterias y en continuo de pH, oxígeno disuelto, temperatura e irradiancia. Adicionalmente se midió la concentración de resorcinol durante cada experimento donde este compuesto estaba presente. El COD del agua simulada sintética fue de 20  $\text{mg L}^{-1}$ . Los ensayos llevados a cabo fueron:

- i) Inactivación de *E. faecalis* mediante luz solar, luz solar/ $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  (Fenton) usando disolución salina como matriz acuosa.
- ii) Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro en disolución salina (0.9% NaCl).
- iii) Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro en disolución salina (0.9% NaCl) con 10  $\text{mg L}^{-1}$  de COD aportados por resorcinol.
- iv) Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro en efluente simulado de EDAR.

### Objetivo 4

Para el estudio del efecto de la intensidad de radiación UV y la dosis de energía acumulada en la velocidad de inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro se trabajó paralelamente con cuatro reactores de vidrio borosilicatado encamisados tipo tanque agitado de 1L con radiación solar natural. La temperatura de trabajo se mantuvo constante a 25 °C y se empleó un efluente sintético de EDAR como matriz acuosa. Las concentraciones de reactivos fueron 50  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 20  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . En todos los ensayos se llevaron a cabo medidas en discontinuo de las concentraciones de peróxido de hidrógeno, hierro y bacteria. En estas condiciones los ensayos realizados fueron:

- i) Proceso foto-Fenton a pH neutro a cuatro niveles de irradiancia: 10, 20 y 30  $\text{W m}^{-2}$ .

- ii) Proceso foto-Fenton a pH neutro a diferentes dosis de energía acumulada: 0.7, 1.4, 1.8, 2.5, 3.2 y 3.7 kJ L<sup>-1</sup>.

#### Objetivo 5

Con el objetivo de evaluar la capacidad bactericida del proceso foto-Fenton solar en efluentes de una EDAR urbana, se analiza la concentración de *E.coli* y coliformes totales durante el tratamiento. Los ensayos se llevan a cabo en dos fotorreactores gemelos tipo CPC de 7 L cada uno. Las concentraciones de reactivos utilizadas fueron 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>. En todos los ensayos se llevaron a cabo medidas en discontinuo de las concentraciones de peróxido de hidrógeno, hierro, COD y bacterias y en continuo de pH, temperatura e irradiancia.

- i) En primer lugar se evaluó el efecto aislado de los diferentes factores involucrados en la desinfección mediante foto-Fenton solar a pH neutro, es decir, luz solar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup>, y el efecto combinado de luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luz solar/Fe<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Fe<sup>2+</sup> (Fenton).
- ii) Se realizó simultáneamente una comparación de los tratamientos luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y foto-Fenton solar en la inactivación bacteriana en efluentes reales.
- iii) Para evaluar el cumplimiento de la legislación española vigente en materia de utilización de aguas regeneradas se estudiaron adicionalmente la presencia de *Legionella spp.* y huevos de nematodos en el agua residual antes y después de su tratamiento mediante foto-Fenton.

#### Objetivo 6

Bajo las mismas condiciones experimentales citadas para la consecución del objetivo 4 se analizan diferentes estrategias para acortar el tiempo de tratamiento para la desinfección de bacterias naturales del efluente secundario de EDAR mediante foto-Fenton solar a pH neutro llevando a cabo los experimentos i) e ii) simultáneamente:

Estrategia 1. Estudiar el efecto de la adición de hierro durante el proceso de foto-Fenton:

- i) Foto-Fenton solar a pH neutro con tres adiciones secuenciales de hierro: una inicial de 20 mg L<sup>-1</sup> y otras dos de 10 mg L<sup>-1</sup> cada una a los 5 y 10 min respectivamente desde el comienzo del experimento.
- ii) Foto-Fenton solar a pH neutro con una única adición inicial de hierro de 20 mg L<sup>-1</sup> al comienzo del experimento.

Estrategia 2. Evaluar la eficiencia de foto-Fenton al utilizar una mayor concentración de peróxido de hidrógeno en los procesos:

- i) Luz solar/100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ii) Foto-Fenton solar a pH neutro con 100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>.

Estrategia 3. Reducir la cantidad de sustancias captadoras de especies oxidantes, reduciendo la concentración natural de bicarbonato presente en el efluente de EDAR:

- i) Foto-Fenton solar a pH neutro usando como matriz el efluente secundario de EDAR según fue recogido con una concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 250 mg L<sup>-1</sup>.
- ii) Foto-Fenton solar a pH neutro usando como matriz el mismo efluente pero reduciendo la concentración inicial de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a 100 mg L<sup>-1</sup> con ácido concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

#### Objetivo 7

En las mismas condiciones experimentales del objetivo 4 se estudia la influencia de la variabilidad estacional del efluente recogido de la EDAR. Para ello, se evalúa la inactivación bacteriana mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro en los efluentes recogidos durante los meses de invierno y otoño de un mismo año.

#### Objetivo 8

Para evaluar la capacidad del proceso foto-Fenton solar a pH neutro en la inactivación del virus MS2 como indicador de contaminación viral entérica y estudiar la aplicabilidad del proceso en sistemas reales utilizando virus humano y una matriz de agua natural, se trabajó en reactor tanque agitado de 100 mL. Para evitar variaciones en la radiación se empleó un simulador solar y la temperatura permaneció constante durante todo el proceso (33 °C). Los ensayos se realizaron en agua desionizada con una disolución tampón de carbonato (pH = 8). Los ensayos realizados fueron los siguientes:

- i) Efecto aislado (luz solar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+/3+</sup>) y combinado (luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luz solar/Fe<sup>2+/3+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Fe<sup>2+/3+</sup> (Fenton)) de los diferentes factores involucrados en la desinfección de virus mediante foto-Fenton solar a pH neutro. Las concentraciones de reactivos utilizadas fueron 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+/3+</sup> y una irradiancia UV-A (I<sub>UV</sub>) de 30 W m<sup>-2</sup>.
- ii) Estudio del proceso luz solar/Fe<sup>3+</sup>:
  - a. Luz solar (15, 30 y 45 W m<sup>-2</sup> de I<sub>UV</sub>)/Fe<sup>3+</sup> (1 mg L<sup>-1</sup>)



- b. Luz solar ( $30 \text{ W m}^{-2}$  de  $I_{UV}$ )/ $\text{Fe}^{3+}$  (0.1, 0.5 y  $1 \text{ mg L}^{-1}$ )
- iii) Estudio del proceso foto-Fenton a pH cercano al neutro:
  - a. En función de la irradiancia UV-A aplicada:  $I_{UV}$  (15, 30 y  $45 \text{ W m}^{-2}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $\text{Fe}^{3+}$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ )
  - b. En función de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $I_{UV}$  ( $30 \text{ W m}^{-2}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1, 0.5 y  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $\text{Fe}^{3+}$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ )
  - c. En función de la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$ :  $I_{UV}$  ( $30 \text{ W m}^{-2}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $\text{Fe}^{3+}$  (0.1, 0.5 y  $1 \text{ mg L}^{-1}$ )
  - d. En función del pH: pH (6, 7 y 8),  $I_{UV}$  ( $30 \text{ W m}^{-2}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $\text{Fe}^{3+}$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ )
- iv) Estudio de los siguientes procesos utilizando agua natural de lago como matriz: Luz solar, luz solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , luz solar/ $\text{Fe}^{3+}$  y foto-Fenton. Las concentraciones de reactivos utilizadas fueron  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+/3+}$  y una  $I_{UV}$  de  $30 \text{ W m}^{-2}$ .
- v) Proceso foto-Fenton en la desinfección de un virus humano, *Echovirus* con las concentraciones de reactivos empleadas en el apartado iv).



# CAPÍTULO 3

---

## MATERIALES Y MÉTODOS





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Microorganismos

##### 3.1.1. *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* es una bacteria Gram-positiva, del género *Enterococcus* que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Es muy resistente a condiciones adversas, por lo que resulta apropiada como modelo de microorganismo indicador de la contaminación fecal de un agua residual.

##### 3.1.1.1. Preparación del stock de *E. faecalis*

La bacteria *E. faecalis* (CECT 5143) se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Se toman alícuotas de 50 µL del liófilo resuspendido en medio Luria-Bertani (LB) que se incorporan en matraces de 25 mL con 5 mL de medio LB. Los matraces se mantienen durante 24 h a 37 °C con agitación continua de 150 rpm aportada por un agitador orbital (Titramax 100, Heidolph, Alemania). Tras la incubación, se plaquean 100 µL del cultivo en placas Petri conteniendo medio LB y agar y se vuelve a incubar a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se recoge el césped bacteriano con un asa de siembra y se deposita en un vial estéril con 25 cuentas o perlas de criogenización que contienen un crio-conservante hipertónico para el almacenamiento a largo plazo de cultivos (Cryo-beads AEB400100, AES Chemunex). Los viales se agitan durante 15 min para favorecer la adhesión de las bacterias en la superficie de las cuentas. Los viales con el stock de *E. faecalis* se conservan en congelador a -70 °C. Para recuperar el stock, se descongela un vial progresivamente hasta temperatura ambiente y se escoge una perla, que es sembrada por rastreo en una placa Petri (con medio comercial Streptococcus Selective Broth media, Biolife, 30.6 g L<sup>-1</sup> y agar bacteriológico, 15 g L<sup>-1</sup>) donde tras 24 h de incubación a 37 °C crecerán colonias aisladas. Esta placa stock, debidamente conservada, se usa durante 15 días para preparar el cultivo de *E. faecalis* necesario para cada ensayo.

##### 3.1.1.2. Preparación del inóculo de *E. faecalis*

Se toma una colonia de la placa stock obtenida (sección 3.1.1.1.) y se inocula un matraz de 50 mL que contiene 14 mL del medio comercial Streptococcus Selective (30.6 g mL<sup>-1</sup>, Biolife) a una temperatura de incubación de 37 °C y una agitación constante (150 rpm) durante 24 h. *E. faecalis* se recupera en su fase estacionaria mediante centrifugación a 908 xg durante 10 min.

Posteriormente, el pellet se lava tres veces con una disolución de cloruro de sodio al 0.9 % p/v, (disolución salina) obteniendo finalmente una concentración de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Para cada ensayo, la concentración necesaria de bacteria se determina mediante la densidad óptica a 600 nm para obtener una concentración inicial en el reactor de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. El volumen de inóculo requerido se añade a la matriz acuosa correspondiente en cada caso. Todos los experimentos se llevan a cabo con una concentración inicial entre  $10^5$ - $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Otros autores han demostrado que las pequeñas diferencias encontradas en las concentraciones iniciales no afectan a los resultados cinéticos en los ensayos de inactivación fotocatalítica (Sichel *et al.*, 2007). Todo el material y las soluciones se esterilizaron a 126 °C durante 120 min.

#### 3.1.1.3. Determinación de la concentración de *E. faecalis*

Las muestras tomadas durante los experimentos se enumeran usando el método descubierto en 1938 por Miles y Misra. Este método consiste en colocar la suspensión bacteriana en gotas de 20 µL sobre una placa Petri previamente dividida en sectores correspondientes a las diferentes diluciones seriadas realizadas de la muestra (Miles y Misra, 1938). Las gotas se dispersan en un área aproximada de 1.5-2 cm. Las placas se preparan previamente con el medio Streptococcus Selective (30.6 g mL<sup>-1</sup>, Biolife) y agar (15 g L<sup>-1</sup>). Las colonias se contabilizan después de 24 h de incubación a 37 °C. El límite de detección alcanzado con este método de conteo fue 17 UFC mL<sup>-1</sup>. Para cada muestra, cada dilución, se plaquea por triplicado. En las experimentaciones donde se estudia el efecto de la presencia de resorcinol y el efecto de la irradiancia en la inactivación de *E. faecalis* (capítulos 5 y 6), en aquellas muestras donde se estima que se alcanzará dicho límite de detección, se plaquean 100 µL de muestra bajando el límite de detección hasta 1 UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 3.1.2. Determinación de la concentración de microorganismos presentes en efluentes procedentes del tratamiento secundario de una EDAR (ESEDAR).

##### 3.1.2.1. *E. coli* y coliformes totales.

Los coliformes totales representan la existencia potencial de un amplio rango de microorganismos patogénicos (Sivaraja y Nagarajan, 2014). Entre las coliformes totales, *E. coli* es una bacteria Gram-negativa, del género *Escherichia*, habita el tracto gastrointestinal de humanos y es ampliamente utilizada como modelo de microorganismo indicador de la contaminación fecal de un agua residual.

En los ensayos realizados con efluentes reales, las colonias de *E. coli* y coliformes totales se aislaron del efluente secundario de la EDAR “El Bobar” (Almería). Las muestras se cuantifican

usando un método estándar de conteo con diluciones seriadas en el medio selectivo Chromocult (36.5 g L<sup>-1</sup>, Biolife). Este medio permite determinar simultáneamente tanto coliformes totales como *E. coli*. La identificación de coliformes, se basa en una enzima característica, β-D-galactosidasa (reacción salmón-GAL), dando lugar a que las colonias de coliformes presenten una coloración de salmón a roja. El sustrato X-glucuronido se utiliza para la identificación de β-D-glucuronidasa que es característica de *E. coli*, dando lugar a que las colonias de *E. coli* adquieran un color que va desde el azul oscuro al color violeta. Las colonias se cuentan después de 24 h de incubación a 37 °C. El límite de detección alcanzado con este método de conteo fue 1 UFC mL<sup>-1</sup>. Para evaluar un posible recrecimiento, las muestras se mantuvieron en oscuridad después del tratamiento y se sembraron para su posterior conteo después de un periodo de 24 h. En ningún caso se observó recrecimiento. Todos los procedimientos llevados a cabo para cada muestra se realizaron por triplicado.

#### 3.1.2.2. *Legionella spp.*

*Legionella spp.* es una bacteria Gram-negativa responsable de enfermedades como “la enfermedad del legionario” o la fiebre de Pontiac. Su infección se produce a través de la inhalación por vía aérea (Huang *et al.*, 2009) por lo que tiene especial importancia su eliminación en aguas residuales depuradas que van a ser distribuidas por aerosolización.

Para el análisis bacteriológico de la concentración de *Legionella spp.* se recogen 1.1 L de muestra y se reserva 0.1 mL para posteriormente sembrar directamente en placa. Se filtra 1 L de muestra en condiciones de esterilidad con filtros estériles de nylon de 0.45 μm. Se desecha el filtrado y el filtro se corta en cuatro trozos que se introducen en un bote estéril al que se le añaden 10 mL de disolución salina al 0.9% p/v. Por último, se sonica la mezcla de disolución salina con los filtros durante 4 min. Con esta mezcla se realizarán diferentes tratamientos: i) ningún tratamiento (siembra directa); ii) siembra directa filtrada; iii) choque ácido para el que se toma 1 mL de la muestra y se añade 1 mL de una solución pH 2 y se deja reposar 5 min y iv) choque térmico en el que se ponen unos mL de muestra en un baño a 50 °C durante 30 min. Tras los tratamientos se plaquean 0.1 mL de muestra en medio selectivo CYE al que se añade BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) que es un suplemento de hierro y L-Cisteína necesario para el crecimiento de *Legionella* y con ayuda de un asa Digirasky y un sembrador rotatorio se homogeneiza para después incubar a 37 °C.

Con la ayuda de una lupa microscópica se observan las placas a las 24 y 48 h y después cada 2 días. Cada día, se marcan en la tapa de todas las placas con un bolígrafo permanente de

diferentes colores rodeando las colonias con un círculo y se recogen 2 o 3 colonias de cada familia para estudiar si son positivas o negativas. Para ello, se usan placas con y sin BCYE. Se siembra la colonia en una y otra placa y si en 24 h no ha crecido en la placa con BCYE se cuenta como negativa para *Legionella spp.* Se cuentan las placas positivas y una vez contadas todas hasta el día 14 se escoge el método con mayor número de colonias positivas.

#### 3.1.2.3. Huevos de nematodos

Los nematodos juegan un papel importante en los sistemas de tratamiento de aguas residuales al contribuir a la eliminación de la concentración de la demanda bioquímica de oxígeno o bacterias fecales. Sin embargo, para la reutilización del agua, las regulaciones vigentes establecen su eliminación, puesto que representan un riesgo para la salud pública, siendo responsables de numerosas enfermedades como triquinosis, filariasis, anisakiasis, anquilostomiasis, ascariasis, estrogiloidiasis, toxocariasis, etc. Además, los nematodos parásitos de las plantas, pueden causar enfermedades en los cultivos y grandes pérdidas económicas en el sector agrícola (Santos *et al.*, 2014).

Para la búsqueda de huevos de nematodos en las muestras recogidas de un efluente secundario de una estación depuradora de aguas residuales (ESEDAR) se ha utilizado un microscopio óptico (Olympus Optical Co., CH2OBIMF200, Japón). Se emplea un volumen de agua de 1 L para el efluente de EDAR sin tratar y de 10 L después de ser sometido al tratamiento fotocatalítico. Una vez que el agua se decanta durante 2 h, se lava el pellet con reactivos surfactantes y se centrifuga a 630 g durante 15 min. El sobrenadante se elimina mediante aspersión con una bomba (Watson-Marlow, Sci-323) dejando un volumen de 50 mL en el envase contenedor. A continuación, se realizan sucesivas adiciones de búfer acético y di-etil-éter seguido de varias etapas de centrifugación hasta que se obtiene un sedimento claro. Posteriormente, se resuspende el sedimento en una disolución de sulfato de zinc para mantener los huevos en la superficie de la matriz acuosa. Finalmente, se observan las muestras al microscopio (10x) y se cuentan los huevos visualizados con la ayuda de una cámara McMaster.

#### 3.1.3. Colifago MS2

El bacteriófago MS2 es un virus ARN de cadena sencilla usado como modelo de virus entéricos debido a su similitud en tamaño y estructura (Havelaar *et al.*, 1993). El virus MS2 está formado por una cubierta de proteínas que sirve como protección al genoma viral. MS2 solo infecta a la bacteria *E. coli* a través de la proteína A que permite la adhesión al pili de la bacteria y, de este



modo, el virus inyecta su ARN en la bacteria (Valegard *et al.*, 1990). El colifago MS2 es un virus muy resistente puesto que su pequeño tamaño evita su eliminación mediante tratamientos físicos tales como sedimentación, coagulación y filtración (Thompson *et al.*, 2003; Symonds *et al.*, 2009).

#### 3.1.3.1. Preparación del stock de MS2

El colifago MS2 (DSMZ 13767) se adquirió de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). La propagación del colifago MS2 es un proceso largo que dura varios días:

Día 1: Se resuspende el vial contenido del vial original de MS2 con 1 mL de medio LB (10 g L<sup>-1</sup> de bacto triptona, 1 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 8 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 1 g L<sup>-1</sup> de D-glucosa, 0.3 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> y 2 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina), se agita y se plaquean al menos 15 diluciones para valorar la concentración de virus.

Día 2: En 1 L de medio LB se inoculan 5 mL de cultivo de *E. coli* y se incuba a 37 °C hasta que la densidad óptica del cultivo a 600 nm es 0.4. A continuación, se añaden 20 µL del vial con MS2 y se incuba nuevamente durante 5 h a 37 °C para permitir que el virus infecte a la bacteria. Después se añaden 5 mL de cloroformo, se mezcla bien y se conserva a 4 °C hasta el día siguiente.

Día 3: Se elimina el cloroformo del fondo con una pipeta Pasteur. Para eliminar los posibles restos de cloroformo se burbujea aire durante unos minutos. Posteriormente, el contenido de la botella se centrifuga durante 15 min a 4000 rcf. Una vez centrifugado, se recoge el sobrenadante y se añaden 100 g de polietilenglicol 6000 (10% p/v), 29.22 g de cloruro sódico y se completa con agua hasta 1 L. Una vez agitado se mantiene durante la noche a 4 °C.

Día 4: Se centrifuga el contenido de la botella a 4939 *xg* durante 45 min. A continuación, se elimina el sobrenadante, se resuspende el pellet obtenido con 3-5 mL de tampón carbonato y se conserva a 4°C durante 2h. Pasado este tiempo, se centrifuga durante 7 min a 1000 *xg*. En esta ocasión, se toma el sobrenadante y se le añade cloroformo (5 mL por cada 50 mL de sobrenadante) y se centrifuga a 1952 *xg* durante 10 min. Se toma la fase acuosa que se encuentra en la parte superior con cuidado de no tocar la interfase y se eliminan los restos de cloroformo mediante burbujeo con aire. El volumen obtenido se distribuye en tubos Falcon 100 KDa Ultracell Centricon. Se centrifuga a 1952 *xg* durante 15 min y se lava tres veces con el tampón carbonato. Finalmente, se recoge el contenido de la parte superior del tubo (que

contiene el virus), se filtra con un filtro estéril de fluoruro de polivinilideno de 0.1  $\mu\text{m}$  y se transvasa a un tubo Eppendorf que se conserva a baja temperatura.

#### 3.1.3.2. Preparación del inóculo de MS2

Del stock de virus obtenido de la sección anterior, se recoge la cantidad necesaria para preparar una disolución madre del virus en tampón carbonato (0.1 mM  $\text{NaHCO}_3$  y 15 mM NaCl) a una concentración de  $10^8$  unidades formando placas (UFP)  $\text{mL}^{-1}$ . Esta disolución madre puede conservarse en el frigorífico durante una semana para emplear la cantidad necesaria para infectar los reactores en cada ensayo.

#### 3.1.3.3. Determinación de la concentración del colifago MS2

Se realizan diluciones seriadas de las muestras tomadas durante los experimentos en disolución de tampón carbonato. A continuación, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la muestra problema y 100  $\mu\text{L}$  del inóculo de *E. coli* (sección 3.1.3.5) en tubos previamente preparados que contienen 4 mL de medio LB semi sólido (10 g  $\text{L}^{-1}$  de bacto triptona, 1 g  $\text{L}^{-1}$  de extracto de levadura, 8 g  $\text{L}^{-1}$  de NaCl, 1 g  $\text{L}^{-1}$  de D-glucosa, 0.3 g  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , 2 mg  $\text{L}^{-1}$  de sulfato de estreptomicina y 5 g  $\text{L}^{-1}$  de agar). Posteriormente, se mezcla el contenido del tubo y rápidamente, para evitar la solidificación del medio, se vierte el contenido del tubo en una placa Petri previamente preparada con medio LB y agar (10 g  $\text{L}^{-1}$  de bacto triptona, 1 g  $\text{L}^{-1}$  de extracto de levadura, 8 g  $\text{L}^{-1}$  de NaCl, 1g  $\text{L}^{-1}$  de D-glucosa, 0.3 g  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , 2 mg  $\text{L}^{-1}$  de sulfato de estreptomicina y 15 g  $\text{L}^{-1}$  de agar). Una vez solidificado el medio, las placas se incuban a 37 °C durante una noche. Tras este tiempo, en la placa ha crecido un césped bacteriano (*E. coli*) en el que pueden observarse huecos o calvas, que son zonas donde la cepa bacteriana ha sido infectada por el virus. La concentración de MS2 infectiva se determina por conteo de calvas mediante el método de la doble capa de agar y se expresa como UFP  $\text{mL}^{-1}$ . El límite de detección alcanzado con este método de conteo es de 1 UFP  $\text{mL}^{-1}$ . Para cada muestra, cada dilución se siembra por duplicado.

#### 3.1.3.4. Preparación del stock de *E. coli* hospedadora de MS2

La bacteria hospedadora *E. coli* (DSMZ 5695) se adquirió de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Tras la rehidratación del inóculo liofilizado se extrae una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  y se plaquea en placas Petri (medio LB y agar). Se mantiene en incubación a 37 °C durante una noche. Una vez formadas las colonias se recoge una y se cultiva en 10 mL de medio LB a 37 °C en un matraz Erlenmeyer de 25 mL hasta que se observa crecimiento bacteriano. Posteriormente, se añaden otros 15 mL de medio LB

para obtener un volumen final de cultivo bacteriano de 25 mL. A continuación, se incuba a 37 °C en agitación (150 rpm) hasta que la densidad óptica del cultivo a 600 nm alcanza un valor de 0.2. En este punto se añaden 4.4 mL de glicerol estéril. Para finalizar, se guardan alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf y se almacena en congelador a -70 °C.

#### 3.1.3.5. Preparación del inóculo de *E. coli* hospedadora de MS2

Se toman 100 µL del stock en glicerol de *E. coli* (sección 3.1.3.4.) y se cultiva en 10 mL de medio LB a 37 °C en agitación (150 rpm) durante una noche. El cultivo obtenido se utiliza para la determinación de la concentración del virus MS2 (sección 3.1.3.3).

#### 3.1.4. Echovirus

*Echovirus* es un virus ARN que pertenece al género *Enterovirus* de la familia *Picornaviridae*. Los virus entéricos se excretan por las heces de individuos infectados y son transmitidos principalmente por vía fecal-oral a través del agua contaminada. De hecho, han sido detectados en numerosas muestras de agua (Maunula *et al.*, 2005; Gibbons *et al.*, 2010; Kamel *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2011; Tong y Lu, 2011).

El stock del virus humano *Echovirus 11* se produce por infección de un cultivo de células BGMK en medio suplementado con un 1% de glutamina, 50 µg de gentamicina por mL y un 10% (medio de crecimiento) o un 2% (medio de mantenimiento) de suero bovino fetal inactivado por calor. Los virus se liberan de las células por congelación y descongelación de los cultivos tres veces. Después, se aplica una etapa de centrifugación (3000 xg, 20 min) para eliminar los desechos celulares. Posteriormente, los virus se centrifugan a 34500 xg y el pellet obtenido se resuspende en una disolución búfer de fosfato sin realizar una purificación adicional. Finalmente, la suspensión viral se cuantifica y se almacena a 20 °C en alícuotas de 10 mL hasta su uso. La concentración de *Echovirus* infectivo se determina por el método del número más probable (Bosshard *et al.*, 2013) y se expresa como el número más probable de unidades citopáticas por mL (NMPUC mL<sup>-1</sup>). Cada dilución se determina 5 veces. El límite de detección obtenido por este método es de 13.3 NMPUC mL<sup>-1</sup>.

### 3.2. Tipos de matrices acuosas utilizadas en el trabajo experimental

#### 3.2.1. Medio isotónico

El medio isotónico empleado en el trabajo experimental ha sido la matriz de agua de referencia. El medio isotónico es una disolución salina compuesta por agua miliQ con un 0.9% p/v de NaCl que se usa para evitar que la falta de sales en el agua miliQ afecte a la viabilidad de las bacterias (Sichel *et al.*, 2007). Este agua es utilizada para evitar la interferencia de compuestos orgánicos e inorgánicos presentes de forma natural en otros tipos de aguas, y se suele utilizar en muchos tipos de trabajo microbiológico como solución iónica base. El agua miliQ utilizada se obtiene mediante un sistema de osmosis reversa (ARIUM 613L) que es capaz de suministrar 150 L de agua de alta calidad por hora.

#### 3.2.2. Agua enriquecida con resorcinol como modelo de materia orgánica

El resorcinol (benceno-1,3-diol) se seleccionó como modelo de materia orgánica puesto que es un compuesto que se encuentra presente en las aguas residuales debido a sus usos múltiples. Este compuesto se emplea en la elaboración de fármacos como antiséptico dermal, colorantes y, mayoritariamente, en la producción de resinas artificiales, que se utilizan como adherentes entre el tejido de acero y la goma en la producción de los neumáticos. Otros autores han demostrado que los intermedios de degradación del resorcinol tienen facilidad para formar complejos con el hierro y, por tanto, pueden favorecer la estabilidad de éste en disolución (Spuhler *et al.*, 2010). La concentración de resorcinol y la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) aportado por el compuesto se siguió analíticamente por cromatografía líquida de alta presión (sección 3.6.2) y un analizador de carbono orgánico total (sección 3.6.1), respectivamente.

#### 3.2.3. Agua simulada del efluente de una Estación Depuradora de Aguas Residuales

Con el fin de aumentar la complejidad de la matriz, se llevaron a cabo ensayos con un agua de composición similar a la del efluente del tratamiento secundario una EDAR urbana. El COD de esta agua sintética fue de 20 mg L<sup>-1</sup>, conteniendo 96 mg L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 7 mg L<sup>-1</sup> de NaCl, 60 mg L<sup>-1</sup> de CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 6 mg L<sup>-1</sup> de urea, 60 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 4 mg L<sup>-1</sup> de KCl, 4 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 32 mg L<sup>-1</sup> de peptona, 2 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 22 mg L<sup>-1</sup> de extracto de carne (Klamerth *et al.*, 2009; Polo-López *et al.*, 2012) con un pH=8. La ventaja del uso de aguas simuladas radica en su estabilidad, ya que la inactivación bacteriana puede verse afectada con

las fluctuaciones naturales en la composición química que se producen en las aguas de salida de las EDAR urbanas.

#### 3.2.4. Efluente del tratamiento secundario de EDAR (ESEDAR)

La inactivación de microorganismos entéricos se realiza en efluentes recogidos del decantador secundario de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales, llamada “El Bobar” y situada en Almería, España. Esta planta trata aguas residuales urbanas, tiene una capacidad de  $10^5$  habitantes-equivalentes y con un volumen de producción de  $11594704 \text{ m}^3 \text{ a}^{-1}$  de agua tratada. La EDAR “El Bobar” está diseñada para el tratamiento de las aguas residuales generadas en el término municipal de Almería desde la recepción hasta un nivel secundario. La línea de agua consta de las etapas de recepción y pretratamiento (desbaste, desarenado y desengrasado), adición de reactivos químicos para control de olores en la decantación primaria, tratamiento biológico mediante fangos activados y decantación secundaria. Las muestras recogidas se transportan en lotes de 20 L que se usan en el mismo día. Debido a la variación estacional, la media de los valores de los parámetros del efluente secundario de EDAR durante el periodo experimental (febrero 2012-febrero 2013) se muestra en la Tabla 3.1.

#### 3.2.5. Disolución de tampón carbonato (DTC)

Para los experimentos llevados a cabo con el modelo de virus humano (MS2) y el virus humano (*Echovirus 11*), la matriz acuosa utilizada es una disolución estéril de tampón carbonato compuesta por 0.1 mM  $\text{NaHCO}_3$  y 15 mM NaCl a pH 8.

#### 3.2.6. Agua natural de lago

La inactivación del colifago MS2 se ensaya en agua natural procedente del lago Lemán, Suiza. Las muestras de agua se recogen el día del experimento y se someten a un filtrado a vacío con un tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$  para eliminar la materia en suspensión y posteriormente se esterilizan para eliminar la presencia de otros microorganismos.

**Tabla 3.1.** Caracterización química y microbiológica del efluente real de EDAR (El Bobar, Almería, España). Muestras tomadas durante el periodo febrero 2012- febrero 2013.

Parámetro	Media	Máximo	Mínimo
pH	7.48 ± 0.33	8.34	7.08
Conductividad ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	1248 ± 166	1659	858
Turbidez (UNT)	8.98 ± 4.20	15.23	2.91
Carbono Orgánico Disuelto ( $\text{mg L}^{-1}$ )	23.78 ± 6.21	35.53	9.85
Bicarbonato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	399.45 ± 2.15	605.15	122.15
Bromo( $\text{mg L}^{-1}$ )	2.50 ± 0.43	2.76	0.67
Cloro ( $\text{mg L}^{-1}$ )	248.43 ± 40.92	268.66	216.87
Fluor ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$1.25 \cdot 10^{-2} \pm 0.27 \cdot 10^{-2}$	0.05	0
Nitrito ( $\text{mg L}^{-1}$ )	4.61 ± 1.30	14.69	0
Nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	5.43 ± 1.52	21.16	0
Sulfuro ( $\text{mg L}^{-1}$ )	89.71 ± 13.94	110.41	79.30
<i>E. coli</i> (UFC $\text{mL}^{-1}$ )	$1.16 \cdot 10^4 \pm 0.18 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^4$	$2.13 \cdot 10^2$
Coliformes Totales (UFC $\text{mL}^{-1}$ )	$3.24 \cdot 10^4 \pm 0.02 \cdot 10^4$	$6.12 \cdot 10^5$	$1.63 \cdot 10^3$

**Tabla 3.2.** Caracterización química del agua procedente del lago Lemán, Suiza. Media de tres muestras tomadas entre febrero y octubre 2002 (Rincón y Pulgarín, 2004b).

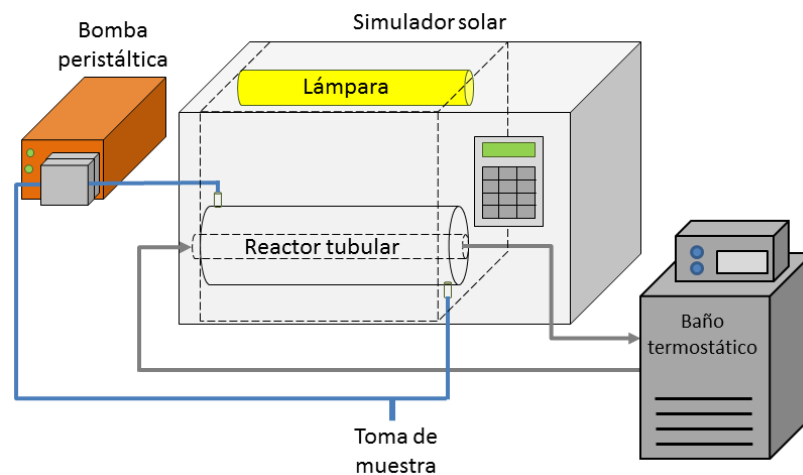
Parámetro	Valores	Unidades
Turbidez (UNT)	0.18	UNT
Conductividad at 20 °C	252	$\mu\text{S cm}^{-1}$
Absorbancia (254 nm)	1.079	–
pH	7.55	–
Cloruros	8.0	$\text{mg L}^{-1}$
Nitratos	2.7	$\text{mg L}^{-1}$
Sulfatos	48	$\text{mg L}^{-1}$
Hidrogenocarbonatos	107	$\text{mg L}^{-1}$
Carbono Orgánico Disuelto	0.8	$\text{mg L}^{-1}$
Aluminio	14	$\text{mg L}^{-1}$
Nitritos	0.002	$\text{mg L}^{-1}$
Amonio	0.001	$\text{mg L}^{-1}$

### 3.3. Descripción de los reactores

Los experimentos de desinfección se han llevado a cabo utilizando diferentes tipos de reactores, que se detallan a continuación:

#### 3.3.1. Reactor tubular

Para el estudio del efecto de la temperatura (Capítulo 4) el sistema experimental consiste en un reactor tubular de vidrio borosilicatado de tubos concéntricos. A través del tubo externo circula el líquido problema, que es recirculado mediante una bomba peristáltica con una velocidad de flujo de  $240 \text{ mL min}^{-1}$  (Figura 3.1). El tubo interno permite la circulación de agua con el fin de mantener la temperatura constante (10, 20, 30 o  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La temperatura se mantuvo controlada al valor seleccionado usando un baño termostático (Thermo Scientific NESLAB RTE7). El volumen total del reactor es de 140 mL, de los cuales 120 mL están iluminados. El sistema completo se irradia usando un simulador solar (sección 3.4.1).



**Figura 3.1.** Sistema experimental utilizado en el estudio del efecto de la temperatura en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro.

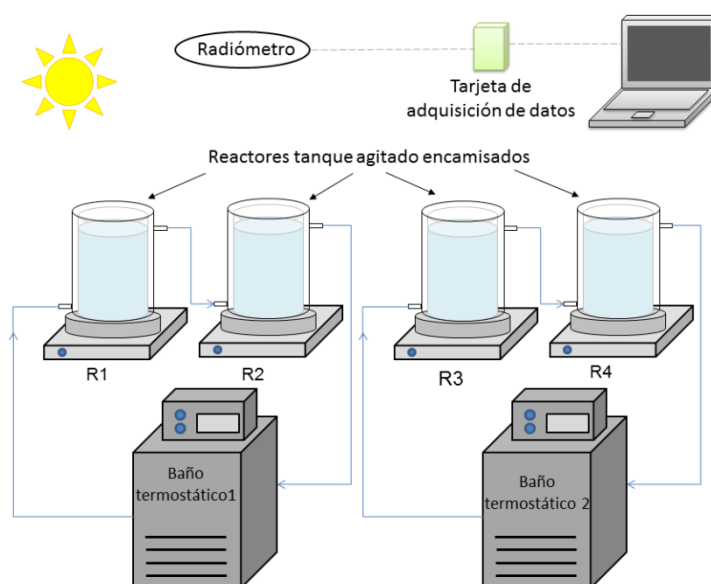
#### 3.3.2. Reactor tanque agitado

En el trabajo experimental se han utilizado reactores tipo tanque agitado de 0.1 y 0.25 L de vidrio borosilicatado DURAN (Schott, Alemania). El reactor de 0.1 L se utiliza en el estudio de la inactivación de virus (Capítulo 8) bajo la acción de radiación solar artificial y el reactor de 0.25 L en el estudio del efecto de la matriz (Capítulo 5) bajo radiación solar natural. Estos reactores presentan una transmisividad en el rango UV-A del 90 %, suficiente para la realización de los

experimentos fotocatalíticos. Los reactores se encontraban dispuestos sobre agitadores magnéticos, proporcionando la agitación necesaria (150 rpm) como para mantener una mezcla homogénea sin perjudicar la suspensión microbiana. El empleo de este tipo de reactor permite realizar experimentos de manera sencilla y simultánea. Además, como permite utilizar pequeños volúmenes de trabajo, se consigue economizar el coste de los experimentos.

### 3.3.3. Reactores tanque agitado encamisados

Para el estudio del efecto de la radiación en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro (Capítulo 6) se utilizan reactores de tanque agitado encamisados. Las características de estos reactores son las que se muestran en la sección anterior (3.3.2) siendo el volumen de trabajo de 1 L. El área iluminada de los reactores es de 0.025 m<sup>2</sup> y se determina mediante actinometría con ferrioxalato (Rios-Enriquez *et al.*, 2004). El encamisado permite mantener la temperatura constante durante el experimento mediante la recirculación de agua cuya temperatura se encuentra controlada mediante un baño termostático (Thermo Scientific NESLAB RTE7). Los experimentos se realizan con cuatro reactores encamisados lo que permite llevar a cabo experimentos de manera simultánea (Figura 3.2).

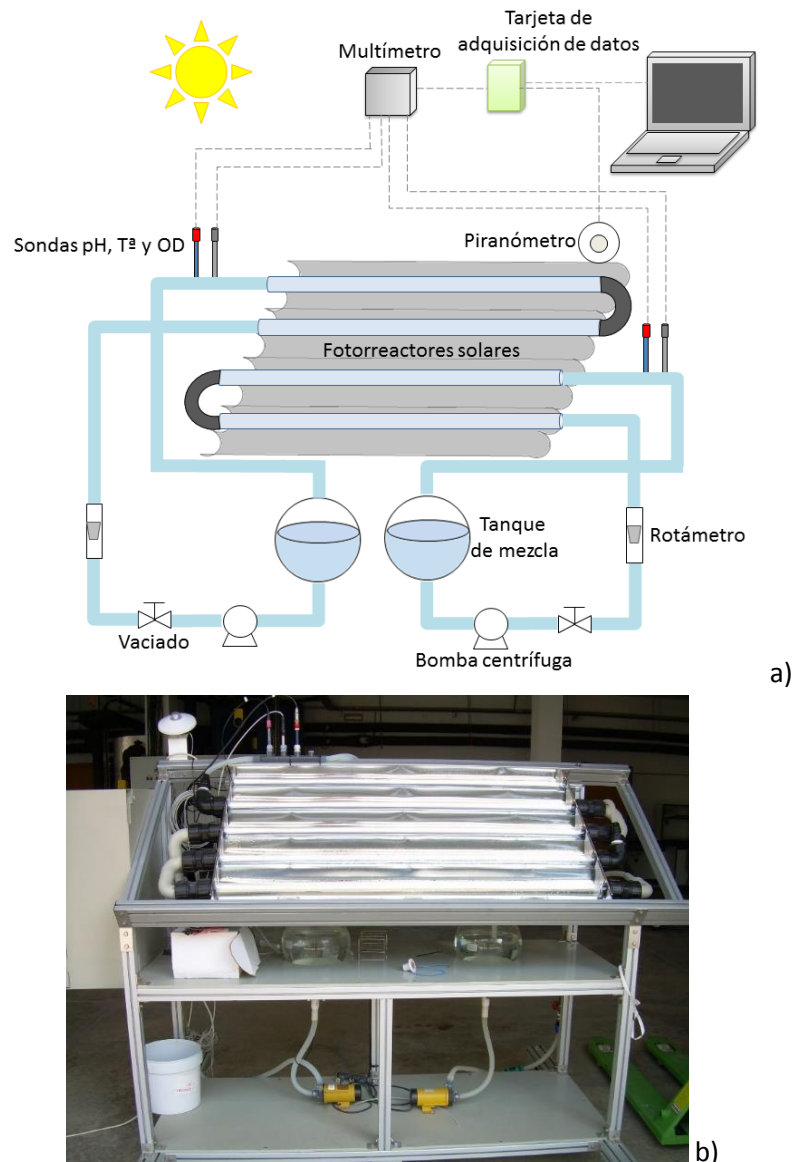


**Figura 3.2.** Montaje experimental utilizado en el estudio del efecto de la radiación en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro.



#### 3.3.4. Reactor solar CPC

Para los ensayos a escala piloto se ha diseñado y construido una planta para detoxificación y desinfección de aguas residuales (Figura 3.3). La planta está formada por dos lazos iguales conteniendo cada uno de ellos 2 fotorreactores tubulares compuestos por Captadores Parabólicos Compuestos (CPC) y tubos de vidrio PYREX. Los tubos de vidrio borosilicatado se encuentran dispuestos en el centro de espejos CPC y tienen las siguientes medidas: 50 mm de diámetro, 2.5 mm de espesor y 0.20 m<sup>2</sup> de superficie iluminada. Los módulos se encuentran orientados al sur e inclinados 37° sobre la horizontal (latitud local de Almería). El volumen utilizado en cada lazo es de 7 L siendo la superficie iluminada 2.35 L. La planta se carga con 7 L del agua matriz. El fluido se recircula desde el tanque de mezcla al reactor solar mediante una bomba centrífuga (PAN WORLD NH-40PX), manteniendo el líquido en circulación a una velocidad de flujo de 11 L min<sup>-1</sup> y un número de Reynolds de 30000, que implica un flujo turbulento en el interior del sistema que beneficia al tratamiento fotocatalítico. La planta dispone de sensores para la medida de la radiación UV-vis (DELTA LP UVA 02 model), el pH (CRISON 53 35), la temperatura y el oxígeno disuelto (CRISON 6050). El oxígeno disuelto es medido como porcentaje de saturación del aire (100%). Los datos son adquiridos por una tarjeta de adquisición de datos (LabJack U12) conectada a un ordenador (sección 3.6.8).



**Figura 3.3.** Planta de fotorreactores solares CPC. a) Esquema, b) Fotografía.

### 3.4. Fuentes de fotones utilizadas

#### 3.4.1. Luz solar artificial

La experimentación llevada a cabo en el estudio del efecto de la temperatura (Capítulo 4) y el estudio de la inactivación de virus (Capítulo 8), se realizan utilizando luz solar artificial generada mediante simuladores solares. En el primer caso, el simulador solar empleado es un SUNTEST CPS+ (ATLAS, Alemania) con un rango de emisión de  $250 - 765 \text{ W m}^{-2}$  (irradiancia total) y en el segundo caso, el simulador solar es un SUNTEST CPS (Heraeus, Alemania), ambos con una lámpara de Xenón NXe-1500B. En ambos simuladores se colocaron filtros de radiación infrarroja y UV-C para simular la radiación solar natural y evitar la influencia de la radiación UV-C y el

calentamiento térmico. La radiación UV-A se mide dentro de la cámara de la lámpara solar con un detector PMA2100 UV-A (Solar Light, E.E.U.U.) en el rango 320-400 nm.

#### 3.4.2. Luz solar natural

El resto de la experimentación se realiza utilizando como fuente de fotones la radiación solar natural. Los experimentos se llevan a cabo en el Centro de Investigación en Energía Solar (CIESOL) situado en la Universidad de Almería, Almería, España (latitud: 36°49'49.1"N, 2°24'26.0"W). En los experimentos realizados en los fotorreactores CPC bajo luz solar natural la radiación se mide mediante un piranómetro situado a la misma inclinación que los fotorreactores (37°). El piranómetro utilizado es de la compañía Delta OHM, modelo LP UVA 02 (Figura 3.4) cuya medida de irradiancia es el resultado de la suma de la radiación solar directa y difusa y proporciona datos en términos de  $W m^{-2}$  para longitudes de onda de 290 a 400 nm. Esta medida de energía promedio incidente por unidad de superficie es una aproximación válida cuando los tiempos empleados en los experimentos son suficientemente largos en comparación con los que se producen en las fluctuaciones de radiación. Durante la realización de los experimentos los datos de radiación UV se adquieren mediante una tarjeta de adquisición de datos y se almacenan en un ordenador para su uso posterior. Para los experimentos realizados en los reactores tanque agitado bajo luz solar natural, existe otro piranómetro de iguales características pero en posición horizontal. Todos los experimentos se realizan en días completamente soleados.



**Figura 3.4.** Piranómetro LP UVA 02 de Delta OHM utilizado para la medida de la radiación UV.

#### 3.5. Procedimiento experimental

Independientemente del tipo de reactor o fuente de radiación empleada, el procedimiento experimental llevado a cabo en todos los ensayos de esta tesis doctoral fue análogo. En primer lugar, y en condiciones de oscuridad, se llena el reactor con la matriz acuosa (se ajusta el pH si es

necesario) y se toma una muestra de control para verificar la ausencia previa de microorganismos tanto en el reactor como en el agua. A continuación, se inyecta el reactor con la suspensión de microorganismos cuya inactivación es objeto de estudio, excepto en los casos en los que la matriz empleada es un ESEDAR puesto que se evalúa la inactivación de los microorganismos propios de ésta. En este punto, y tras agitación, se recoge una muestra que determinará la concentración inicial del microorganismo en el reactor. Adicionalmente, se toma una muestra control que se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente y se siembra dos veces, una recién tomada y otra cuando el experimento finaliza. De este modo se comprueba la viabilidad de la bacteria sin haber sido expuesta a ningún tratamiento durante el mismo tiempo que dura el ensayo a realizar. Posteriormente, se adicionan los reactivos necesarios de cada ensayo; hierro y/o peróxido de hidrógeno. Tras la homogenización del sistema, se activa el sistema de adquisición de datos y los reactores se destapan y se exponen a la radiación solar en el caso de radiación solar natural o se enciende el simulador solar en el caso de la radiación solar artificial.

Durante el transcurso de los experimentos, se toman periódicamente muestras para el seguimiento de la concentración de microorganismos y reactivos mediante su determinación según las técnicas descritas en las secciones 3.1 y 3.6. Además, para analizar si posteriormente al tratamiento se ha producido algún recrecimiento, aquellas muestras en las que se alcanzó el límite de detección mediante el proceso foto-Fenton se guardan en oscuridad durante 24 h y se siembran. En ningún caso se observó recrecimiento a las 24 h.

Una vez finalizados los ensayos, se presta especial atención a la limpieza de los reactores, especialmente en los reactores CPC, para asegurar la ausencia de microorganismos o reactivos en la siguiente experimentación. Para ello, tras cada tratamiento se adiciona una alta concentración de peróxido de hidrógeno y se mantiene en agitación durante al menos 30 min, después se lava tres veces con agua destilada.

Finalmente, el proceso de desinfección se evalúa realizando los mismos ensayos fotocatalíticos en oscuridad. Para ello, los reactores de tanque agitado se cubren con papel de aluminio y los reactores CPC se tapan mediante una cubierta gruesa y opaca igual que durante la homogeneización del sistema previa a la exposición solar. De esta forma, se han observado los efectos de la agitación mecánica (en régimen de flujo turbulento) y de los reactivos empleados durante los ensayos sobre la viabilidad de los microorganismos.

### 3.6. Medidas analíticas

#### 3.6.1. Medida del Carbono Orgánico Disuelto (COD)

El COD se mide para evaluar el grado de mineralización de los compuestos orgánicos durante el proceso foto-Fenton y representa la cantidad de carbono en forma de  $\text{CO}_2$  generada cuando una sustancia orgánica es oxidada completamente. Corresponde con la fracción de carbono orgánico total (COT) que pasa a través de un filtro de tamaño de poro  $0.45 \mu\text{m}$  (APHA-AWWA-WEF, 1992).

El analizador empleado para realizar las medidas de COD es de la marca Shimadzu, modelo TOC-VCPH acoplado con un módulo Shimadzu-TNM-1 e inyector automático (Figura 3.5). El primero se utiliza para la determinación del carbono total (CT) y carbono inorgánico total (CIT) mientras que el segundo permite obtener el nitrógeno total (NT). La concentración de carbono orgánico total (COT) se obtiene por diferencia entre el CT y el CIT.



**Figura 3.5.** Equipo utilizado para la determinación de CT, CIT, COT y NT.

La concentración de CT se determina a partir de la combustión a  $680^\circ\text{C}$  de la muestra en un catalizador de platino soportado en esferas de óxido de aluminio. De esta forma, todo el carbono es convertido a  $\text{CO}_2$  y posteriormente arrastrado por un gas portador (aire libre de  $\text{CO}_2$  bajo un caudal de  $150 \text{ mL min}^{-1}$ ) hasta un detector infrarrojo. Dicho detector genera una señal en forma de pico y el software correspondiente permite determinar el área y, por tanto, la concentración de CT. Las medidas de CIT se consiguen acidificando previamente la muestra con una disolución de ácido fosfórico al 25% p/v. Así, tanto el carbonato como el bicarbonato son igualmente liberados como  $\text{CO}_2$ .

La calibración del equipo, es decir, la relación entre el área generada por el detector y la concentración de CT, CIT y NT, se realiza a partir de disoluciones estándar preparadas en agua

ultrapura mediante ftalato potásico (CT), carbonato y bicarbonato sódico (CIT) y nitrato potásico (NT). Además, diariamente se inyectan disoluciones estándar de COT (TOC standard 1000 ppm, Reagecon) y CIT/TIC standard 1000 ppm, Reagecon) para verificar que las medidas realizadas por el equipo son correctas.

La medida del COD requiere un tratamiento previo de la muestra, consistente en la filtración de unos 12 mL de la misma a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore Millex® GN). De esta forma se retiran los sólidos en suspensión presentes en la muestra que puedan dañar al sistema. La muestra contenida en el vial correspondiente se introduce en el muestreador del equipo y a través del software se ordena el análisis de la muestra acuosa.

Las medidas son repetidas automáticamente (un mínimo de tres veces y un máximo de cinco) de forma que la varianza nunca sobrepase el 2%. En los ensayos de foto-Fenton, puesto que la mayoría de las veces las muestras aun contienen los reactivos, nunca se realizan más de tres medidas para evitar un avance excesivo de la reacción.

### 3.6.2. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC/UV-DAD)

El seguimiento de la concentración de resorcinol se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detector UV con red de diodos. El equipo empleado es un cromatógrafo de líquidos de la marca Agilent Technologies serie 1200 (Figura 3.6) con una columna de fase reversa Agilent XDB-C18 incluyendo a su vez una pre-columna para la protección de la misma y un detector UV (diodos) que permite medir en varias longitudes de onda a la vez.

La cromatografía líquida de ultra-alta resolución se basa en el bombeo de la fase móvil, a alta presión, a través de una columna que contiene partículas (fase estacionaria) con un diámetro normalmente comprendido entre los 3 y 10  $\mu\text{m}$ . Cuanto menor es el tamaño de partícula, más eficiente es la columna, pero también es mayor la resistencia que ofrece al flujo. En la cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, los solutos más polares se eluyen primero y la retención del soluto se incrementa aumentando la polaridad de la fase móvil, donde la fase móvil suele ser una mezcla de agua ultrapura y un disolvente orgánico. La elección del procedimiento de separación depende del tamaño, polaridad y naturaleza iónica del soluto. Existen dos tipos de flujo seleccionables, la elución isocrática, en la que la proporción agua/disolvente orgánico es fija, o la utilización de gradientes,

en la que dicha proporción cambia con el tiempo. El uso de gradientes se relaciona con separaciones más complejas, normalmente mezclas de contaminantes. A la salida de la columna, el detector genera una señal al paso de los contaminantes, siendo posible relacionar la intensidad de la señal con la concentración del compuesto.

Para la determinación de la concentración de resorcinol se ha elegido una elución isocrática empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo (5%) y agua ultrapura con un 10% de ácido fórmico (95%). El caudal de la bomba se fija en  $1 \text{ mL min}^{-1}$  y el volumen de muestra inyectado en  $30 \text{ }\mu\text{L}$ . En la cabina termostatazada se selecciona una temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . La longitud de onda seleccionada es de  $270 \text{ nm}$ .



**Figura 3.6.** Equipo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución utilizado para el seguimiento de la concentración de resorcinol.

Antes de introducir las muestras en el equipo, estas se diluyen manteniendo la proporción agua/disolvente orgánico de la fase móvil para que las muestras se asemejen a la fase móvil y no desestabilizan el sistema al inyectarlas. También, al añadir el disolvente se para la reacción por desnaturalización del medio en la reacción de foto-Fenton. Una vez realizada la dilución, las muestras se filtran mediante filtros de jeringa con un tamaño de poro de  $0.20 \text{ }\mu\text{m}$  (Millex®-GN, 25 mm, Millipore). Se comprueba además que los valores obtenidos por UPLC al inicio de los experimentos sean congruentes con la medida de COD.

### 3.6.3. Medida de aniones inorgánicos

La cromatografía iónica (CI) es una técnica eficaz de separación y determinación de iones, que se basa en el uso de columnas cromatográficas que contienen resinas de intercambio iónico. Esta técnica analítica se emplea para la determinación tanto de aniones como cationes en una determinada muestra de agua.

Para la medida de la concentración de iones el cromatógrafo usado es Metrohm 881 Compact IC pro (Figura 3.7). El equipo consta de un desgasificador para eliminar las burbujas del eluyente y muestra, una bomba de alta presión, una válvula de inyección que conecta el eluyente y la muestra, un cámara de columna termostataada para asegurar una temperatura estable, una bomba peristáltica para bombear la muestra y el eluyente, un módulo supresor y una columna cromatográfica aniónica.

En la cromatografía iónica los iones en solución acuosa son retenidos en la columna mediante enlaces iónicos ácidos y básicos con sus contraiones. La columna esta formada por una resina con iones cargados como sitios activos. El sistema puede trabajar con una columna catiónica, para detectar cationes en disolución, o con una columna de aniones para la determinación de aniones. En la experimentación llevada a cabo, el equipo siempre trabaja con columna aniónica. La columna usada es Metrosep A Supp 7, 250-4.0 mm y 5  $\mu\text{m}$  de Metrohm. El eluyente es una disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . El equipo trabajó con un flujo de  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$  y a una temperatura de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La señal emitida por el detector genera un pico cuya área se evalúa mediante una calibración interna. La respuesta del detector de conductividad no es lineal en todo el rango de medida, por lo que se realizan varias rectas de calibrado dentro de los rangos en los que la respuesta es lineal:  $0.1\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $2.5\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$ . El software de cromatografía iónica MagIC Net<sup>TM</sup> controla todos los componentes del sistema y supervisa los parámetros esenciales del análisis cromatográfico.

Las muestras son filtradas directamente sobre los propios viales proporcionados por Metrohm a través de un filtro de PTFE (politetrafluoroetileno o teflón) con un tamaño de poro de  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$  (Millipore Millex<sup>®</sup> GN). El buen funcionamiento de ambos equipos así como su correcta calibración se comprueba mediante la inyección diaria de disoluciones patrón de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno de los iones que se van a medir.





**Figura 3.7.** Cromatógrafo iónico utilizado para la determinación de la concentración de aniones del efluente de secundario de la EDAR.

#### 3.6.4. Medida de la turbidez

La turbidez es la cuantificación de la dispersión y absorción de luz a  $90^\circ$  al pasar a través de una muestra de agua. La turbidez en el agua puede ser causada por la presencia de partículas suspendidas y disueltas de gases, líquidos y sólidos tanto orgánicos como inorgánicos, con un ámbito de tamaños desde el coloidal hasta partículas macroscópicas. Se mide utilizando un turbidímetro y se expresa en Unidades Nefelométricas de Turbidez (UNT).

El turbidímetro utilizado es de la compañía HANNA Instruments (Rumanía) y el modelo es turbidímetro-nefelómetro portátil HI 93703 C, que ha sido diseñado de acuerdo a las normas internacionales ISO 7027 (Calidad del agua. Determinación de la turbiedad) (Figura 3.8). El funcionamiento se basa fundamentalmente en iluminar a través de una cubeta cilíndrica de vidrio borosilicatado (con la muestra) y recoger la luz dispersada. La fuente de luz es un diodo LED de infrarrojos con una longitud de onda de 890 nm, por lo que las interferencias por el color son mínimas. Un sensor, posicionado a  $90^\circ$  con respecto a la dirección de la fuente de luz,

detecta la cantidad de luz que ha sido dispersada en ángulo recto por las partículas no disueltas en el líquido. Este turbidímetro mide por infrarrojos un rango de 0 a 1000 UNT y dos escalas de medición, de 0 a 50 y de 50 a 1000. El equipo selecciona automáticamente el rango apropiado, de acuerdo con la turbidez de la muestra. El microprocesador reconoce automáticamente los valores fijos de 0 y 10 UNT para poder así efectuar una calibración precisa por debajo de 1 UNT. Para su calibración se utiliza la disolución de HI93703-10 @10 NTU.



**Figura 3.8.** Turbidímetro portátil HI 93703 C de HANNA Instruments.

Para la medida de la turbidez de la muestra acuosa se llena la cubeta del turbidímetro con la muestra a analizar. Se homogeneiza con una suave agitación antes de introducirla procurando que en la cubeta no queden burbujas de aire y a continuación se inserta en el compartimento de la cubeta del turbidímetro. Tras unos segundos aparece en la pantalla el valor de la turbidez.

### 3.6.5. Medida de la concentración de hierro (ISO 6332)

El hierro interviene como catalizador en el ciclo fotocatalítico de las reacciones Fenton y foto-Fenton en presencia de  $H_2O_2$ . La determinación de la cantidad de hierro en forma de  $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$  resulta imprescindible para conocer el funcionamiento del tratamiento mediante foto-Fenton. Para realizar los experimentos de foto-Fenton se utilizaron dos sales de hierro, sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) y cloruro de hierro ( $FeCl_3$ ) como fuente de  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  respectivamente.

El ion ferroso en disolución reacciona con tres moléculas de 1,10-fenantrolina para la formación de un complejo de color anaranjado cuando el pH está comprendido entre 2 y 9. Sin embargo, para asegurar la rápida formación de dicho complejo así como para asegurar su cuantificación, es habitual utilizar una disolución tampón de forma que el pH quede siempre

comprendido entre 3-3.5. La absorbancia del complejo  $\text{Fe}^{2+}$  con 1,10-fenantrolina medida a 510 nm es proporcional a la concentración de ion ferroso (APHA-AWWA-WEF, 1988). Haciendo uso de esta propiedad se analizan las muestras de agua para determinar su concentración en  $\text{Fe}^{2+}$ .

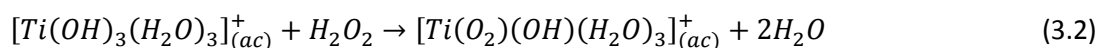
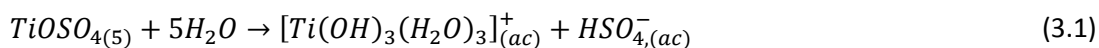
Por otro lado, en el proceso de foto-Fenton, en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el ion ferroso se oxida rápidamente a férrico, con lo que en el agua y en la mayoría de las muestras el hierro se encuentra en forma de  $\text{Fe}^{3+}$ . Para determinar la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$ , se procede a reducir todo el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante la adición de ácido ascórbico, de manera que éste reacciona con 1,10-fenantrolina. Así, todo el hierro presente en la muestra se cuantifica como hierro total y por diferencia entre la concentración de hierro total y  $\text{Fe}^{2+}$  medidas de la misma muestra de agua se puede determinar la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$ .

Para la medida del hierro total en disolución, se toman 4 mL de muestra filtrada mediante filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0.20  $\mu\text{m}$  (Millex<sup>®</sup>-GN, 25 mm, Millipore) y se añade 1 mL de una disolución de 1,10-fenantrolina (1 g  $\text{L}^{-1}$  en agua destilada) y 1 mL de una disolución tampón (250 g  $\text{L}^{-1}$  de acetato de amonio y 700 mL  $\text{L}^{-1}$  de ácido acético en agua destilada). Finalmente, se adiciona una cantidad aproximada de 15 mg de ácido ascórbico (suficiente para superar el equilibrio estequiométrico), se agita y, transcurrido un minuto, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. El blanco se prepara siguiendo el mismo procedimiento pero con agua destilada en lugar de muestra. Los datos de absorbancia se relacionan con la concentración de hierro a través de una recta de calibración externa para un rango de concentraciones dado. En el caso de utilizar concentraciones superiores, las muestras deben ser diluidas. En todas las medidas espectrofotométricas el equipo utilizado fue un espectrofotómetro Hach Lange DR 5000.

### 3.6.6. Medida de la concentración de peróxido de hidrógeno

#### 3.6.6.1. Método DIN 38 402 H15

La determinación cuantitativa del peróxido de hidrógeno se ha llevado a cabo mediante espectrofotometría con el reactivo oxisulfato de titanio (IV) (Riedel de Haën, Alemania) de acuerdo con el método DIN 38 402 H15. Se trata de un método basado en la formación de un complejo estable de color amarillo formado por la combinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el  $\text{TiOSO}_4$ , tal y como indican las reacciones 3.1 Y 3.2. El complejo  $[\text{Ti}(\text{O}_2)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]_{(ac)}^+$  presenta un máximo de absorción a 410 nm (Muñoz *et al.*, 1990).



El procedimiento para la medición del peróxido de hidrógeno se lleva a cabo filtrando la muestra con un filtro de PTFE (0.22  $\mu$ m Millipore Millex® GN). A continuación, se mezclan 5 mL de la muestra filtrada con 0.5 mL del reactivo  $TiOSO_4$ . Para medir la absorbancia se utiliza un espectrofotómetro Hach Lange DR 5000 tomando como referencia agua destilada. Tras la elaboración de la recta de calibrado, de la medida de absorbancia se puede obtener la concentración de  $H_2O_2$  en la muestra.

### 3.6.6.2. Método del metavanadato de amonio

El peróxido de hidrógeno reacciona con el anión metavanadato dando lugar al catión  $VO_2^{3+}$  de color anaranjado. La disolución sigue la ley de Beer, es decir, la absorción (450 nm) es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno (Nogueira *et al.*, 2005). El catión formado mediante dicha reacción es sumamente estable a temperatura ambiente (180 h) siempre y cuando la concentración de peróxido de hidrógeno sea menor a 3 mM.

La medida se realiza añadiendo 5 mL de muestra en un matraz aforado de 10 mL junto con 1030  $\mu$ L de metavanadato de amonio (0.06 M de metavanadato de amonio en 0.36 M de ácido sulfúrico). Se enrasa con agua destilada y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro. Tras la elaboración de la recta de calibrado, de la medida de absorbancia se puede obtener la concentración de  $H_2O_2$  en la muestra. El blanco se prepara enrasando directamente los 1030  $\mu$ L de metavanadato de amonio con agua destilada.

### 3.6.7. Método de adición de Catalasa para la eliminación del peróxido de hidrógeno

Para que el agente oxidante no pueda seguir actuando una vez tomada la muestra que se usa para la determinación de la concentración de microorganismo, se procede a la eliminación del peróxido de hidrógeno presente en las muestras pre-tratadas mediante fotocatalisis solar. El método de adición de Catalasa emplea catalasa de hígado de bovino (SigmaAldrich 2300 unidades  $mg^{-1}$ ), que es una enzima capaz de neutralizar formas tóxicas derivadas del oxígeno (como el  $H_2O_2$ ), que se forman en los ambientes acuosos que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Adams *et al.*, 1994). Una unidad de catalasa descompone 1.0  $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno por minuto a pH 7 y a 25 °C aproximadamente.

En primer lugar se prepara una disolución de catalasa a una concentración de  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  con agua ultra pura (Milli-Q). La preparación de esta disolución debe realizarse cada dos días de forma que se mantenga la actividad de la catalasa. Para garantizar una actividad satisfactoria se añade unas tres veces más catalasa de la necesaria para eliminar el peróxido de hidrógeno presente en las muestras.

#### *3.6.8. Medida del oxígeno disuelto, temperatura y pH*

Además de la radiación UV, en los experimentos llevados a cabo en el fotorreactor CPC se realizaron en línea medidas de pH, oxígeno disuelto (OD) y temperatura. En la conducción de entrada al tanque de recirculación, a la salida de los reactores tubulares, se encuentran insertados sensores de pH (CRISON 53 35) y oxígeno disuelto y temperatura (CRISON 60 50), que transmiten sus medidas a un multímetro (CRISON). El sensor de oxígeno disuelto, es un electrodo polarográfico diseñado para la medida simultánea de oxígeno disuelto y temperatura y utiliza membranas muy resistentes tanto mecánica como químicamente. La membrana es de silicona, inoxidable y PTFE. El electrodo de trabajo es un cátodo de platino y el electrodo contador es un ánodo de plata. Su temperatura de trabajo está entre  $0\text{-}50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y su presión máxima es de 2 bares. El sensor de pH es un electrodo de pH de bajo mantenimiento para aguas residuales con electrolito sólido y diafragma anular abierto. Puede medir en el rango de pH 2-14 y puede trabajar correctamente a temperaturas comprendidas entre  $0$  y  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión máxima de 2 bares.

El sistema de adquisición de datos está compuesto por una tarjeta de adquisición LabJack U12 (LabJack corporation, Lakewood, Colorado, USA), que permite la adquisición de señales de 12 bits para un ordenador con conexión por puerto USB. La tarjeta de adquisición dispone de 8 entradas analógicas, 4 entradas analógicas diferenciales de 12 bits y 20 entradas/salidas analógicas. Las lecturas se registran en un ordenador en el que está instalado el software DAQFactory Lite (AzeoTech, Inc., Ashland, Oregon, USA). En el resto de reactores utilizados las medidas de pH y temperatura se tomaron puntualmente cada cierto intervalo de tiempo.



## PARTE II

---

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN CONCLUSIONES







# CAPÍTULO 4

---

## EFFECTO DE LA TEMPERATURA





#### 4. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA INACTIVACIÓN BACTERIANA MEDIANTE FOTO-FENTON A pH NEUTRO

La aplicación práctica del proceso de foto-Fenton para la desinfección de efluentes depurados se lleva a cabo sometida a condiciones medioambientales, principalmente radiación solar y temperatura. Como en la mayoría de las reacciones químicas, la cinética de la reacción de foto-Fenton está influenciada por la temperatura. Sin embargo, aunque el efecto de la temperatura en la degradación de contaminantes tóxicos ha sido analizado por otros autores, la influencia de esta variable durante la desinfección de aguas mediante foto-Fenton no se ha evaluado hasta el momento. Por tanto, el objetivo de este capítulo es estudiar el efecto de la temperatura en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton a un pH inicial neutro. Para ello, en primer lugar se analizó el efecto individual de diversos factores del proceso como son la radiación UV-A, y la presencia individual de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de  $\text{Fe}^{2+}$ , así como el efecto combinado ( $\text{UV-A}/\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{UV-A}/\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ) de los factores involucrados en el proceso. Posteriormente, se determinaron experimentalmente las cinéticas de desinfección mediante foto-Fenton a diferentes temperaturas (10, 20, 30 y 40 °C).

En este capítulo, todos los experimentos se llevaron a cabo bajo una radiación UV-A de  $32 \text{ W m}^{-2}$  (sección 3.4.1) y en un fotorreactor construido específicamente para este propósito (sección 3.3.1). Como microorganismo modelo se utilizó *Enterococcus faecalis*. Además, como se describe previamente en la sección 3.2.2, la presencia de materia orgánica ayuda a mejorar la eficiencia del proceso de foto-Fenton a valores de pH cercanos a la neutralidad. Por tanto, todos los ensayos de este capítulo, se llevaron a cabo en agua milli-Q con  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de COD aportados por resorcinol, como modelo de materia orgánica presente en aguas naturales.

##### 4.1. Efecto individual y combinado de los factores involucrados en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton a pH neutro

Con el objetivo de elucidar el papel de las condiciones de flujo, la irradiancia solar y la concentración de reactivos en el proceso de desinfección bacteriana mediante foto-Fenton, se evaluó el efecto de estos factores de forma individual y combinada. Para ello, partiendo de la misma concentración inicial de bacteria ( $10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ ), a una temperatura constante de 20 °C, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

- i) En oscuridad y sin adicionar ningún reactivo (ni  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ni  $\text{Fe}^{2+}$ ), con el fin de evaluar si las condiciones de flujo del reactor producen estrés mecánico.

- ii) En presencia de luz solar artificial sin adicionar ningún aditivo, para determinar el efecto aislado de la radiación solar en la bacteria *E. faecalis*.
- iii) En presencia de  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oscuridad, para discernir el efecto que este oxidante tiene en las células.
- iv) En presencia de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  en oscuridad, para determinar el efecto aislado del catalizador en las bacterias.
- v) En presencia de  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , con el objetivo de evaluar el efecto de la reacción Fenton.
- vi) En presencia de radiación solar artificial y  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- vii) En presencia de luz solar artificial y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ .
- viii) En presencia de luz solar artificial,  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , para evaluar la eficiencia de desinfección por foto-Fenton.

Como se observa en la Figura 4.1a, el estrés mecánico debido al flujo y bombeo a través del sistema experimental no tuvo efecto en la viabilidad de la bacteria. Por otro lado, el efecto de la radiación causó un descenso de 2,5-log después de 120 min de exposición a una irradiancia UV-A de  $32 \text{ W m}^{-2}$  (Figura 4.1a). En este caso, se observó una curva de inactivación típica de los procesos de calentamiento moderado (Geeraerd *et al.*, 2005). El comportamiento de *E. faecalis* en este reactor bajo exposición a la luz y en recirculación continua, con periodos de luz y oscuridad, muestra en una primera fase un hombro (entre 0 y 60 min) seguido por una caída de primer orden (desde 60 min hasta el final). Este comportamiento está en concordancia con los resultados encontrados por otros autores para *E. coli* bajo luz natural en similares reactores con regiones oscuras e iluminadas (Ubomba-Jaswa *et al.*, 2009). La longitud del hombro orienta sobre el tiempo necesario para que el efecto de la luz cause un daño cuantificable sobre la población bacteriana. Por tanto, el hombro será mayor cuando las bacterias sean muy resistentes a la radiación y tengan mecanismos de auto defensa contra el daño inducido por ésta (Ubomba-Jaswa *et al.*, 2009). En la segunda parte de la curva, el descenso logarítmico lineal observado es común al de la fotoinactivación descrita por la ley de Chick-Watson y otros modelos cinéticos modificados (Marugán *et al.*, 2008). Se puede excluir un daño directo al ADN por efecto de la luz UV-C, puesto que el simulador solar utilizado no emite a longitudes de onda menores de 300 nm.

El peróxido de hidrógeno es comúnmente conocido por su uso como desinfectante para agua de riego en agricultura (Chikthimmah *et al.*, 2005). Todas las células vivas son expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular procedente de sus propios metabolismos a concentraciones que vienen

determinadas por la velocidad de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular (ya sea en el espacio citosólico y/o en la matriz mitocondrial) y su efectiva eliminación por antioxidantes intracelulares (Cadenas y Davies, 2000). Sin embargo, una concentración exógena mili molar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede causar la muerte a las células de *E. coli* en su fase de crecimiento logarítmico (Imlay *et al.*, 1988). Imlay y Lin distinguieron dos modos de daño sobre *E. coli* mediante el uso de peróxido de hidrógeno (Imlay y Lin, 1986). El Modo 1 (1-2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), es aquel en el que la muerte fue atribuida a un daño en el ADN debido a las reacciones de Fenton, y el Modo 2, que ocurre a mayores concentraciones de peróxido (>20 mM). En los presentes ensayos (Figura 4.1a) la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracelular fue de  $120 \text{ mg L}^{-1}$  (3.5 mM) con un tiempo de tratamiento de hasta 2 h. Con estas condiciones se observó un descenso de 2.5-log en la concentración de *E. faecalis* después de 80 min y no se alcanzó el límite de detección.

Como se muestra en la Figura 4.1a, con la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  testada no se observó ningún daño sobre las células bacterianas en oscuridad. Durante el ensayo, debido a la hidrólisis del hierro, se observó un descenso del pH desde  $7.0 \pm 0.2$  a  $4.0 \pm 0.2$ . El pH del agua no se ajustó a la neutralidad durante el experimento ya que previamente se comprobó experimentalmente que este cambio de pH no afectaba a la viabilidad de *E. faecalis*. Sin embargo, al añadir  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reacción de Fenton) se observó un descenso en la concentración bacteriana de 5-log al final del experimento (Figura 4.1a). Este marcado descenso puede atribuirse a la generación de radicales hidroxilo durante el proceso Fenton (Ecuaciones 1.6-1.13). Como consecuencia, la concentración inicial de peróxido de hidrógeno se redujo un 30% (Figura 4.1b).

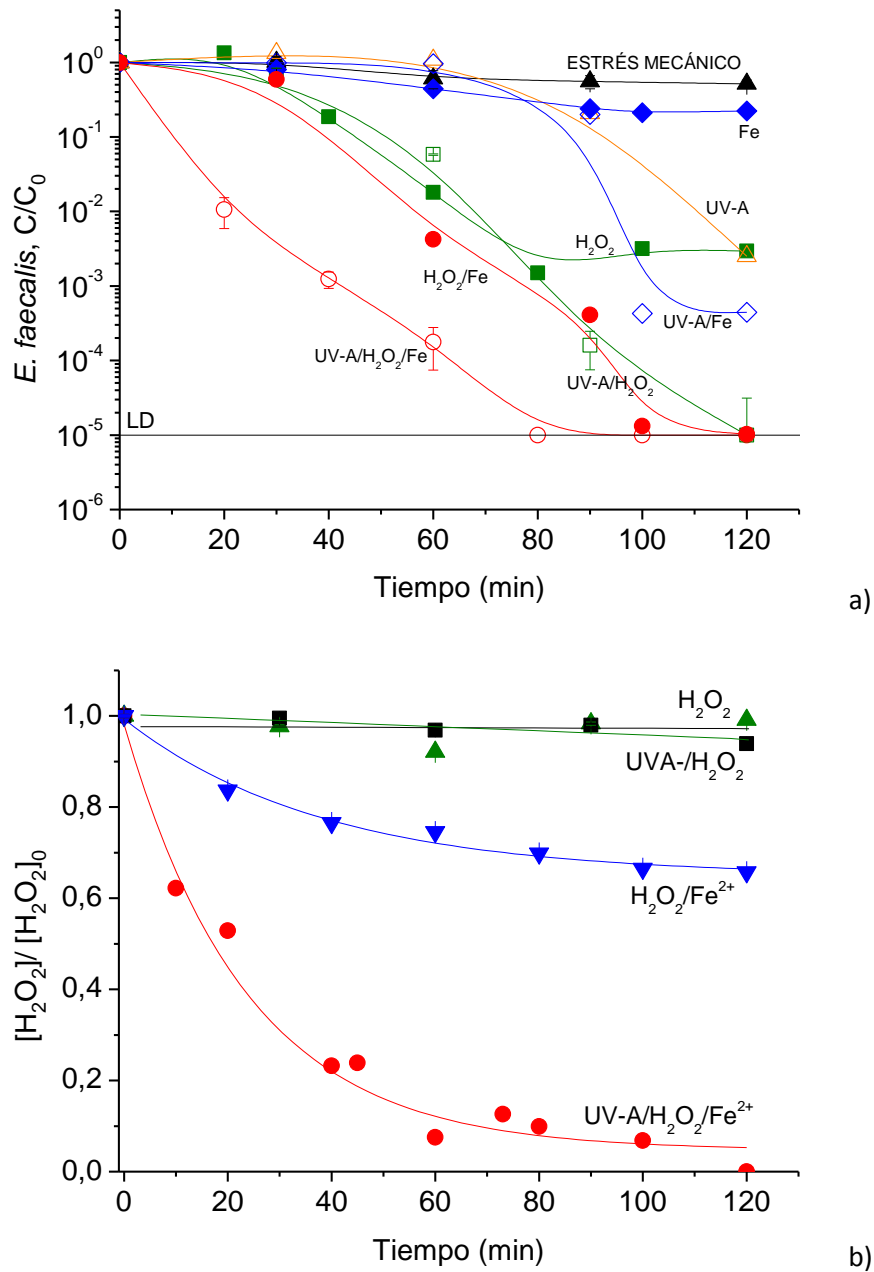
En la Figura 4.1a se observa que en 120 min de tratamiento se alcanzó el límite de detección mediante el efecto combinado de la luz UV-A y el peróxido de hidrógeno. Durante los primeros 80 min de reacción, únicamente el peróxido de hidrógeno tiene efecto en la inactivación bacteriana, ya que durante este tiempo las curvas en los ensayos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y UV-A/ $\text{H}_2\text{O}_2$  están superpuestas (Figura 4.1a). Después de este tiempo, la radiación UV-A incidente sobre las células dañadas por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  permite alcanzar el límite de detección. Algunos autores han estudiado el efecto perjudicial de la radiación UV-vis en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y existen evidencias del efecto sinérgico entre la radiación UV o luz visible y el peróxido de hidrógeno en la inactivación de microorganismos presentes en agua (Feuerstein *et al.*, 2006). Suphler *et al.* observaron el mismo comportamiento para la inactivación de *E. coli* combinando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y luz solar artificial durante 180 min (Suphler *et al.*, 2010). También la combinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y luz solar natural ha demostrado ser efectiva en la inactivación de esporas de *Fusarium solani* (Sichel *et al.*, 2009; Polo-López *et al.*, 2011). Este efecto sinérgico puede explicarse porque en primer

lugar, la célula es dañada por el ataque oxidante del peróxido de hidrógeno sobre la membrana celular, iniciando la cadena de peroxidación lipídica que aumenta la permeabilidad de la membrana comprometiendo la viabilidad de la bacteria. Por otro lado, la célula parcialmente dañada por este ataque oxidante, está sometida a una foto-absorción (radiación UV y/o visible), lo que produce una mayor inactivación bacteriana. Además, también hay evidencias que muestran que dentro de las células tienen lugar reacciones tipo Fenton y foto-Fenton. Estas reacciones son favorecidas por la difusión del  $H_2O_2$  a través de la membrana, dando lugar a diferentes reacciones oxidantes dentro de la célula. El hierro natural libre o débilmente unido presente en las células puede reaccionar con un exceso de  $H_2O_2$  intracelular produciendo radicales hidroxilo vía ciclo Fenton/Haber-Weiss (Imlay *et al.*, 1988). La reacción de Haber-Weiss tiene una relevancia importante en la inactivación microbiana porque en la mayoría de organismos vivos la presencia simultánea de  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$  puede conducir a la formación intracelular de radicales hidroxilo, dando lugar a un daño directo en el ADN y en la célula. Durante el proceso UV-A/ $Fe^{2+}$  se observó un descenso de 3.5-log en la concentración de *E. faecalis* (Figura 4.1a). La evolución de esta inactivación bacteriana es muy similar a la observada frente al efecto aislado de la luz UV-A, aunque en los últimos minutos de reacción se alcanza finalmente una mayor inactivación mediante el sistema UV-A/ $Fe^{2+}$  probablemente debido a reacciones de Fenton internas.

La inactivación bacteriana llevada a cabo mediante el proceso foto-Fenton condujo a un descenso de 5-log, alcanzando el límite de detección en 80 min de tratamiento, y mostrando la mayor velocidad de desinfección de todos los procesos evaluados en esta sección (Figura 4.1a). Asimismo, se observó un rápido consumo de peróxido de hidrógeno (Figura 4.1b), asociado a una mayor generación de radicales hidroxilo. Además, sólo en el ensayo de foto-Fenton se encontró una reducción significativa de la concentración de COD (de 20 a 11 mg L<sup>-1</sup>).

Al contrario que en los procesos de desinfección con luz solar, durante el tratamiento mediante foto-Fenton no se observó un hombro en la curva de inactivación (Figura 4.1a). En los procesos de desinfección usados para el tratamiento del agua, el hombro observado en las curvas de inactivación puede representar:

- i) El proceso de adsorción entre el catalizador y la bacteria, o
- ii) la resistencia de la bacteria al tratamiento hasta que es expuesta a una determinado daño letal, o
- iii) un retardo del tiempo necesario para que el tratamiento muestre efectos desinfectantes.

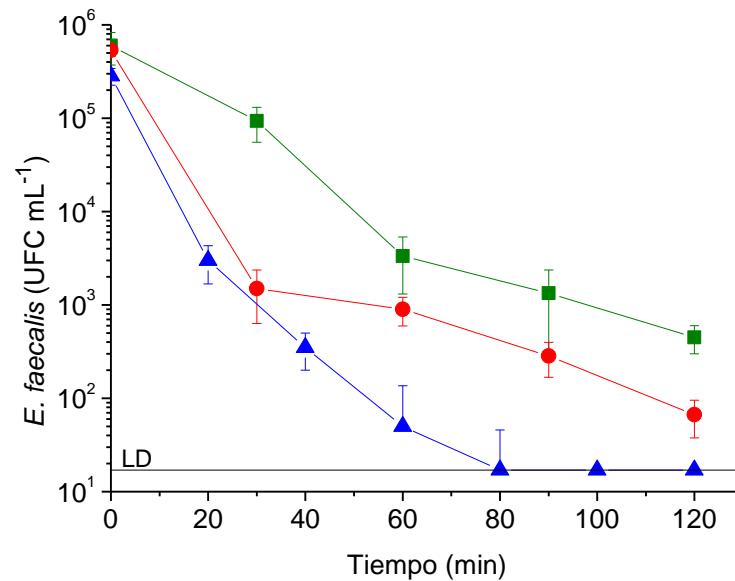


**Figura 4.1. a)** Inactivación de *E. faecalis* en el reactor a 20 °C frente a: i) Estrés mecánico (-▲-), ii) radiación solar artificial (-△-), iii) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-■-), iv) Fe<sup>2+</sup> (-◆-), v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup> (Fenton, -●-) vi) radiación UV-A y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-⊠-), vii) Radiación UV y Fe<sup>2+</sup> (-◇-) y viii) photo-Fenton (-⊙-); **b)** Descomposición de peróxido de hidrógeno en el proceso: i) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-▲-), ii) radiación UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-■-), iii) Fenton, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (-▼-) y iv) foto-Fenton, UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (-●-). Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=120 mg L<sup>-1</sup> y concentración de Fe<sup>2+</sup> = 10 mg L<sup>-1</sup>.

La falta de hombro en la curva de inactivación durante el proceso foto-Fenton puede atribuirse al elevado poder oxidante que tienen los radicales hidroxilo generados. Estos radicales atacan principalmente las paredes celulares tan severamente que reprimen la actuación de sus propios mecanismos de defensa frente al estrés oxidante y consecuentemente, el daño celular comienza a manifestarse en los primeros instantes de la reacción (Spuhler *et al.*, 2010).

Posteriormente, se evaluó el efecto de emplear cantidades menores de peróxido de hidrógeno (20 y 70 mg L<sup>-1</sup>, Figura 4.2), puesto que la concentración del oxidante es uno de los parámetros claves en el coste total del proceso foto-Fenton (Santos-Juanes *et al.*, 2011a). Sin embargo, mientras que el límite de detección se alcanzó en 80 min usando 120 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuando se emplearon 20 y 70 mg L<sup>-1</sup> se produjo un descenso de 3 y 4-log, respectivamente. Por ello, la concentración de 120 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue la seleccionada para los experimentos posteriores. Dicha concentración es mayor que la usada por otros autores (Rincón y Pulgarín, 2007a, 2007b; Sichel *et al.*, 2009; Spuhler *et al.*, 2010; Polo-López *et al.*, 2011) debido al tipo de sistema experimental utilizado, donde las condiciones de flujo y los volúmenes no iluminados disminuyen la eficiencia del proceso. No obstante, se hizo necesario usar este tipo de sistema experimental para poder controlar conjuntamente temperatura e irradiancia. El tipo de bacteria objeto de estudio, *E. fecalis*, también condiciona las condiciones experimentales. Aunque hay resultados controvertidos respecto a la resistencia de esta bacteria en comparación con *E. coli* (Van Grieken *et al.*, 2010), existen numerosos trabajos experimentales recientes que demuestran que *E. fecalis* es significativamente más resistente que *E. coli* a los procesos de oxidación avanzada (Flynn, 1984; Drakopoulou *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2009; Kühn *et al.*, 2009), debido a que este tipo de microorganismos requiere un mayor número de ataques oxidantes por parte de los radicales hidroxilo (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014). Esta diferencia se ha atribuido a la diferente arquitectura de la membrana citoplasmática de ambas, siendo una Gram-negativa (*E. coli*) y la otra Gram-positiva (*E. fecalis*). Las bacterias Gram-negativas poseen una membrana citoplasmática, una fina capa de péptidoglicanos y una membrana externa compuesta por cadenas de lipo-polisacáridos, mientras que las bacterias Gram-positivas sólo poseen una membrana lipídica. Por este motivo, se cree también que fue necesario emplear concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superiores a las referencias de la bibliografía, donde la bacteria de referencia era *E. coli*.





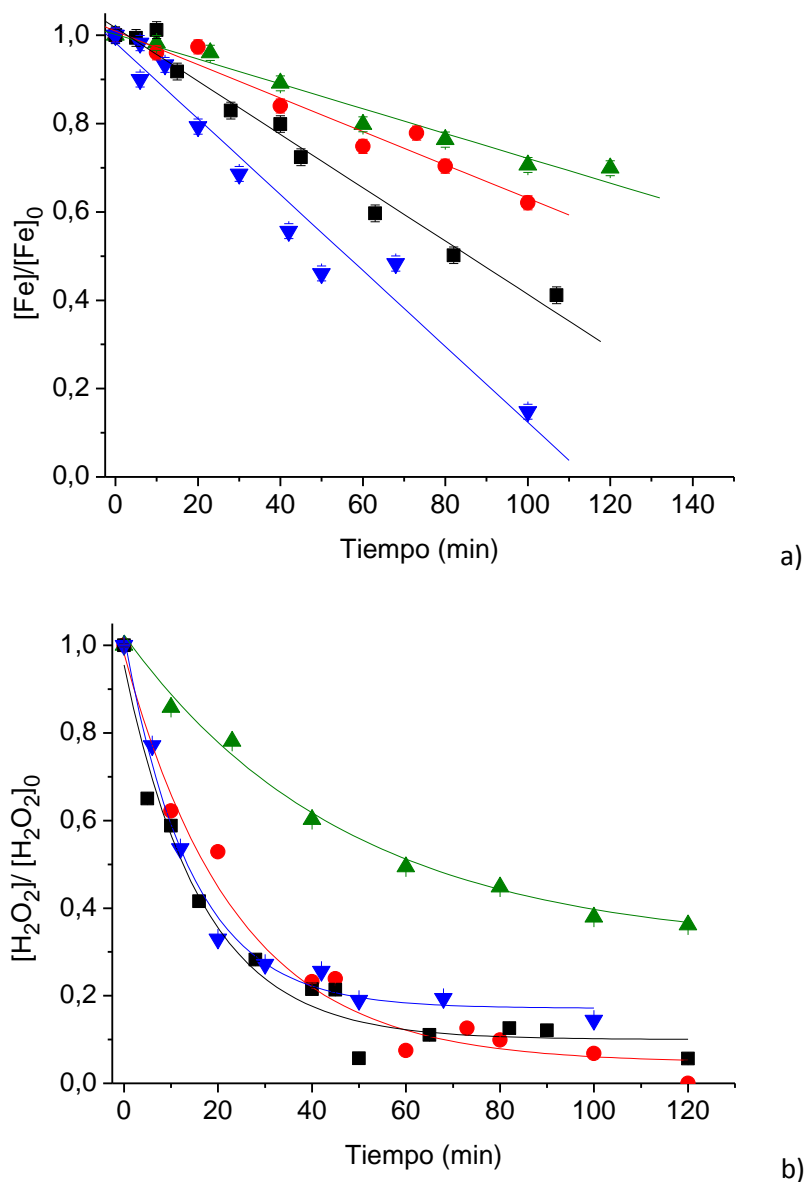
**Figura 4.2.** Inactivación de *E. faecalis* por foto-Fenton con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 20 mg L<sup>-1</sup> (-■-), 70 mg L<sup>-1</sup> (-●-) y 120 mg L<sup>-1</sup> (-▲-). Concentración de Fe<sup>2+</sup>: 10 mg L<sup>-1</sup>. Temperatura: 20 °C.

#### 4.2. Efecto de la temperatura en la inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro

Con el objetivo de evaluar la influencia de la temperatura en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro, se llevaron a cabo varios experimentos bajo la acción de luz solar artificial (32 W m<sup>-2</sup>), utilizando 120 y 10 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup> respectivamente y en presencia de 20 mg L<sup>-1</sup> de COD aportados por resorcinol. Las temperaturas evaluadas fueron 10, 20, 30 y 40 °C, ya que están en el rango de las temperaturas que pueden alcanzarse bajo condiciones ambientales en un fotorreactor situado en Almería (España). También pueden llegar a alcanzarse temperaturas superiores a 50°C en regiones soleadas, pero no serán evaluadas en este estudio ya que tanto *E. faecalis* como la mayoría de bacterias patógenas/entéricas pueden ser inactivadas a esas temperaturas (Spinks *et al.*, 2006).

A valores de pH mayores de 4, los iones de Fe<sup>2+</sup> se transforman fácilmente en Fe<sup>3+</sup> dando lugar a la formación de complejos hidroxilo y causando, por tanto, la precipitación del hierro (Mailhot *et al.*, 2002; Pignatello *et al.*, 2006). Por esta razón, se produce un descenso de la eficiencia del proceso foto-Fenton, ya que el Fe<sup>3+</sup> no se encuentra disponible para ser foto-reducido a Fe<sup>2+</sup> y continuar reaccionando. Otros autores han demostrado que esta pérdida de eficiencia es más acusada conforme aumenta la temperatura durante el proceso de foto-Fenton

a pH ácido para la descontaminación de aguas (Zapata *et al.*, 2009). Ante esta evidencia, se evaluó la pérdida de hierro en la desinfección de aguas por foto-Fenton en el rango de temperaturas seleccionado.



**Figura 4.3.** Evolución de: **a)** concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y **b)** concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , durante la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH inicial neutro a diferentes temperaturas: 10 °C (-▲-), 20 °C (-●-), 30 °C (-■-) y 40 °C (-▼-).

La Figura 4.3a muestra que a un pH inicial neutro, la precipitación de hierro es más rápida a mayor temperatura, dando lugar a un descenso de pH hasta  $3.5 \pm 0.2$ . La precipitación del hierro sigue una cinética de orden cero, en la que la constante  $k_{\text{Fe}}$  varía con la temperatura siguiendo una expresión tipo Arrhenius:

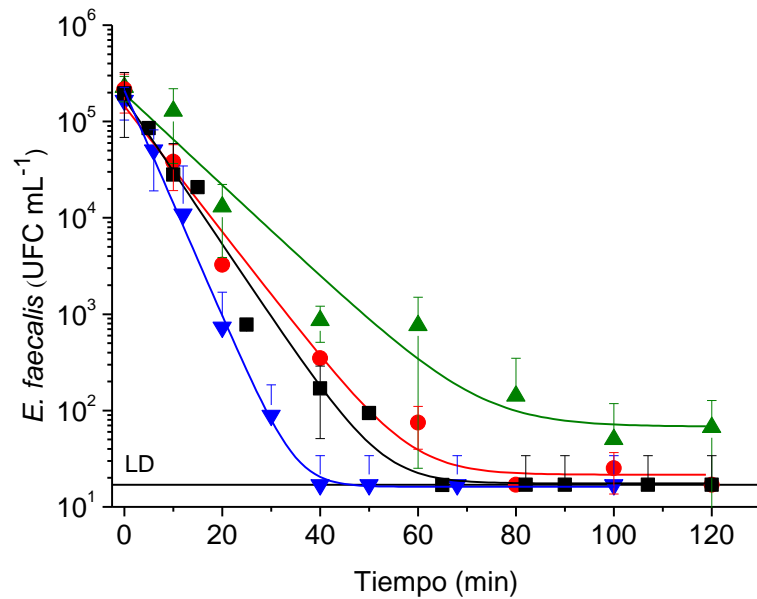
$$\ln(k_{Fe}) = 6.0304 - 3380.9 \cdot T^{-1}; R^2 = 0.99 \quad (4.1)$$

donde  $k_{Fe}$  es la velocidad de precipitación ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura (K). Paralelamente, la velocidad de consumo de peróxido de hidrógeno aumenta con la temperatura (Figura 4.3b), aunque en el intervalo 20-40°C no se observaron diferencias significativas posiblemente debido a la compensación entre la precipitación del hierro y la aceleración de la reacción debido al aumento de la temperatura.

Como puede observarse en la Figura 4.4, un incremento de la temperatura produce una mejora del proceso de desinfección mediante foto-Fenton (Figura 4.4). A la temperatura de 10 °C, no se alcanzó el límite de detección y la concentración de bacteria sin inactivar fue algo menor de  $10^2$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  tras los 120 min de exposición a la radiación. A las temperaturas de 20, 30 y 40 °C el límite de detección se alcanzó en 80, 65 y 40 min, respectivamente. Del análisis de los resultados obtenidos se puede afirmar que la reacción de foto-Fenton no estuvo limitada como consecuencia de la precipitación del hierro en ningún ensayo, puesto que en todos los casos a los 80 min de reacción más de un 40% de la concentración inicial de hierro permanece en disolución (Figura 4.3a). Por otro lado, el único ensayo en el que no se alcanza el límite de detección (a 10 °C) es el experimento en el que el peróxido de hidrógeno es consumido en menor proporción. Consecuentemente, la concentración de radicales oxidantes disponible es menor que en los ensayos a otras temperaturas (Figura 4.3b). Generalmente, se ha aceptado que la inactivación de microorganismos es principalmente debido a la acción de radicales oxidantes (especialmente  $\text{HO}^\bullet$ ) sobre la membrana de la célula bacteriana, lo que conduce a la perturbación de diferentes procesos celulares y, finalmente, a la muerte de la bacteria (Malato *et al.*, 2009; Spuhler *et al.*, 2010). Para temperaturas entre 20 y 40 °C, se observa la misma velocidad de descomposición de peróxido de hidrógeno (Figura 4.3b), por lo que en este rango de temperaturas se consigue la misma velocidad de generación de radicales hidroxilo. No obstante, hay una mayor inactivación de *E. faecalis* al aumentar la temperatura por lo que el efecto observado podría ser debido a que cuando la temperatura ensayada se aproxima a 37 °C (temperatura óptima de crecimiento), la bacteria se encuentra en plena actividad metabólica y por tanto es más vulnerable al ataque de los radicales hidroxilo y a la difusión de reactivos a través de la membrana celular. Por eso, es probable que el mecanismo de muerte esté más relacionado con los procesos que tienen lugar dentro de las células que con la concentración externa de radicales. Estos resultados están en concordancia con los observados por García-Fernández en su estudio de dependencia de la desinfección mediante fotocatalisis heterogénea con  $\text{TiO}_2$  con la temperatura (García-Fernández *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos muestran que, partiendo de una temperatura de 20 °C, un incremento de 20 °C en la temperatura del proceso de foto-Fenton produce una reducción del 50% en el tiempo de inactivación. Por tanto, la temperatura es un factor clave en la minimización del tiempo de tratamiento, que junto con el consumo de reactivos representan dos de los costes económicos más importantes del proceso (Santos-Juanes *et al.*, 2011a). Además, puesto que para alcanzar el límite de detección sólo son necesarios 40 min de tratamiento a 40 °C (una temperatura común en los reactores de foto-Fenton solar), el tratamiento de foto-Fenton solar a pH neutro es una opción atractiva para las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Actualmente, son muy escasos los trabajos encontrados en la bibliografía que aborden la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2013; Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014). No obstante, existen numerosas referencias relacionadas con la desinfección de la bacteria *E. coli* mediante este proceso. Spuhler *et al.*, 2010, alcanzaron tiempos de inactivación de *E. coli* de 75 min usando un simulador solar y bajas concentraciones de reactivos (0.6 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> y 10 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En estas condiciones alcanzaron el límite de detección tras 180 min de reacción. García-Fernández *et al.* mostraron inactivaciones de *E. coli* desde 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> a 2 UFC mL<sup>-1</sup> en tiempos menores a 20 min usando luz solar y reactores tipo botella (García-Fernández *et al.*, 2012). Estas diferencias en los tiempos de desinfección pueden ser debidas a las distintas fuentes de radiación usadas como radiación solar natural o lámparas UV con diferentes perfiles de espectros de emisión. Las velocidades de inactivación de *E. faecalis* obtenidas son menores que las encontradas en la bibliografía para *E. coli*, posiblemente debido a las diferencias en la composición de la pared celular de *E. coli* (Gram-negativa) y *E. faecalis* (Gram-positiva). El alto contenido en peptidoglicano, ácidos teicoico, polisacáridos y peptidoglicolipidos en la pared de *E. faecalis* actúa como un revestimiento protector frente al ataque de los radicales hidroxilo (Gomes *et al.*, 2009).



**Figura 4.4.** Inactivación de *E. Faecalis* mediante el proceso foto-Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2 = 120 \text{ mg L}^{-1}$  y  $\text{Fe}^{2+} = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ) a diferentes temperaturas:  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  (-▲-),  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (-●-),  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (-■-) y  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (-▼-).

### 4.3. Modelo cinético

En la bibliografía se han propuesto diferentes modelos para la inactivación bacteriana mediante tratamientos foto-catalíticos (Marugán *et al.*, 2008). En dichos procesos, la ecuación de Chick-Watson de primer orden, reducida, es:

$$C = C_0 e^{-k \cdot t} \quad (4.2)$$

donde  $C/C_0$  es la reducción en la concentración de microorganismo,  $k$  es la constante cinética de desinfección y  $t$  es el tiempo de tratamiento. En muchos casos, la velocidad de desinfección permanece constante al principio de la reacción y disminuye después de un periodo de tratamiento, cuando la concentración de microorganismos es muy baja.

Otros autores han desarrollado modelos de tres parámetros para ajustar experimentalmente aquellos datos que muestran un hombro, una región lineal y una cola (Marugán *et al.*, 2008). Las curvas de inactivación celular de la Figura 4.5 muestran una región logarítmica lineal y una cola. La región logarítmica lineal corresponde a una cinética de inactivación de primer orden y la cola representa a una población de bacterias remanente y constante en el tiempo que es más resistente. Por tanto, estos resultados pueden ser ajustados por la Ecuación 4.3:

$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C \rightarrow \frac{C - C_{res}}{C_0 - C_{res}} = e^{k_{max} \cdot t} \quad (4.3)$$

que puede ser expresada como:

$$C = (C_0 - C_{res})e^{k_{max} \cdot t} + C_{res} \quad (4.4)$$

donde  $k_{max}$  es la velocidad específica de inactivación ( $\text{min}^{-1}$ ),  $C_{res}$  es la densidad de población residual ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) y  $C_0$  es la concentración inicial de microorganismos. El modelo presentado en la ecuación 4.4 se empleó para ajustar los resultados experimentales obtenidos en la inactivación bacteriana por foto-Fenton a diferentes temperaturas. En la Tabla 4.1 se recogen los valores de los parámetros obtenidos junto con su error.

**Tabla 4.1.** Parámetros cinéticos obtenidos de la inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton a diferentes temperaturas y según la Ecuación 4.4.

T (°C)	$k_{max}(\text{min}^{-1})$	$C_{res}(\text{UFC mL}^{-1})$	$R^2$
10	$0.11 \pm 0.02$	$68.2 \pm 1.7$	0.96
20	$0.15 \pm 0.02$	$21.6 \pm 1.4$	0.98
30	$0.17 \pm 0.01$	$17.5 \pm 1.2$	0.98
40	$0.27 \pm 0.01$	$16.2 \pm 1.1$	0.99

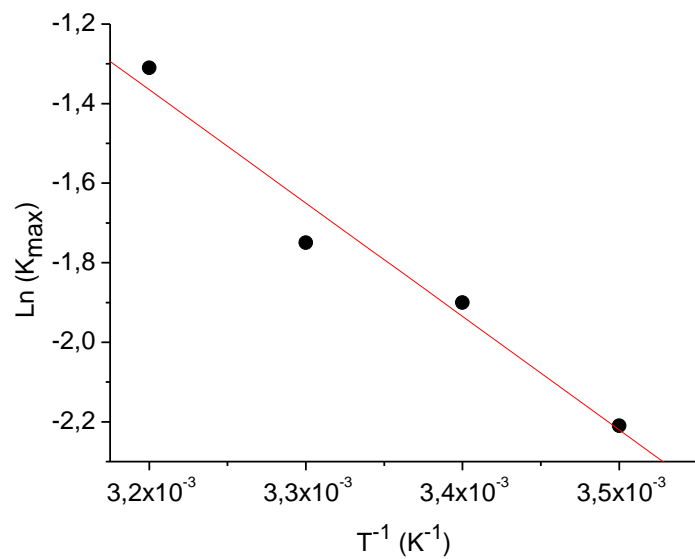
Una explicación posible para la cola observada durante el proceso de desinfección es un mecanismo basado en la teoría de que los procesos de inactivación se asemejan a reacciones químicas que pueden seguir vías diferentes. Las colas obtenidas están muy cercanas al límite de detección excepto para 10°C. Por tanto, las concentraciones residuales,  $C_{res}$ , calculadas mediante el ajuste al modelo, podrían ser consideradas insignificantes si se tiene en cuenta el error experimental. Sólo la concentración residual de bacteria encontrada a 10 °C puede ser considerada como resistente al tratamiento.

Como se muestra en la Figura 4.5, la constante cinética ( $k_{max}$ ) es mayor al aumentar la temperatura siguiendo una cinética tipo Arrhenius (Ec. 4.5), lo que permite predecir la velocidad de desinfección en el rango de temperaturas estudiado:

$$\ln(k_{max}) = 7.75 - 2850 \cdot T^{-1}; R^2 = 0.97 \quad (4.5)$$

donde  $k_{max}$  es la velocidad específica de inactivación ( $\text{min}^{-1}$ ), y  $T$  es la temperatura (K).

La temperatura afecta a la velocidad de las reacciones de desinfección de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (LeChevallier y Au, 2004) aunque esto no ocurre para algunos desinfectantes a bajas temperaturas. Sin embargo, hay numerosos ejemplos de procesos de desinfección con otros reactivos (cloro (Le Dantec *et al.*, 2002), ozono (Mariñas *et al.*, 1999), etc.) que siguen una correlación tipo Arrhenius. Este hecho se puede relacionar con los mecanismos de muerte celular causados por el ataque químico de radicales en biomoléculas claves en la célula bacteriana.



**Figura 4.5.** Valores de  $k_{max}$  frente a  $1/T$ . Los valores del eje de abscisas corresponden a las temperaturas ensayadas (10 – 40 °C).





## CAPÍTULO 5

---

### EFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN EL AGUA





## 5. EFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA EN LA INACTIVACIÓN BACTERIANA MEDIANTE FOTOFENTON SOLAR A pH NEUTRO

Uno de los principales retos en la desinfección de aguas depuradas es estudiar el efecto de la materia orgánica presente en el efluente a tratar. Por ello, este capítulo se centra en el estudio del efecto de la matriz acuosa, primero utilizando un modelo de materia orgánica conocido y, posteriormente, empleando una matriz más compleja que simule un efluente de una EDAR urbana.

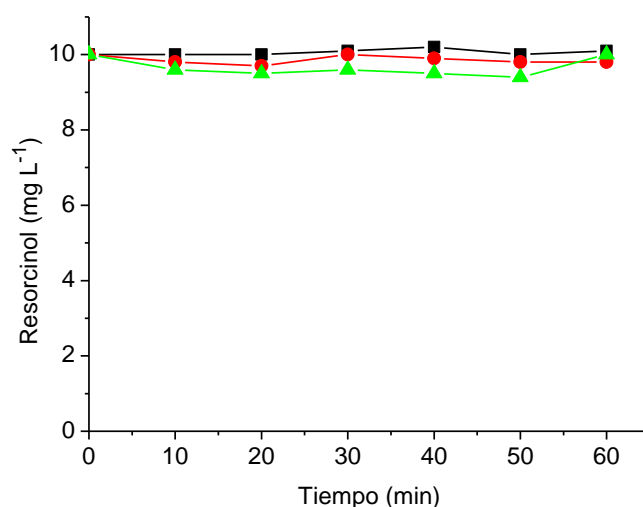
En primer lugar, se evalúa el papel de la molécula orgánica, resorcinol (considerado como modelo de MON), en el proceso de desinfección mediante foto-Fenton solar a pH neutro. Con este objetivo, se llevó a cabo un estudio profundo del efecto de las variables involucradas, así como de las dosis de reactivos y la concentración del compuesto orgánico en el proceso fotocatalítico. Para ello, se ensayó la inactivación de *E. faecalis* (sección 3.1.1) mediante UV-A, UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV-A/Fe<sup>2+</sup> y la reacción de Fenton. La desinfección de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar (UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>) se evaluó utilizando cuatro concentraciones iniciales diferentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup>. La concentración de resorcinol en todos los ensayos fue de 10 mg L<sup>-1</sup>. Finalmente, la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton se estudió con mayores concentraciones de resorcinol. Los experimentos se llevaron a cabo en reactores de tanque agitado de vidrio borosilicatado de 250 mL (sección 3.3.2), bajo la luz solar natural (30 ± 2 W m<sup>-2</sup> UV-A, sección 3.4.2) a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Posteriormente, para ensayar unas condiciones más reales y obtener resultados extrapolables a los esperados en planta, se estudió el efecto de la matriz acuosa en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton en reactores solares de tipo CPC de 7 L de capacidad (sección 3.3.4) y en diferentes matrices: disolución salina (como referencia, sección 3.2.1), agua destilada con resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup> de COD, sección 3.2.2) y un agua que simula el efluente de una EDAR urbana (sección 3.2.3).

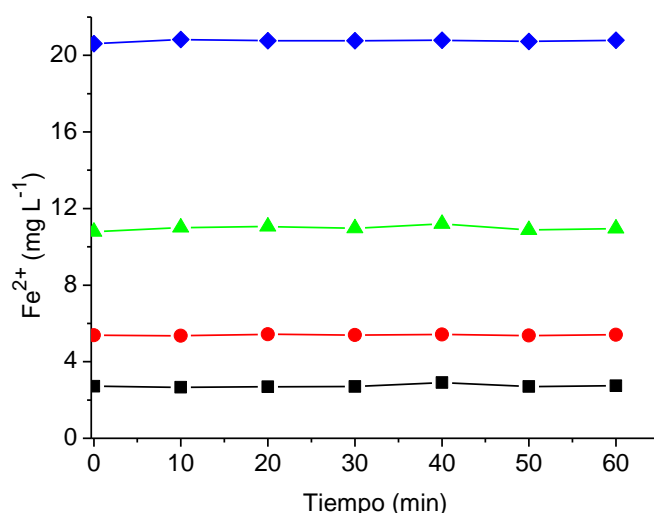
### 5.1. Estudio de la interacción del resorcinol con luz solar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup>

Previo al estudio del efecto del resorcinol en la inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton, se llevaron a cabo varios estudios preliminares con el objeto de determinar si la luz solar, así como la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o Fe<sup>2+</sup> producen degradación de la molécula de resorcinol. Estos ensayos se realizaron en ausencia de bacteria y con una concentración inicial de resorcinol de 10 mg L<sup>-1</sup>. En presencia de 30 W m<sup>-2</sup> de irradiancia UV-A no se observó degradación de

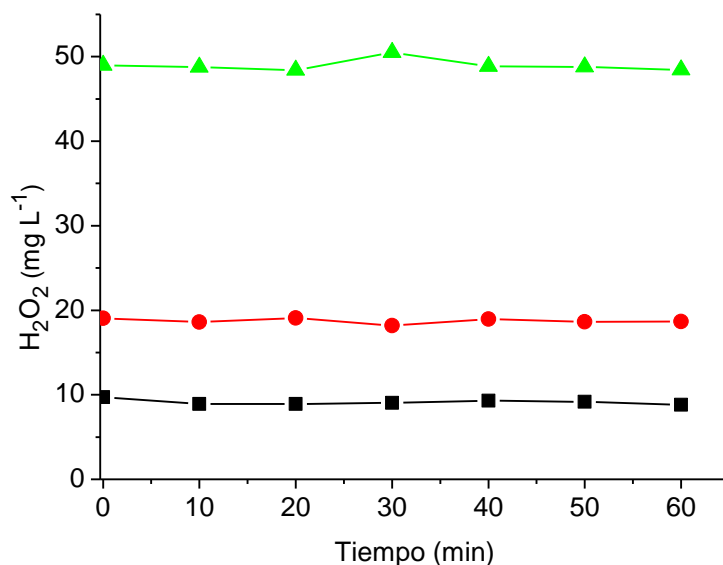
resorcinol (Figura 5.5.1), por lo que se puede descartar un efecto de foto-degradación de la molécula orgánica a dicha intensidad de radiación solar. Igualmente, la interacción con diferentes concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  (2.5, 5, 10 y 20  $\text{mg L}^{-1}$ ) no produjo degradación del resorcinol (Figura 5.1) y el hierro inicialmente añadido se mantuvo en disolución tras 60 min de ensayo (Figura 5.2). Por último, se evaluó el efecto de la interacción del resorcinol en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10, 20 y 50  $\text{mg L}^{-1}$ ). En este caso no se observó ni descomposición del peróxido de hidrógeno (Figura 5.3) ni degradación del resorcinol (Figura 5.1) después de 60 min de experimento.



**Figura 5.1.** Degradación de 10  $\text{mg L}^{-1}$  de resorcinol en presencia de: i) una irradiancia solar de 30  $\text{W m}^{-2}$  de UV-A (foto-degradación) (-■-), ii) 20  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  (-●-) y iii) 50  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-▲-).



**Figura 5.2.** Precipitación del hierro en presencia de 10  $\text{mg L}^{-1}$  de resorcinol y 2.5 (-■-), 5 (-●-), 10 (-▲-) y 20 (-◆-)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 5.3.** Evolución de la concentración de peróxido de hidrógeno en presencia de 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol y 10 (-■-), 20 (-●-) y 50 (-▲-) mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 5.2. Efecto de la luz solar y la combinación luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y luz solar/Fe<sup>2+</sup> en la inactivación de *E. faecalis* en presencia y ausencia de resorcinol

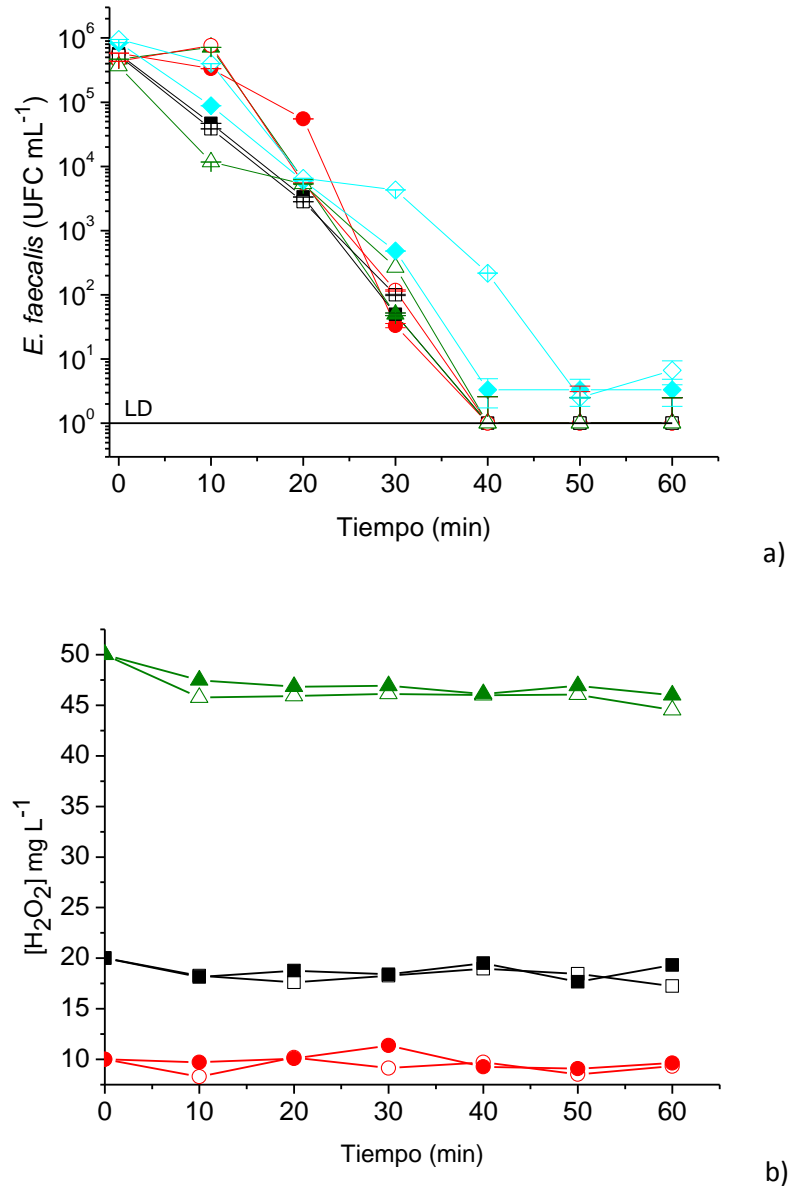
Una vez descartada la interacción del resorcinol con los reactivos de foto-Fenton en ausencia de bacteria, se determinaron los efectos individuales y combinados de la luz solar con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup> en la inactivación de *E. faecalis*. Para tal fin, se llevaron a cabo los siguientes experimentos en ausencia y en presencia de 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol utilizando una concentración inicial de *E. faecalis* de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>:

- i) luz solar
- ii) luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- iii) luz solar/Fe<sup>2+</sup>

i) La mera exposición de las bacterias a la luz solar (SODIS) tuvo un alto poder desinfectante, aunque no se alcanzó el límite de detección independientemente de la adición de resorcinol (Figura 5.4). La foto-inactivación observada es probablemente debida a la excitación de foto-sensibilizadores tales como compuestos aromáticos que promueven el ataque a los constituyentes celulares por las especies reactivas de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>•</sup>, HO<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etc.) o daños al ADN causados por la acción de radicales hidroxilo (Robertson *et al.*, 2005). Un foto-sensibilizador endógeno excitado puede reaccionar comúnmente con el oxígeno circundante o reaccionar directamente con biomoléculas celulares dando lugar en ambos casos a la generación de

especies reactivas de oxígeno. En el último caso, las especies generadas atacan directamente a las proteínas y lípidos de la membrana celular aumentando así la permeabilidad de la membrana y comprometiendo la viabilidad celular (Imlay *et al.*, 2008). Kadir y Nelson demostraron que en aguas de estanque expuestas a la luz solar la inactivación de *E. faecalis* se debe principalmente a mecanismos exógenos controlados por longitudes de onda en el rango UV-A y visible (Kadir y Nelson, 2014). Sin embargo, la inactivación de *E. coli* está dominada por mecanismos endógenos controlados por la luz UV-B, con una menor contribución de luz UV-A.

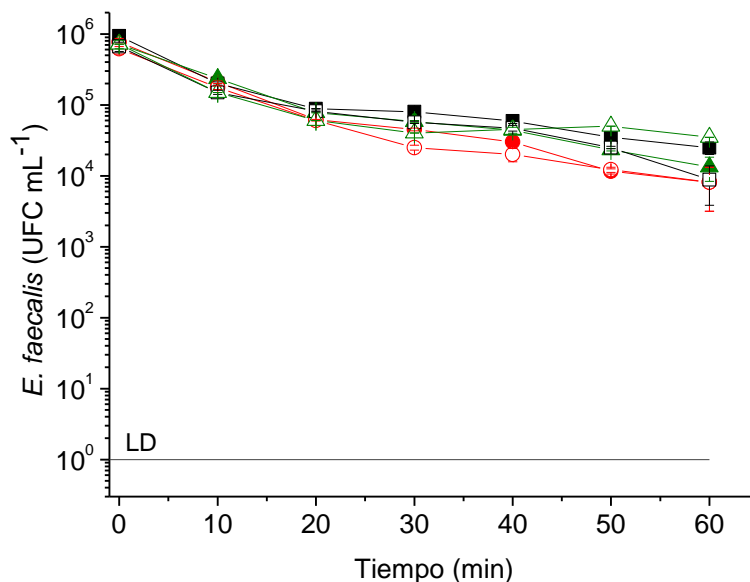
ii) La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10, 20 y 50 mg L<sup>-1</sup>) mejoró la inactivación bacteriana, puesto que el límite de detección fue alcanzado en 40 min (Figura 5.4). El daño bacteriano fue independiente de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puesto que la acción de la luz solar junto con la menor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mg L<sup>-1</sup>) ya fue nociva para la bacteria. Otros autores también han demostrado el efecto letal de la combinación luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre diversos microorganismos en agua (Feuerstein *et al.*, 2006; Imlay *et al.*, 2008; Sichel *et al.*, 2009; López *et al.*, 2012). La inactivación es inducida por varios daños tales como el ataque al ADN por parte de las especies reactivas de oxígeno producidas por la luz solar (Robertson *et al.*, 2005). También pueden producirse reacciones de Haber-Weiss que tienen lugar cuando aumenta el nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular y reacciona con el hierro libre interno generando radicales hidroxilo que tienen un efecto letal sobre las células (Sichel *et al.*, 2009; Spuhler *et al.*, 2010). Durante estos ensayos se midió la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y no se detectó ningún consumo significativo en ausencia de resorcinol (Figura 5.4b). El descenso de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a su difusión dentro de la célula es depreciable comparado con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido. Por tanto, no hay una correlación entre el descenso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el efecto desinfectante a concentraciones similares de peróxido de hidrógeno, como previamente han demostrado otros autores (Polo-López *et al.*, 2011). Igualmente, cuando se añadió la molécula orgánica, no se observó ningún consumo significativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 5.4b) y, consecuentemente la concentración de resorcinol no disminuyó durante los experimentos.



**Figura 5.4.** Efecto del resorcinol en el proceso luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en función de la concentración inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>): 0 (-♦-); 10 (-●-); 20 (-■-) y 50 (-▲-) en: **a)** la inactivación de *E. faecalis* y **b)** concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Símbolos cerrados: 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol. Símbolos abiertos: sin resorcinol.

iii) Finalmente, se estudió la inactivación de *E. faecalis* durante el proceso luz solar/Fe<sup>2+</sup> (2.5, 5, 10 y 20 mg L<sup>-1</sup>) en ausencia o presencia de 10 mg L<sup>-1</sup> de resorcinol. Los resultados de inactivación fueron muy similares para todas las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> evaluadas tanto con o sin resorcinol añadido (Figura 5.5). Como previamente han sugerido otros autores en ensayos de inactivación de *E. coli* (Spuhler *et al.*, 2010), probablemente el Fe<sup>2+</sup> difunde dentro de las células y cataliza la reacción de Fenton utilizando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabólico, conduciendo a la generación de

radicales hidroxilo (Anjem e Imlay, 2012). Sin embargo, el proceso de desinfección es significativamente menos eficiente en presencia de luz solar y  $\text{Fe}^{2+}$  respecto a los experimentos de SODIS (Figura 5.4).



**Figura 5.5.** Inactivación de *E. faecalis* mediante luz solar/ $\text{Fe}^{2+}$  con 2.5 (-●-), 5 (-■-) y 20 (-▲-)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . Símbolos cerrados: 10  $\text{mg L}^{-1}$  resorcinol. Símbolos abiertos: sin resorcinol.

### 5.3. Inactivación de *E. faecalis* en presencia y ausencia de resorcinol mediante la reacción de Fenton

Para estudiar el efecto de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+}$  de forma conjunta en oscuridad (reacción de Fenton) en la inactivación bacteriana a pH neutro, se evaluaron dos concentraciones, una baja (2.5  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  y 5  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y una alta (20  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  y 50  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) de reactivos, en presencia y en ausencia de resorcinol (10  $\text{mg L}^{-1}$ ). Cuando se usaron las concentraciones menores, a pesar de haber añadido resorcinol, la concentración bacteriana permaneció constante (10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) durante el experimento (Figura 5.6a). Esto puede ser debido probablemente a que las condiciones experimentales no fueron lo suficientemente oxidantes, incluso en estas concentraciones el resorcinol no se degradó totalmente (Figura 5.6d).

Para la mayor concentración de reactivos, la inactivación de *E. faecalis* fue de 2-log (con resorcinol) y de 3.5-log (sin resorcinol) siendo completa la degradación de resorcinol a los 20 min de reacción Fenton (Figura 5.6d). Estos resultados muestran la competición entre los procesos de degradación y desinfección cuando en el agua están presentes materia orgánica y microorganismos simultáneamente durante el proceso. Estudios previos demuestran el efecto



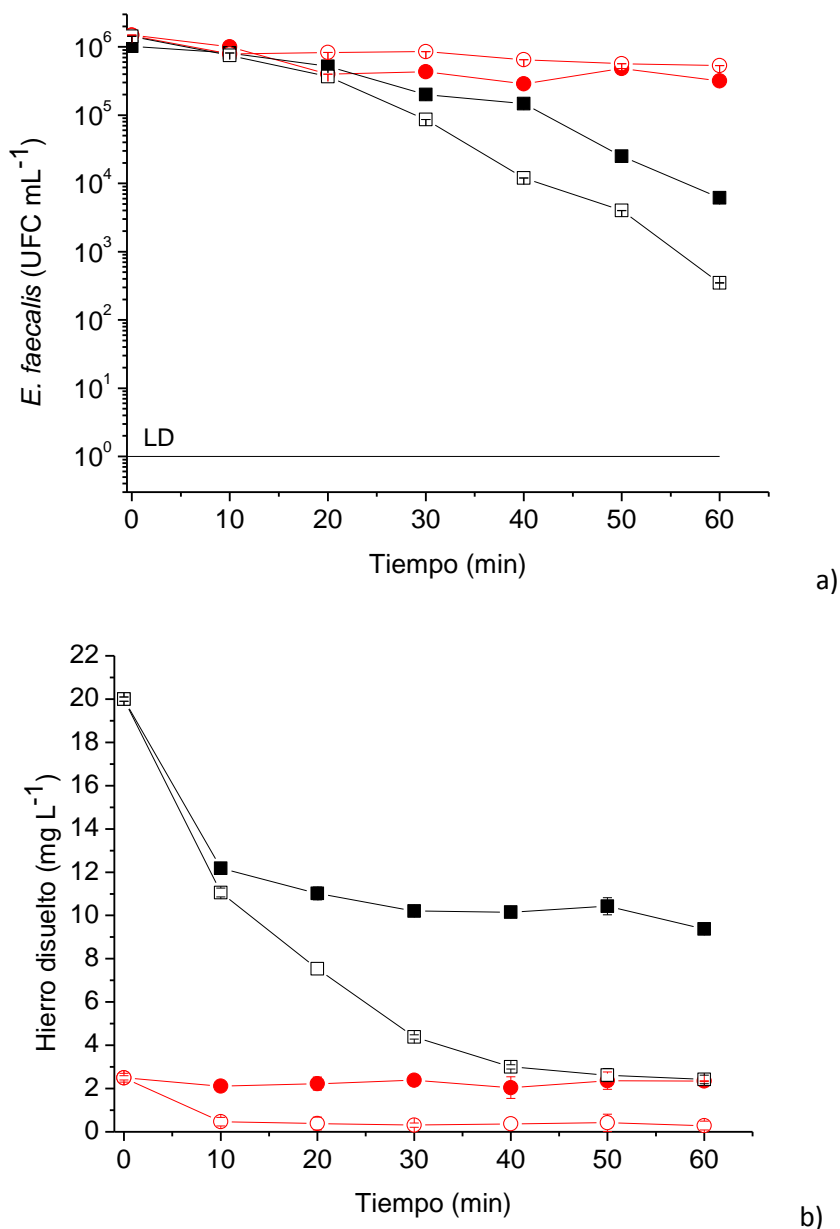
negativo en la desinfección de aguas con *E. coli* mediante  $\text{TiO}_2$  en presencia de isómeros de dihidroxibenceno como el resorcinol (Rincón y Pulgarín *et al.*, 2004a), metanol (Cho *et al.*, 2004) y azul de metileno (Marugán *et al.*, 2010).

En presencia de resorcinol, los radicales hidroxilo participan en la degradación de la materia orgánica y la inactivación bacteriana simultáneamente, debido a su baja selectividad. Sin embargo, cuando el resorcinol no está presente en disolución, existe una mayor cantidad de radicales hidroxilo disponibles para producir daños en las células de *E. faecalis*. Dicha afirmación se corrobora con los resultados de consumo de peróxido de hidrógeno durante la reacción de Fenton (Figura 5.6c). En ambos experimentos, con  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de resorcinol, el consumo de peróxido de hidrógeno fue más rápido puesto que la concentración de hierro disuelto fue mayor (Figura 5.6b y c) y, por tanto, la producción de especies oxidantes debería ser superior. No obstante, a pesar de estar presentes una mayor concentración de radicales, la competencia con la degradación de la materia orgánica reduce la inactivación de *E. faecalis*.

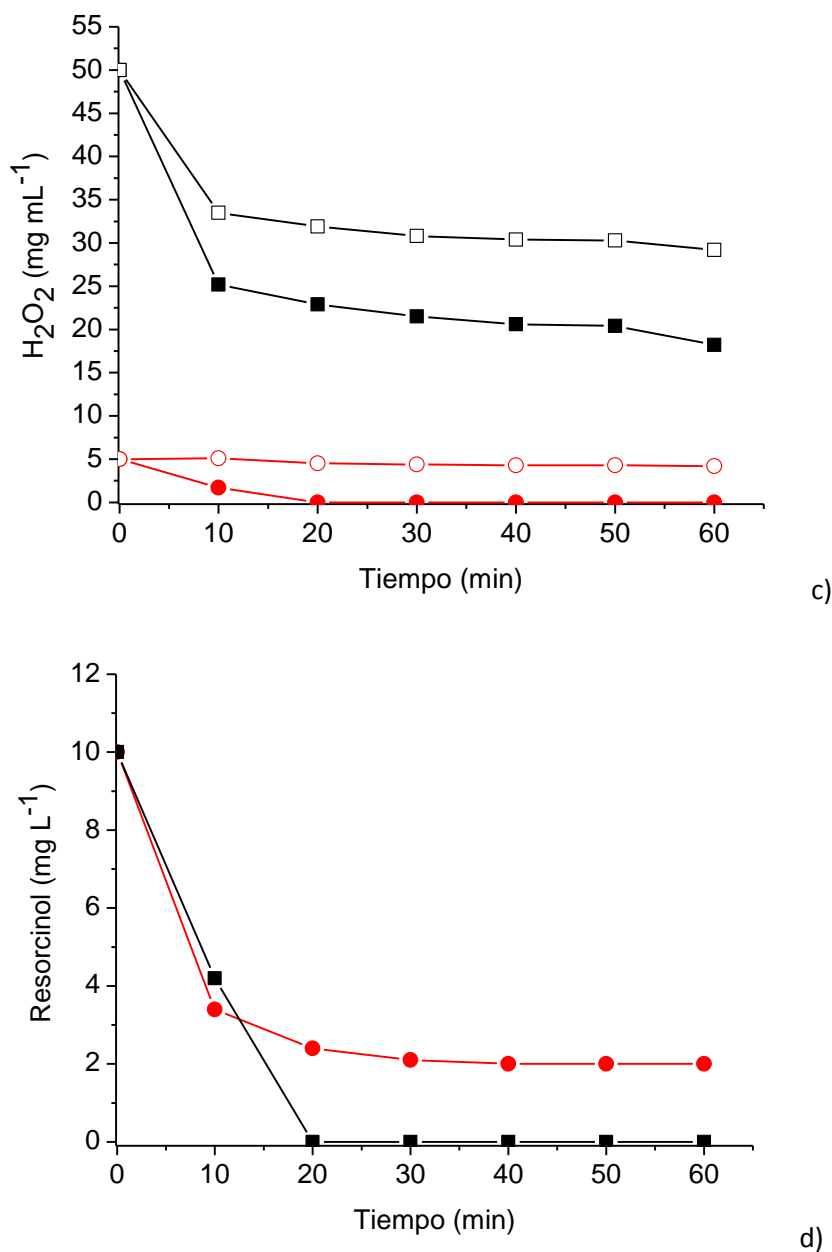
Durante el tratamiento Fenton, el resorcinol fue parcial o totalmente degradado (dependiendo de las condiciones oxidativas de la reacción de Fenton) por los radicales hidroxilo (Figura 5.6d) y el hierro se mantuvo en disolución a diferentes valores de concentración (Figura 5.6b). Cuando la concentración de hierro añadida fue de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , quedaron en disolución  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  a lo largo del tiempo experimental en presencia de resorcinol, y la concentración descendió hasta  $2 \text{ mg L}^{-1}$  en ausencia de resorcinol. Para el ensayo en el que se añadieron  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , el resorcinol ayudó a mantener esta concentración en disolución, mientras que en su ausencia el hierro disuelto descendió hasta casi  $0 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 5.6b).

Spuhler *et al.* demostraron que los intermedios generados durante la mineralización del resorcinol forman  $\text{Fe}^{3+}$ -organo-ligandos que son estables a pH cercanos al neutro, dando lugar a una mayor inactivación de *E. coli* en presencia de resorcinol (Suphlet *et al.*, 2010). Las diferencias respecto a las observaciones realizadas en esta investigación se pueden deber a la mayor concentración de reactivos usada, lo que garantiza suficiente hierro disuelto aunque el resorcinol no esté presente (Figura 5.6b). Por otro lado, *E. coli* (bacteria Gram-negativa) es más sensible al tratamiento que *E. faecalis* (bacteria Gram-positiva) (Polo-López *et al.*, 2011). La capa de peptidoglicano en *E. faecalis* es más gruesa que en *E. coli* y, por tanto, mucho más difícil de destruir. En aguas residuales que contienen bacterias sensibles como *E. coli*, una baja concentración de radicales hidroxilo es suficiente para alcanzar una desinfección adecuada, que es favorecida si hay hierro en disolución (Spuhler *et al.*, 2010). Por el contrario, durante el tratamiento de bacterias más resistentes, la presencia de compuestos orgánicos que son

fácilmente degradables por los radicales hidroxilo (como resorcinol u otras sustancias aromáticas) desfavorecen el proceso de desinfección. A pesar de que *E. coli* es una bacteria ampliamente estudiada, puede no ser un buen modelo para investigaciones en desinfección (García-Fernández *et al.*, 2012, Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014) debido a su elevada sensibilidad. Por tanto, se hace necesario investigar procesos de desinfección con microorganismos que sean menos vulnerables a las técnicas de desinfección.



**Figura 5.6.** Reacción de Fenton a dos niveles de concentraciones de  $H_2O_2/Fe^{2+}$  ( $mg L^{-1}$ ): 5/2.5 (-●-) y 50/20 (-■-): **a)** Inactivación de *E. faecalis* **b)** Evolución de la concentración de hierro disuelto. Símbolos cerrados: con  $10 mg L^{-1}$  de resorcinol. Símbolos abiertos: sin resorcinol.



**Figura 5.6.** Reacción de Fenton a dos niveles de concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ): 5/2.5 (-●-) y 50/20 (-■-): **c)** Evolución de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y **d)** Evolución de la concentración de resorcinol. Símbolos cerrados: con  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de resorcinol. Símbolos abiertos: sin resorcinol.

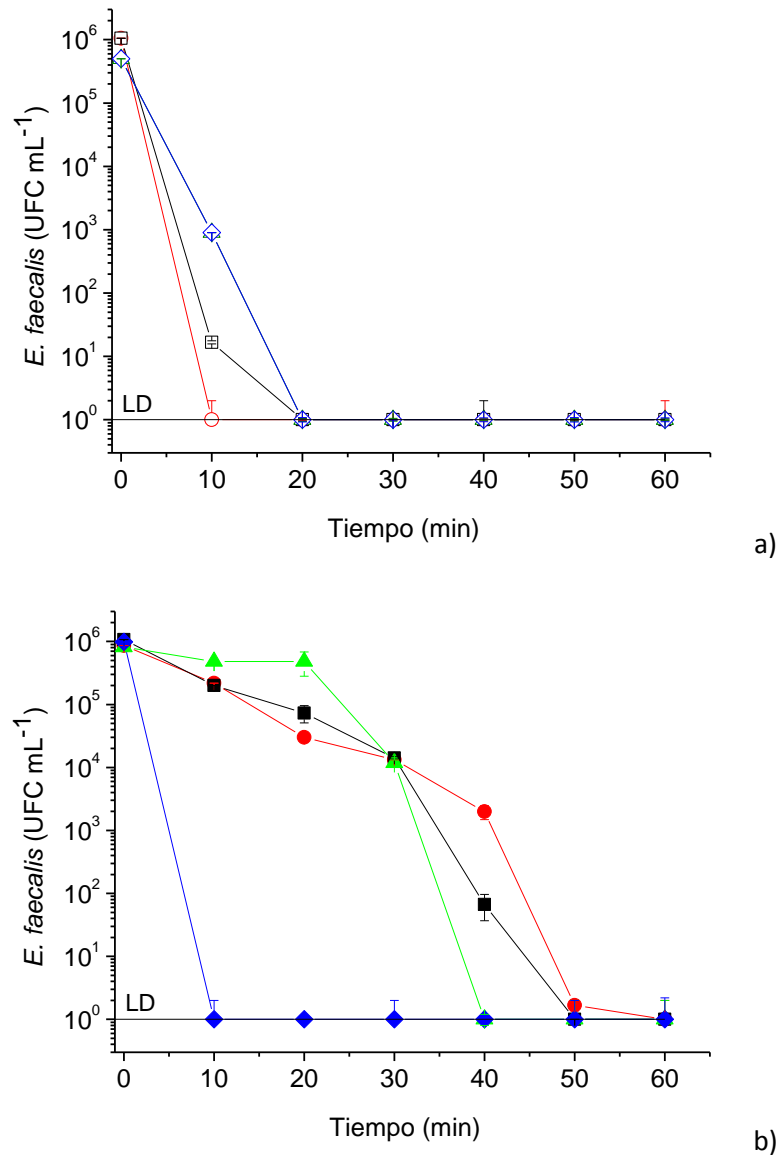
#### 5.4. Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro. Efecto de la presencia de resorcinol

A continuación, se evaluó la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro con y sin resorcinol ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) a diferentes concentraciones de reactivos  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 5/2.5, 10/5, 20/10, 50/20  $\text{mg L}^{-1}$  y en presencia de luz solar. Como muestra la Figura 5.7a, no hay diferencias

marcadas en la eficiencia de desinfección cuando el resorcinol no está presente en agua, independientemente de la concentración de los reactivos. No obstante, el hierro y el peróxido de hidrógeno tienen una influencia importante en la generación de radicales hidroxilo, ya que un incremento en su concentración inicial resulta en una mayor producción de radicales (Tokumura *et al.*, 2011). Por tanto, en principio cabría esperar una mayor eficiencia de desinfección en las condiciones más oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 50/20  $\text{mg L}^{-1}$ ). Sin embargo, en vista de los resultados obtenidos, la condición menos oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 5/2.5  $\text{mg L}^{-1}$ ) en presencia de luz solar produce el suficiente daño como para alcanzar una desinfección completa en un tiempo de reacción de menos de 10 min. El ligero aumento en el tiempo de inactivación en las tres condiciones más oxidantes se puede explicar por el efecto de apantallamiento al que están sometidos los fotones en presencia de una mayor concentración de hierro en disolución.

Por el contrario, cuando el resorcinol está presente, se observa un retraso marcado en el proceso de desinfección comparado con el proceso sin resorcinol (Figura 5.7b). Estos resultados confirman, al igual que en el proceso Fenton, una competición entre los procesos de desinfección y degradación durante el tratamiento por foto-Fenton. Por otra parte, en presencia de una concentración de resorcinol constante (Figura 5.7b), la inactivación de *E. faecalis* mejora al aumentar las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  de 5/2.5 a 50/20  $\text{mg L}^{-1}$  porque se favorece la generación de especies oxidantes. Esta hipótesis se confirma con los resultados obtenidos a mayores concentraciones de reactivos ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 50/20  $\text{mg L}^{-1}$ ), donde la desinfección es independiente de la adición de resorcinol. A esta concentración, la generación de radicales es tan elevada que el ataque a los anillos del resorcinol no tiene un efecto notable en la inactivación bacteriana y la competencia es inapreciable (Figuras 5.7a y 7b).

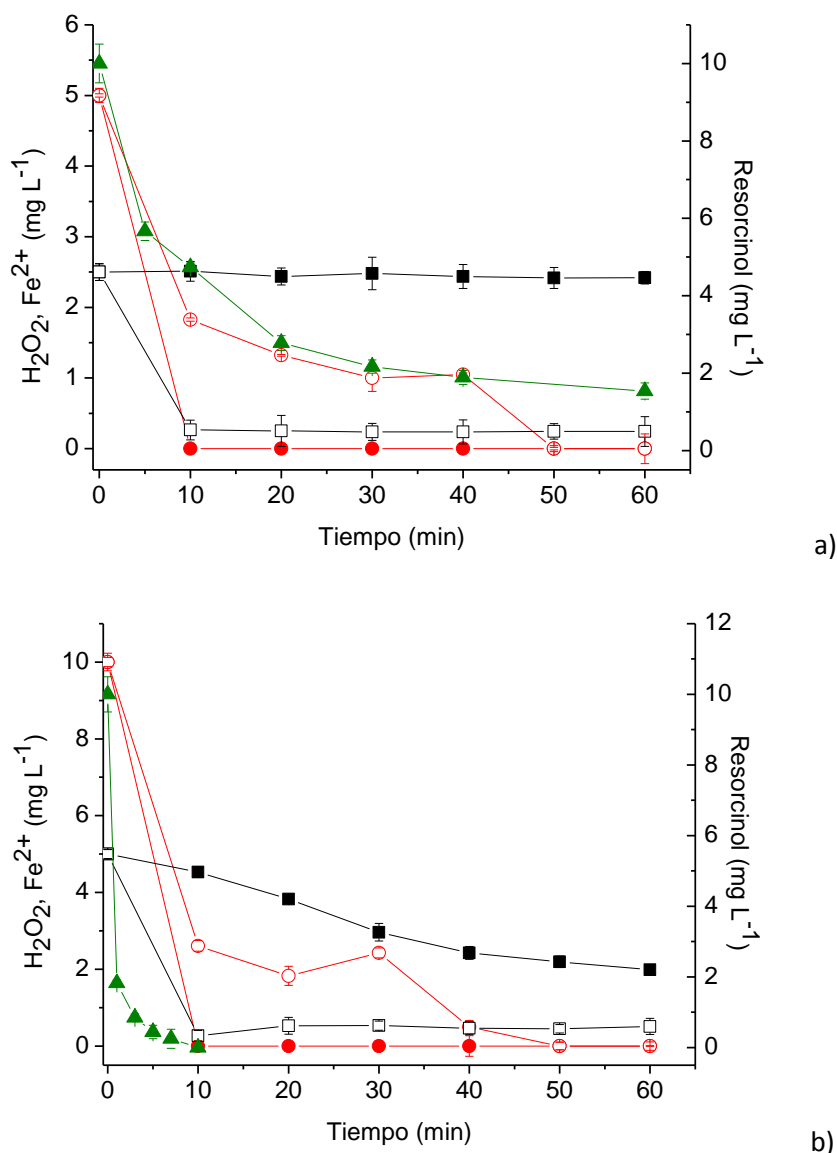
Recientemente, se ha demostrado que existe una competición por las especies oxidantes entre la degradación de la materia orgánica y la inactivación microbiana durante la reacción de foto-Fenton. Polo-López *et al.* observaron una clara competición entre la materia orgánica y esporas de *Fusarium solani* por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , radicales hidroxilo y otras especies reactivas de oxígeno en el proceso foto-catalítico (Polo-López *et al.*, 2012). En este estudio, la inactivación de esporas se vio desfavorecida respecto a la mineralización de la materia orgánica. Un estudio reciente de los mismos autores, confirma este resultado con *Fusarium* para varios procesos avanzados de oxidación solares, incluyendo fotocátalisis heterogénea, homogénea y  $\text{H}_2\text{O}_2$  con luz solar, siendo la materia orgánica la presente en efluentes de EDAR (Polo-López *et al.*, 2014).



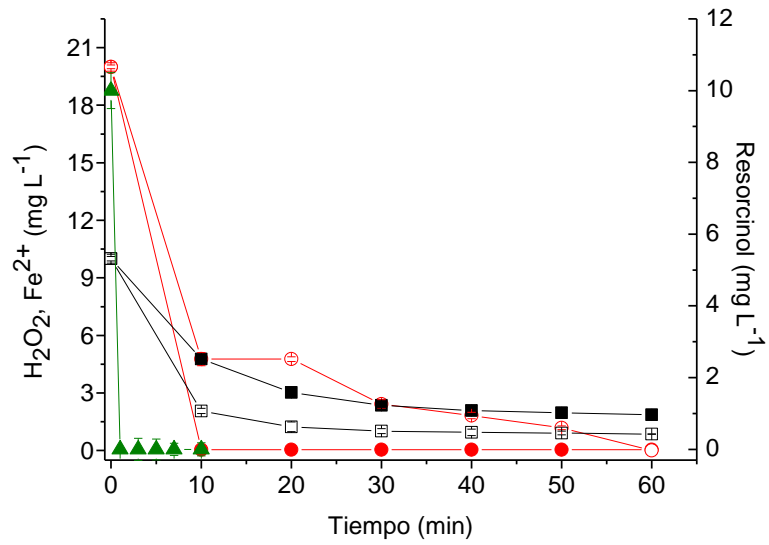
**Figura 5.7.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton: **a)**  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 5/2.5 (○-), 10/5 (□-), 20/10 (△-) y 50/20 (◇-)  $\text{mg L}^{-1}$  sin resorcinol y **b)**  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 5/2.5 (●-), 10/5 (■-), 20/10 (▲-) y 50/20 (◆-)  $\text{mg L}^{-1}$  con resorcinol (10  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Cuando el resorcinol está presente durante el proceso de desinfección, el comportamiento del consumo de peróxido de hidrógeno es crítico a la hora de explicar las diferencias observadas. Como en el proceso Fenton, independientemente de la concentración de reactivos, el consumo de peróxido de hidrógeno fue más rápido cuando se añadió resorcinol (Figura 5.8). El mismo comportamiento se observó en experimentos de referencia realizados sin bacterias (datos no mostrados). En las cuatro condiciones de reactivos evaluadas, al añadir resorcinol, los intermedios de la foto-degradación del resorcinol fueron capaces de mantener aproximadamente 2.5  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  en disolución. Cuando no se añadió resorcinol, la concentración de hierro fue 0.2, 0.5, 0.8 y 2.2  $\text{mg L}^{-1}$  a las concentraciones iniciales de 2.5, 5, 10 y

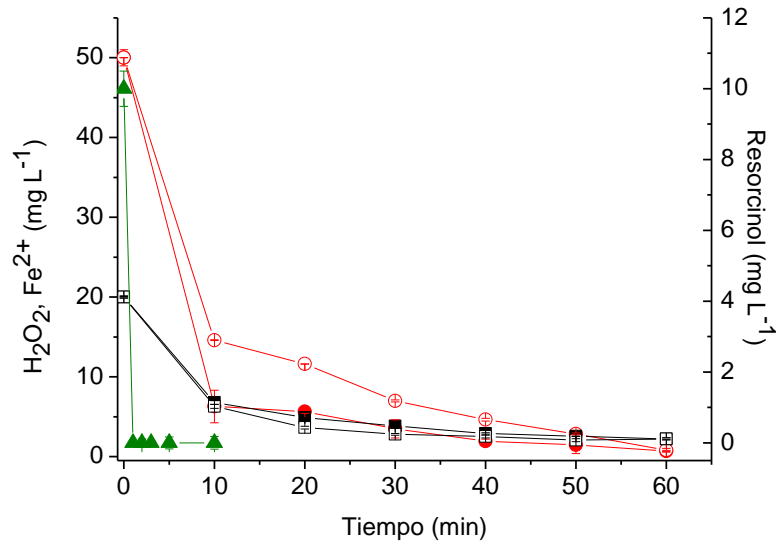
20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> respectivamente (Figura 5.8). Estas concentraciones bajas de hierro fueron suficientes para promover una inactivación completa (hasta el límite de detección) de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro. El resorcinol se degradó en todos los casos en menos de 5 min, excepto para las menores concentraciones de reactivos, donde se alcanzó el 80% de degradación a los 60 min de tratamiento (Figura 5.8). El mismo comportamiento y velocidad de degradación del resorcinol se observó en los blancos de foto-Fenton (Figura 5.9), lo que demuestra la alta probabilidad de ataque a la molécula orgánica por los radicales hidroxilo formados durante el tratamiento mediante foto-Fenton solar.



**Figura 5.8.** Concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-●-), Fe<sup>2+</sup> (-■-) y resorcinol (-▲-) durante la desinfección de *E. faecalis* mediante foto-Fenton en presencia de resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup>) a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>: a) 5/2.5 y b) 10/5 mg L<sup>-1</sup>. Símbolos abiertos: sin resorcinol añadido.

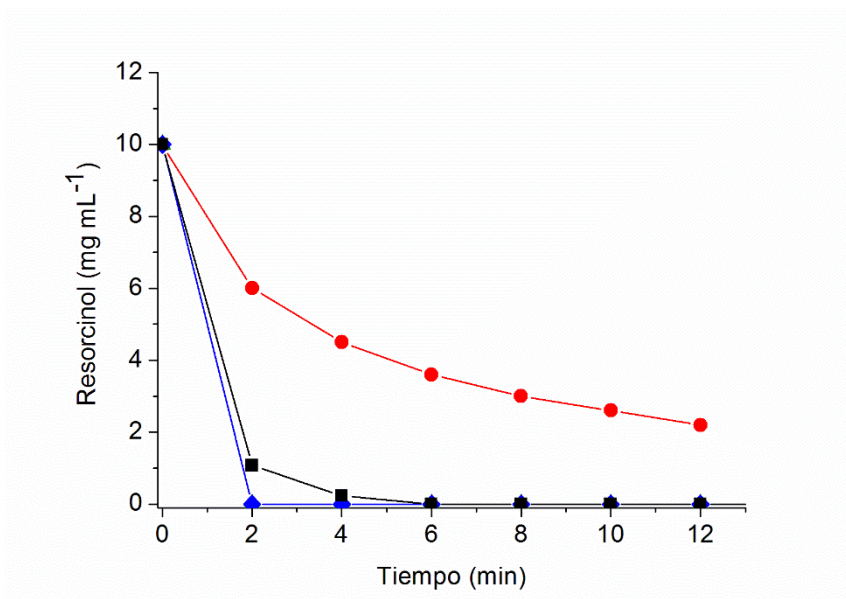


c)



d)

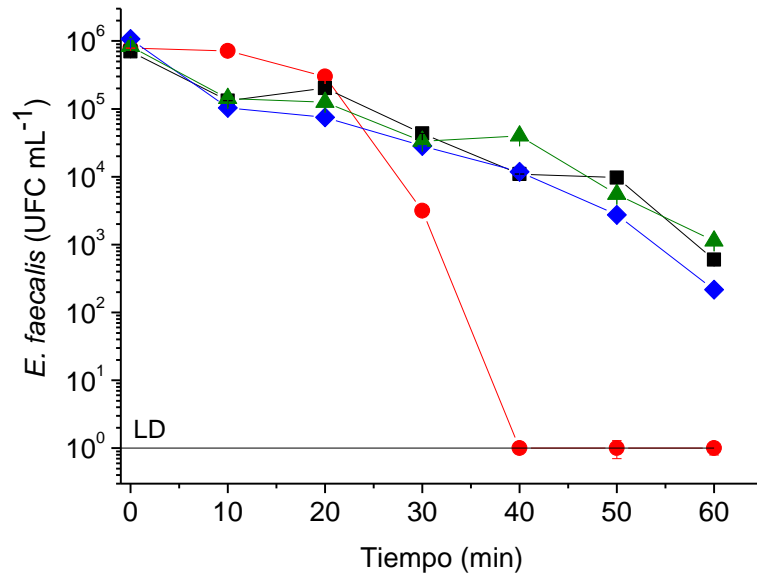
**Figura 5.8.** Concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-●-),  $\text{Fe}^{2+}$  (-■-) y resorcinol (-▲-) durante la desinfección de *E. faecalis* mediante foto-Fenton en presencia de resorcinol ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : **c)**  $20/10$  y **d)**  $50/20 \text{ mg L}^{-1}$ . Símbolos abiertos: sin resorcinol añadido.



**Figura 5.9.** Degradación del resorcinol durante el proceso foto-Fenton en ausencia de bacteria a las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  de: 5/2.5 (-●-), 10/5 (-■-), 20/10 (-▲-) y 50/20 (-◆-)  $\text{mg L}^{-1}$ .

Con el fin de corroborar la competencia entre los procesos de desinfección y foto-oxidación química, se llevaron a cabo experimentos simultáneos de foto-Fenton solar con  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentando la concentración de resorcinol inicial ( $10, 20, 30$  y  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , Figura 5.10). Para la concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de resorcinol el límite de detección se alcanzó a los 40 min, mientras que para las concentraciones de  $20, 30$  y  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de resorcinol la inactivación de *E. faecalis* fue aproximadamente de 3-log a los 60 min, no obteniéndose diferencias significativas entre las tres concentraciones. La degradación de resorcinol fue completa en el ensayo con una concentración inicial de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Sin embargo, con  $20, 30$  y  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de resorcinol se degradaron el 78, 45 y 40%, respectivamente, lo que supone aproximadamente una reducción de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de la molécula orgánica en los tres ensayos. Por tanto, se puede concluir que la degradación de resorcinol para concentraciones iguales o mayores de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  se encuentra limitada por las condiciones oxidantes. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de ajustar la concentración de los reactivos de foto-Fenton en función de la concentración de la materia orgánica del agua a tratar para lograr una inactivación completa durante el proceso de desinfección de efluentes depurados.





**Figura 5.10.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ : 10/5 mg L<sup>-1</sup>) con 10 (●-), 20 (■-), 30 (▲-) y 40 (◆-) mg L<sup>-1</sup> de resorcinol.

### 5.5. Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar en reactores tipo CPC y con diferentes tipos de matrices

Los resultados anteriores evidencian que durante el tratamiento de aguas mediante foto-Fenton solar a pH neutro la materia orgánica juega un papel muy importante en la inactivación bacteriana. Consecuentemente, para poder extrapolar los resultados obtenidos a los esperados en un sistema real de desinfección de aguas depuradas, es necesario tener en cuenta la complejidad de la matriz orgánica presente así como el sistema de reacción; generalmente plantas de fotocatalisis solar diseñadas para tal fin. Por tanto, para evaluar los resultados en condiciones más cercanas a la realidad, se procede a realizar los experimentos en reactores de tipo CPC, bajo iluminación solar natural, con 7 L de capacidad y tres matrices de agua diferentes:

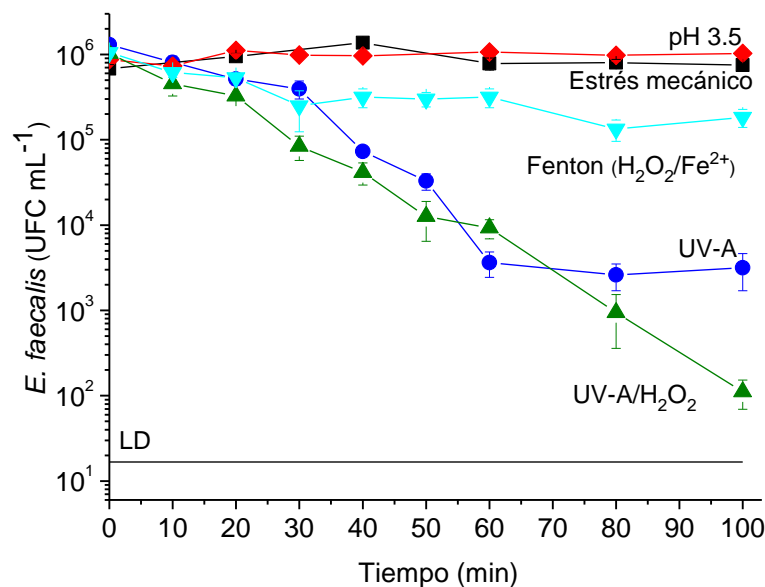
- i) Disolución salina (agua destilada al 0.9% de NaCl) que constituye el experimento de referencia.
- ii) Agua destilada con 10 mg L<sup>-1</sup> de COD de resorcinol.
- iii) Agua que simula el efluente secundario de una EDAR.

5.5.1. Efecto de las variables individuales y combinadas involucradas en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro en disolución salina

Se evaluó el efecto de las variables individuales y combinadas que están involucradas en la inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar, bajo las nuevas condiciones experimentales anteriormente descritas. Los ensayos llevados a cabo fueron:

- i) En oscuridad y sin adicionar ningún reactivo, para evaluar el efecto del estrés mecánico en las células.
- ii) A pH 3.5 en las mismas condiciones que el apartado i), para estudiar la viabilidad de las células a pH ácido.
- iii) En presencia de luz solar y sin adicionar ningún reactivo.
- iv) En presencia de luz solar y  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ).
- v) Reacción de Fenton ( $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ).

Como se observa en la Figura 5.11, la viabilidad de *E. faecalis* no se vio afectada ni por el estrés mecánico en el reactor ni por las condiciones ácidas de la disolución (pH 3.5). Sin embargo, el proceso Fenton fue capaz de reducir la concentración de *E. faecalis* desde  $10^6$  a  $10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  y la exposición a la luz solar produjo un descenso de 2-log en la población bacteriana debido a los mismos mecanismos discutidos en las secciones 5.2 y 5.3. La inactivación por luz solar se mejoró en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dando lugar a un descenso de 4-log en la concentración bacteriana, en línea con los resultados aportados por Imlay *et al.* (Imlay *et al.*, 2008). Como ya se ha comentado anteriormente, el efecto combinado de la luz solar y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una buena técnica para la desinfección de aguas contaminadas (Sichel *et al.*, 2009; Polo-López *et al.*, 2010). La acción conjunta de la luz solar y el proceso Fenton interno producido al incrementarse los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelulares y reaccionar con el hierro libre interno (reacciones de Haber-Weiss) generan radicales hidroxilo con un fuerte poder bactericida (Pignatello *et al.*, 2006; Sichel *et al.*, 2009; Spuhler *et al.*, 2010; Polo-López *et al.*, 2010). Las concentraciones de COD y  $\text{H}_2\text{O}_2$  permanecieron constantes a lo largo del tratamiento luz solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos datos sugieren que las células bacterianas pueden ser dañadas por un proceso de foto-Fenton interno, que no afecta a la degradación de la materia orgánica disuelta en el agua.



**Figura 5.11.** Inactivación de *E. faecalis* en reactores tipo CPC en una matriz de disolución salina i) estrés mecánico (oscuridad) (■); ii) pH 3.5 (◆); iii) luz solar (●); iv) luz solar y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mg L<sup>-1</sup>) (▲) y v) Fenton (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) (▼).

#### 5.5.2. Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro en diferentes tipos de matrices

A continuación, se estudia el efecto de la matriz en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar en reactores tipo CPC. Para ello, se aumenta progresivamente la complejidad de la matriz: disolución salina (ensayo blanco), agua destilada con resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup> de COD) y un agua que simula el efluente secundario de una EDAR. Las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup> utilizadas en estos ensayos fueron 50 y 20 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, puesto que en los experimentos anteriores se demostró que son condiciones suficientemente oxidantes como para no verse perjudicada la inactivación bacteriana por la degradación de la materia orgánica.

En la disolución salina y en ausencia de materia orgánica, se obtuvo un descenso de 5-log en la concentración de *E. faecalis* alcanzando el límite de detección en 55 min de exposición solar (Figura 5.12a). Villén *et al.* observaron que el límite de detección en el tratamiento de un agua mineral conteniendo 10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *E. faecalis* no se alcanzó tras 5 h de iluminación solar empleando TiO<sub>2</sub> en un reactor CPC (Villén *et al.*, 2006). Por tanto, los resultados de esta tesis doctoral muestran que es posible reducir los tiempos de tratamiento para inactivar *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro respecto a la fotocatalisis heterogénea con TiO<sub>2</sub> en el mismo tipo de reactor solar. La reducción en el tiempo de

tratamiento es muy importante desde el punto de vista de la aplicación industrial, puesto que es un parámetro clave en la economía del proceso (Santos-Juanes *et al.*, 2011a; Sánchez-Pérez *et al.*, 2013).

El hecho de adicionar sal de hierro al agua a valores de pH neutros conduce a un descenso del pH de la disolución. Por esa razón, se observa una bajada de pH desde  $7.0 \pm 0.2$  a  $3.5 \pm 0.2$  y es necesario comprobar que la viabilidad de *E. faecalis* no esté comprometida a este pH ácido. Durante el ensayo a pH 3.5 (Figura 5.11) no se observó un descenso en la concentración bacteriana, por lo que se puede afirmar que la inactivación de *E. faecalis* observada en estos ensayos fue causada exclusivamente por el tratamiento foto-catalítico.

La curva de inactivación de *E. faecalis* en la Figura 5.12a muestra un retraso en la respuesta al tratamiento foto-catalítico al comienzo del experimento. Este comportamiento se observa comúnmente en la inactivación de algunos microorganismos (bacterias y hongos) en agua usando tratamientos de desinfección suaves tales como aplicación de calor (Geeraerd *et al.*, 2000), desinfección solar (Berney *et al.*, 2006; Ubomba-Jaswa *et al.*, 2008) y en algunos ensayos de desinfección foto-catalítica mediante  $\text{TiO}_2$  (Marugán *et al.*, 2008; Sichel *et al.*, 2009). Este hombro puede ser debido a que es necesario un tiempo para que las células bacterianas muestren el efecto del daño causado por un factor estresante como una fuente de calor, fotones UV-A y ROS. Posteriormente, esta fase es seguida por un descenso lineal hasta que se alcanza el límite de detección (Figura 5.12a). Para ajustar los datos experimentales con este comportamiento cinético, Marugán *et al.* propusieron una modificación del modelo clásico de desinfección de Chick-Watson que tiene en cuenta el retraso inicial con el parámetro  $t_0$  (tiempo de retardo) según la Ecuación 5.1 (Marugán *et al.*, 2008):

$$\log \frac{C}{C_0} = \begin{cases} 0 & \text{para } t \leq t_0 \\ -k'(t - t_0) & \text{para } t > t_0 \end{cases} \quad (5.1)$$

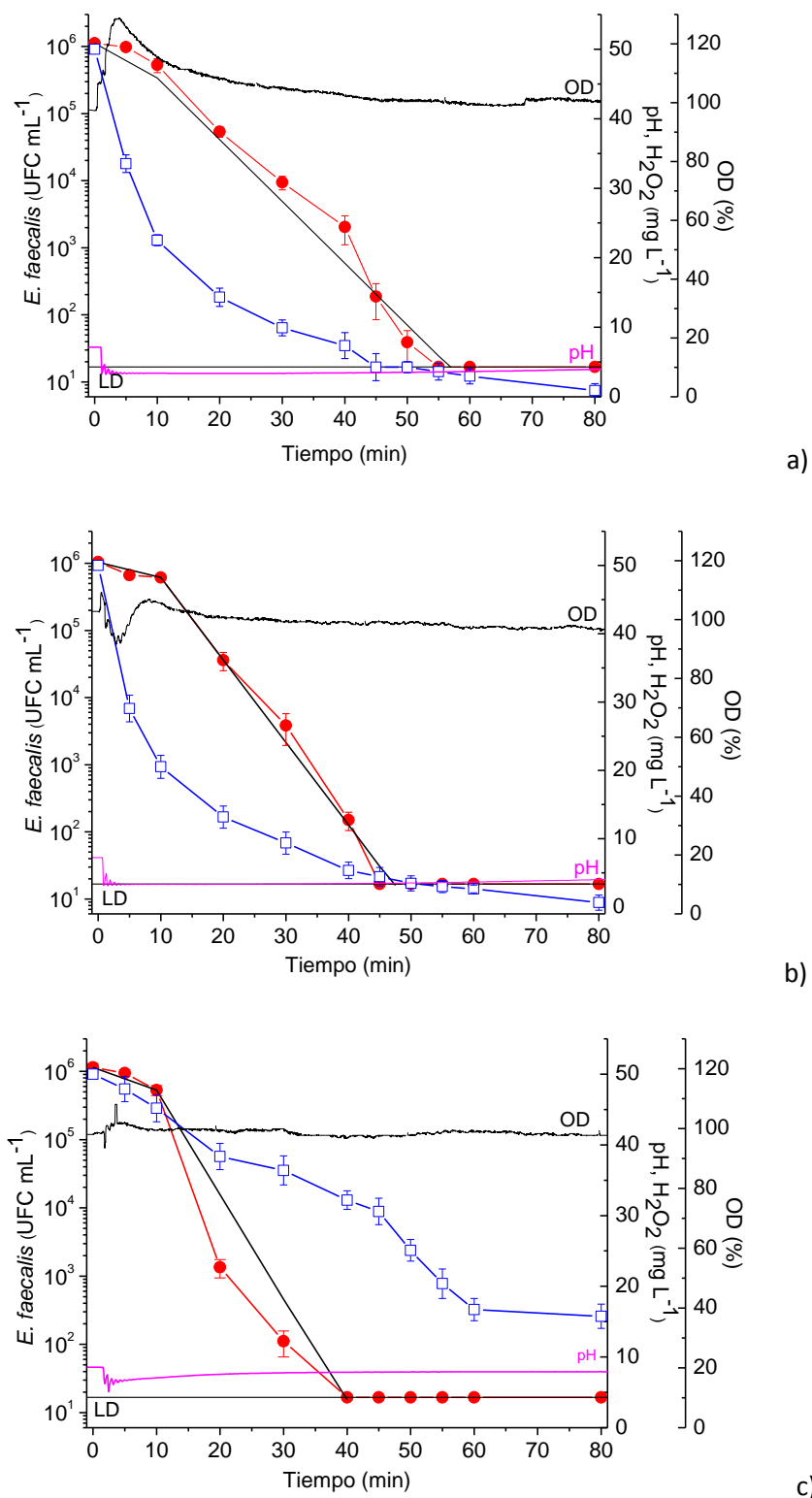
donde  $C/C_0$  representa la reducción en la concentración microbiana,  $k'$  es la constante cinética de desinfección y  $t$  es el tiempo de tratamiento. Los datos de inactivación de *E. faecalis* se ajustaron satisfactoriamente a la Ecuación 5.1 obteniendo una constante cinética  $k' = 0.193 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$  ( $R^2 = 0.98$ ) con un tiempo de retardo  $t_0 = 5 \text{ min}$ .

Una vez realizados los blancos de inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton en disolución salina, se procedió al estudio del efecto de la materia orgánica en la matriz acuosa. Para este fin se realizó un ensayo con  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono orgánico disuelto (aportados por resorcinol como modelo de MON) en agua destilada. La Figura 5.12b muestra que en este

ensayo se alcanza el límite de detección en 45 min. Asimismo, la constante cinética aumenta hasta  $0.294 \pm 0.016$  ( $R^2 = 0.97$ ) con un tiempo de retardo de 10 min. La mejora en la velocidad de desinfección es probablemente debida a la formación de complejos orgánicos con hierro que producen especies oxidantes en presencia de luz solar como se comentó anteriormente (Spuhler *et al.*, 2010). En la Figura 5.12b podemos observar como el consumo de  $H_2O_2$  fue más rápido cuando se añadió resorcinol ( $0.27 \text{ mM min}^{-1}$ ) que en el ensayo blanco ( $0.12 \text{ mM min}^{-1}$ ). El peróxido de hidrógeno reacciona rápidamente y parte de los radicales hidroxilo generados se emplean para oxidar la materia orgánica aportada por el resorcinol y, consecuentemente, la concentración de COD disminuye (desde 13 a  $4 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Durante el proceso foto-catalítico los radicales hidroxilo pueden generar  $O_2$  al reaccionar con el peróxido de hidrógeno presente todavía en el agua o con otros radicales. Así, la evolución del proceso foto-Fenton puede seguirse monitorizando la concentración de oxígeno disuelto (Santos-Juanes *et al.*, 2011b). En la Figura 5.12a, puede observarse que en los primeros minutos de reacción se produce un incremento del oxígeno disuelto debido a un exceso de radicales hidroxilo que pueden reaccionar con el  $H_2O_2$  u otros radicales. Por el contrario, cuando el resorcinol está presente, al comienzo de la reacción se observa un marcado descenso de la concentración de oxígeno disuelto (Figura 5.12b). Cuando se degradan los anillos aromáticos de la molécula de resorcinol el oxígeno molecular se consume a través las reacciones tipo Dorfmann (Dorfmann *et al.*, 1962). Una vez que las reacciones consumidoras de oxígeno finalizan, se observa una generación neta de oxígeno y, finalmente, la concentración disminuye lentamente debido a la desorción del oxígeno para alcanzar el valor de equilibrio.

Cuando las bacterias son inicialmente dañadas por las especies oxidantes generadas durante el tratamiento solar, el proceso de desinfección continúa debido a los efectos de los radicales oxidantes,  $H_2O_2$  y radiación UV. El  $H_2O_2$  extracelular debilita las paredes celulares, volviendo a la bacteria más sensible al estrés oxidante y esto podría explicar la inactivación observada (Hyslop *et al.*, 1995; Rincón y Pulgarín, 2006; Imlay, 2008; Sciacca *et al.*, 2010). El agotamiento del  $H_2O_2$  no implica que finalice el proceso de desinfección, puesto que la respuesta transcripcional al daño causado en el ADN se retrasa (Peeters *et al.*, 2010).



**Figura 5.12.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar en reactor tipo CPC (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) en: **a)** disolución salina; **b)** disolución salina y resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup> de COD) y **c)** Efluente simulado de EDAR. *E. faecalis* UFC mL<sup>-1</sup> (●); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup> (□); ajuste de los datos experimentales de la inactivación de *E. faecalis* al modelo de Chick-Watson modificado (-).

Sin embargo, aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es considerado tóxico para la bacteria a bajas concentraciones de oxidante, sus productos de disociación, tales como los radicales hidroxilo y superóxido, son especies reactivas de oxígeno letales para las células. Estas especies pueden promover reacciones en lípidos, proteínas y ADN produciendo un efecto tóxico en los microorganismos. Además, como se comentó anteriormente, la presencia simultánea de hierro y  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce a reacciones de Fenton (Spuhler *et al.*, 2010; Polo-López *et al.*, 2012), dando lugar a la formación adicional de radicales hidroxilo con el consiguiente efecto bactericida.

La materia orgánica de un efluente procedente del tratamiento secundario de una EDAR es diversa y compleja. En consecuencia, es difícil extrapolar los resultados obtenidos con una única molécula orgánica a los esperados en el proceso de desinfección de un efluente real. Con este fin, se llevó a cabo la desinfección de *E. faecalis* mediante foto-Fenton a pH neutro con agua residual depurada artificial conteniendo  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de COD (descrita en la sección 3.2.3) puesto que la concentración usual de COD en este tipo de efluentes es de  $10\text{-}30 \text{ mg L}^{-1}$ . Utilizando el efluente de EDAR artificial como matriz, se observó una ligera mejora en la inactivación de *E. faecalis* (Figura 5.12c), ya que el límite de detección se alcanzó después de 40 min de exposición al tratamiento. Otros autores demostraron un retardo del proceso en condiciones similares; por ejemplo, se necesitaron mayores tiempos de tratamiento (180 min) para alcanzar la misma disminución en la concentración de *E. faecalis* mediante desinfección foto-catalítica con  $\text{TiO}_2$  en un efluente simulado de EDAR usando un fotorreactor de laboratorio (Van Grieken *et al.*, 2010). Si se comparan los resultados del ensayo con agua simulada con los obtenidos con resorcinol como matriz, se puede observar un incremento del 25% en la constante cinética ( $t_0 = 10 \text{ min}$ ,  $k' = 0.330 \pm 0.019$ ,  $R^2 = 0.98$ ). Asimismo, en los resultados obtenidos en ambas matrices de agua únicamente se observan 5 min de diferencia para alcanzar el límite de detección (Figuras 5.12b y 5.12c). Estos resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los ensayos de desinfección mediante foto-Fenton con las dos matrices. Sin embargo, como se detalló anteriormente, en presencia de materia orgánica hay una mayor cantidad de hierro en disolución (Spuhler *et al.*, 2010), lo que permite generar una mayor cantidad de especies oxidantes. Por otro lado, la población bacteriana en el efluente artificial de EDAR puede estar en plena actividad metabólica debido a la presencia de nutrientes, lo que hace a la bacteria más vulnerable al ataque de las especies oxidantes.

El consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue mayor en presencia de resorcinol que con el efluente (Figuras 5.12b y 5.12c) puesto que la materia orgánica usada para la formulación del efluente simulado de EDAR está compuesta principalmente por proteínas, las cuales son difíciles de mineralizar

mediante foto-Fenton. Esto se confirmó con la evolución del COD, que fue constante durante el experimento con efluente artificial. Además, la evolución del oxígeno disuelto en este ensayo también evidencia que no hubo mineralización de la materia orgánica por foto-Fenton (Figura 5.12c). Estos resultados muestran que la oxidación de la materia orgánica por foto-Fenton no está directamente relacionada con una alta eficiencia del proceso de desinfección. Durante los primeros minutos del ensayo con efluente simulado, el pH descendió de  $8.4 \pm 0.2$  a  $3.4 \pm 0.2$  y después su valor se fue aumentando hasta alcanzar un pH de  $7.7 \pm 0.2$  (Figura 5.12c). Por tanto, después del tratamiento mediante foto-Fenton no sería necesaria la neutralización del agua tratada para su posterior reutilización.

Si se compara el proceso de desinfección llevado a cabo en la disolución salina (Figura 5.12a) y en efluente simulado de EDAR (Figura 5.12c), se observa la influencia positiva que tiene la materia orgánica en el proceso de inactivación. La constante cinética de desinfección aumenta un 66% debido a la presencia de materia orgánica, y en consecuencia, el límite de detección se alcanza 15 min antes. Sin embargo, en la disolución salina, el  $H_2O_2$  se consumió mucho más rápido que cuando se usó el efluente simulado de EDAR (Figuras 5.12a y 5.12c). Por tanto, un mayor descenso en la concentración de  $H_2O_2$  no implica una mejor inactivación bacteriana. En disolución salina los radicales hidroxilo pueden reaccionar con la bacteria o con  $H_2O_2$ . Puesto que hay una alta probabilidad de reacción con el  $H_2O_2$ , se consumen elevadas cantidad de radicales hidroxilo en reacciones paralelas. Este hecho también se confirma con el incremento de oxígeno disuelto observado en el ensayo con disolución salina (Figura 5.12a), que fue mayor que en los casos en los que había materia orgánica presente en la matriz (resorcinol y efluente simulado de EDAR). En el caso del efluente simulado de EDAR, la velocidad de consumo del peróxido de hidrógeno fue menor pudiendo reaccionar con la bacteria,  $H_2O_2$  y con los radicales hidroxilo.



# CAPÍTULO 6

---

## EFFECTO DE LA IRRADIANCIA Y ENERGÍA ACUMULADA





## 6. EFECTO DE LA IRRADIANCIA Y DE LA ENERGÍA SOLAR ACUMULADA EN LA INACTIVACIÓN BACTERIANA MEDIANTE FOTO-FENTON SOLAR A pH NEUTRO

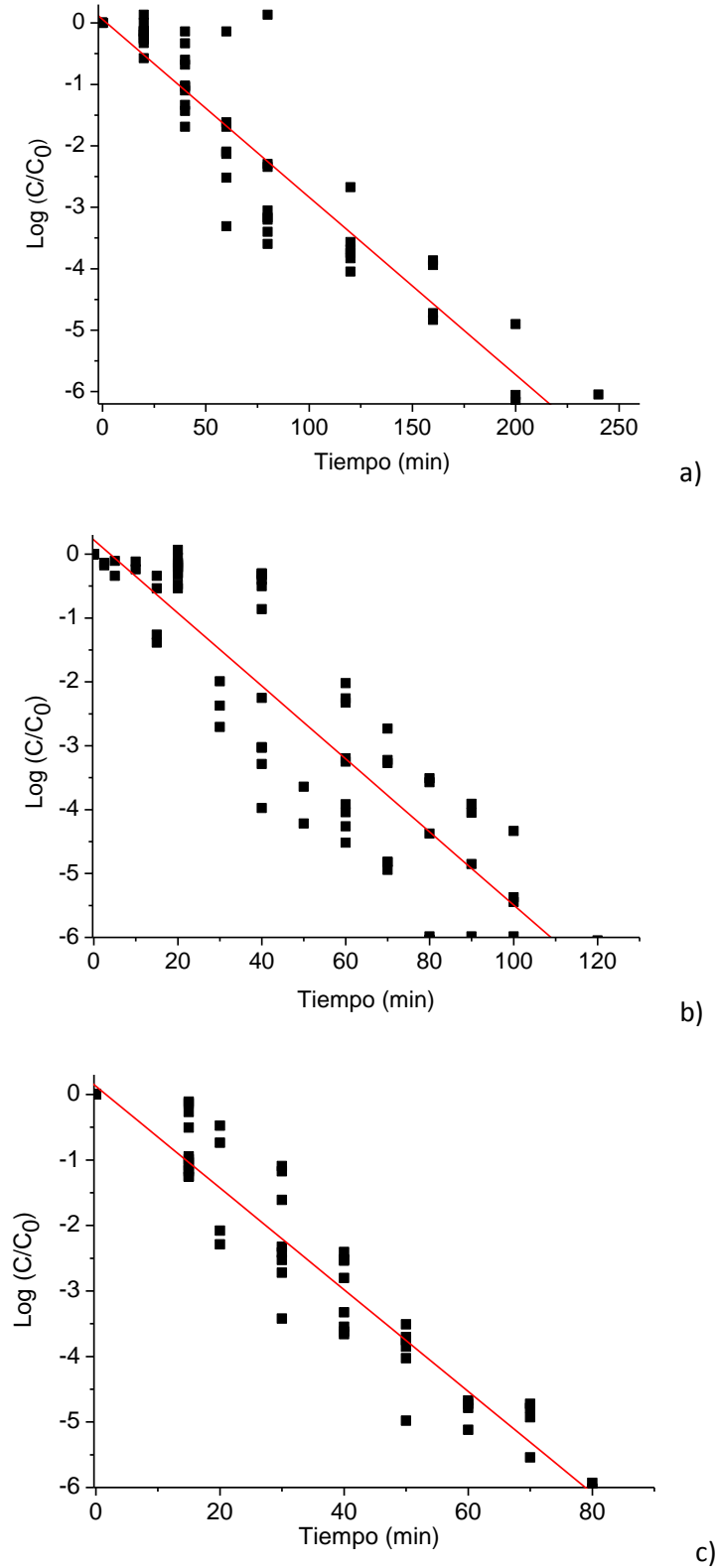
La irradiancia y la energía acumulada son los parámetros usados normalmente para evaluar aquellos procesos que emplean la radiación solar para la desinfección de aguas depuradas. Sin embargo, hasta el momento, no se ha determinado que parámetro es el más apropiado para la estandarización de la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton. Por ello, este capítulo se centra en esclarecer el papel que juegan la intensidad solar (irradiancia) y la energía total recibida y acumulada por unidad de volumen de agua tratada en el sistema durante la desinfección de aguas residuales depuradas mediante este proceso, teniendo en cuenta el espectro UV-A solar que es el más energético y el más eficaz a la hora de promover la reacción de foto-Fenton y la inactivación bacteriana. Con este objetivo, se realizó un estudio sistemático de la influencia de diferentes intensidades de radiación (10, 20 y 30 W m<sup>-2</sup>) y dosis UV-A de energía acumulada (0.6, 1.4, 1.8, 2.5, 3.2 y 3.7 kJ L<sup>-1</sup>) alcanzadas a las irradiancias ensayadas, en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar a pH neutro. La experimentación se llevó a cabo bajo radiación solar natural y en reactores tanque agitado encamisados de vidrio borosilicatado de 1 L (sección 3.3.3) manteniendo la temperatura constante a 25.0 ± 0.2 °C. Como matriz acuosa se utilizó un efluente simulado de EDAR (sección 3.2.3) y como indicador de contaminación fecal, la bacteria *E. faecalis*. Las concentraciones de reactivos fueron las seleccionadas en el capítulo anterior, 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> y 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 6.1. Estudio del efecto de la intensidad de radiación en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar

Una revisión exhaustiva de la bibliografía muestra que hay una controversia respecto a qué parámetro es el más adecuado para expresar correctamente y de forma normalizada el daño producido a las células microbianas durante los tratamientos de desinfección solar, la irradiancia  $I_{UV}$  (intensidad solar, en términos de W m<sup>-2</sup>) o la energía UV-A acumulada por unidad de volumen  $Q_{UV}$  (energía total recibida en el sistema por unidad de volumen, en kJ L<sup>-1</sup>). Por ejemplo, Ubomba-Jaswa *et al.* estudiaron el efecto de la dosis UV-A en la eficiencia de inactivación de *E. coli* mediante SODIS en tres tipos de reactores (Ubomba-Jaswa *et al.*, 2009). En este contexto, ellos sugirieron que se requiere del uso de la dosis UV acumulada, para el diseño de reactores para el proceso SODIS puesto que la inactivación completa solo se conseguía para una dosis UV acumulada mínima que debía ser aplicada de forma ininterrumpida, independientemente de la radiación solar incidente para un rango de irradiancias UV-A de entre 14 y 40 Wm<sup>-2</sup> (Ubomba-

Jaswa *et al.*, 2009). En cuanto a la inactivación fotocatalítica heterogénea mediante  $\text{TiO}_2$ , Sichel *et al.* y Rincón y Pulgarín obtuvieron resultados contradictorios. Sichel *et al.* sugirieron que la eficiencia del proceso de desinfección solar puede caracterizarse mediante la dosis de energía UV-A puesto que la desinfección de diferentes microorganismos con  $\text{TiO}_2$  no es proporcionalmente dependiente de la intensidad UV siempre que se hayan recibido suficientes fotones para la desinfección (Sichel *et al.*, 2007). Sin embargo, Rincón y Pulgarín sugirieron que la foto-inactivación de *E. coli* mediante  $\text{TiO}_2$  depende principalmente de la intensidad de luz, mientras que la dosis UV no es un parámetro adecuado para la normalización de la desinfección solar (Rincón y Pulgarín, 2004b). Concretamente, en el caso del proceso foto-Fenton se tiene poco conocimiento del papel que juegan las variables que definen la radiación solar sobre la inactivación de microorganismos. Ndounla *et al.* estudiaron el efecto de la intensidad de radiación y la dosis de energía acumulada en la eficiencia del proceso foto-Fenton durante diferentes periodos del día en aguas naturales de bebida (Ndounla *et al.*, 2014). Estos autores observaron que menores niveles de irradiancia requieren mayores dosis de radiación solar acumulada para llevar a cabo una completa desinfección y concluyen que la irradiancia tiene gran influencia en el proceso de desinfección pero no la dosis suministrada.

Hay que puntualizar que los trabajos citados investigan distintos procesos de inactivación solares, que son diferentes en términos de mecanismos de acción. Por ejemplo, el mecanismo bactericida en el proceso SODIS se atribuye básicamente a los daños acumulados producidos por los fotones UV-A (McGuigan *et al.*, 2012). Por otro lado, la acción bactericida en la fotocatalisis con  $\text{TiO}_2$  y en el proceso foto-Fenton se debe al ataque directo de los radicales hidroxilo generados durante los procesos foto-catalíticos (Spuhler *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2012; McGuigan *et al.*, 2012). En definitiva, hasta el momento, no hay suficientes estudios, realizados en condiciones controladas, que permitan aclarar qué parámetro es más adecuado para la normalización de la inactivación bacteriana mediante el proceso de foto-Fenton solar para la desinfección de aguas residuales depuradas.



**Figura 6.1.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a diferentes intensidades de radiación UV-A: **a)** 10, **b)** 20 y **c)** 30  $\text{W m}^{-2}$ .  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{Fe}^{2+}] = 20 \text{ mg L}^{-1}$ .  $T^a = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para estudiar el papel de la intensidad de radiación UV-A en la inactivación bacteriana mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro, se evaluaron tres intensidades de radiación, 10, 20 y 30 W m<sup>-2</sup>, manteniendo constantes la temperatura, concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup> y composición de la matriz acuosa. En la Figura 6.1 se encuentran representadas la evolución de la inactivación de *E. faecalis* a las diferentes intensidades de radiación frente al tiempo de tratamiento. Como puede observarse (Figura 6.1), para todas las intensidades estudiadas, el descenso en la concentración bacteriana sigue una cinética de primer orden que puede ajustarse mediante el modelo de Chick-Watson (Ecuación 6.1):

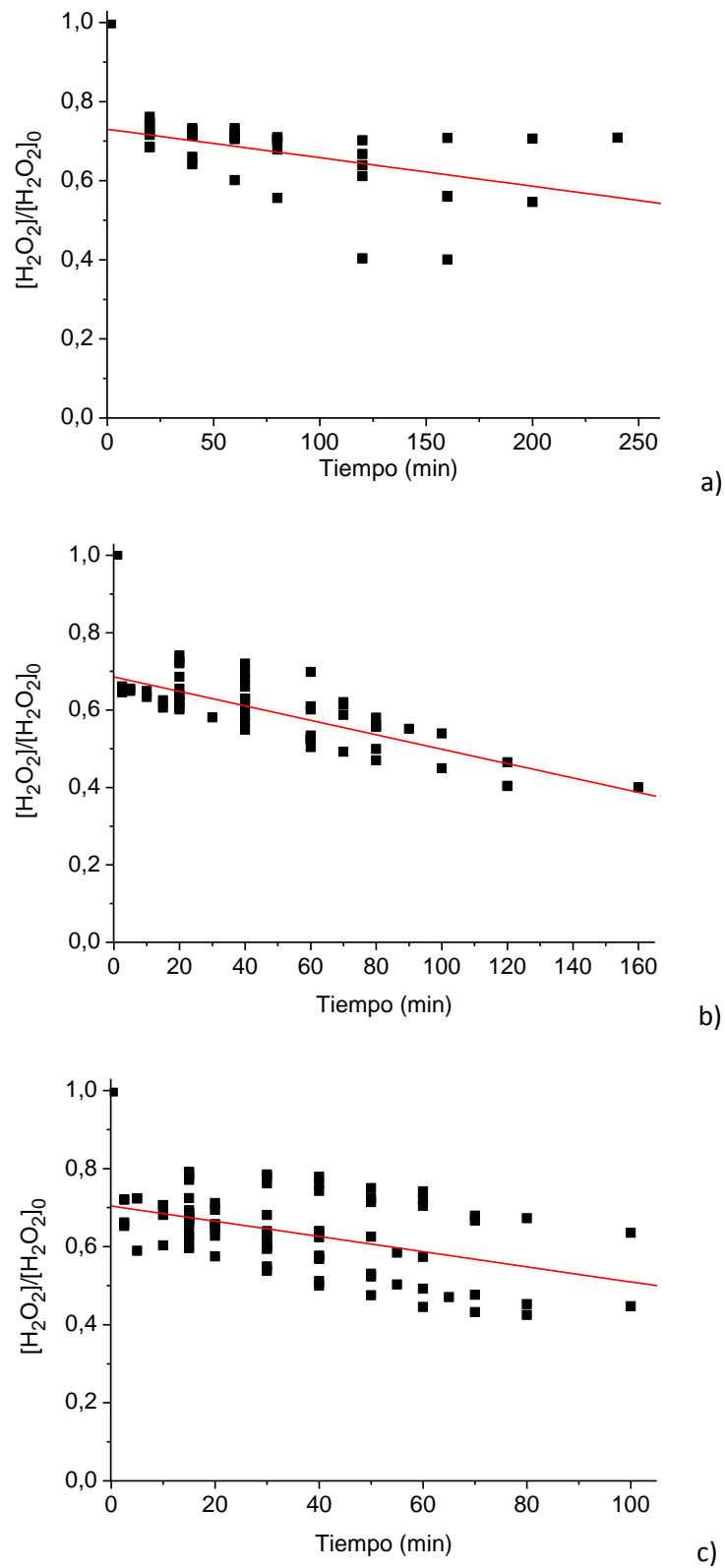
$$C = C_0 e^{-k \cdot t} \quad (6.1)$$

A la intensidad de radiación UV-A de 10 W m<sup>-2</sup> la constante cinética obtenida fue de 0.025±0.002 min<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0.96) y el límite de detección se alcanzó en 220 min (Figura 6.1a). A 20 W m<sup>-2</sup>, la constante *k* fue de 0.057±0.001 min<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0.98) y de 0.089±0.004 min<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0.98) a 30 W m<sup>-2</sup> alcanzando el límite de detección en 110 y 80 min, respectivamente (Figuras 6.1b y c). Además, las constantes cinéticas de inactivación de *E. faecalis* aumentan de forma lineal con la intensidad de radiación UV-A (Ecuación 6.2):

$$k = (30 \pm 1) 10^{-4} \cdot I_{UV-A}; R^2 = 0.99 \quad (6.2)$$

Estos resultados ponen de manifiesto que, en el rango de intensidades de radiación UV-A estudiadas, la inactivación bacteriana mediante el proceso de foto-Fenton solar a pH neutro se encuentra foto-limitada, puesto que cuanto mayor es la intensidad de radiación, mayor es la velocidad de inactivación.

En la reacción de foto-Fenton, el peróxido de hidrógeno se consume en el ciclo de óxido-reducción del hierro dando lugar a la generación de radicales hidroxilo (Ecuación 1.6). A pH neutro, la mayoría de los catalizadores añadidos forman hidróxidos de hierro que precipitan, eliminando así el hierro en disolución. No obstante, los hidróxidos de hierro que se mantienen en suspensión son capaces de promover un tratamiento eficiente mediante foto-Fenton como indica el consumo de peróxido de hidrógeno (Figura 6.2). Independientemente de la intensidad de radiación, se observó un descenso de aproximadamente el 25% en la concentración de peróxido de hidrógeno en las primeras etapas de la reacción (Figura 6.2). Esto puede deberse a la rápida oxidación del hierro ferroso, inicialmente añadido, a hierro férrico con el consiguiente consumo estequiométrico de peróxido de hidrógeno (Ec. 1.6).



**Figura 6.2.** Evolución de la concentración de  $H_2O_2$  durante la inactivación de *E. faecalis* mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro llevado a cabo a diferentes intensidades de radiación UV-A: **a)** 10, **b)** 20 y **c)** 30  $W\ m^{-2}$ .  $[H_2O_2] = 50\ mg\ L^{-1}$ ,  $[Fe^{2+}] = 20\ mg\ L^{-1}$ .  $T^a = 25\ ^\circ C$ .

Una vez se forma el hierro férrico, comienza el ciclo foto-catalítico de óxido-reducción y puede observarse un consumo progresivo del oxidante (Carra *et al.*, 2014). Durante esta segunda etapa de reacción del peróxido de hidrógeno, se observa una cinética de orden cero y por tanto, los datos experimentales pueden ajustarse según la Ecuación 6.3:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_0 - k_{H_2O_2} \cdot t \quad (6.3)$$

Las constantes cinéticas de consumo de peróxido de hidrógeno a 10, 20 y 30 W m<sup>-2</sup> de radiación UV-A fueron de  $(2.3 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$  mM min<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0.96),  $(4.6 \pm 0.8) \cdot 10^{-3}$  mM min<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0.94) y  $(6.0 \pm 0.8) \cdot 10^{-3}$  mM min<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0.94), respectivamente. A una determinada irradiancia, la velocidad de consumo de peróxido de hidrógeno se mantiene constante y no depende de su concentración, sino del flujo de fotones que alcanza el reactor. Como puede observarse en la Figura 6.2, un aumento en la intensidad de radiación conduce a un mayor consumo de oxidante y, consecuentemente, a una mayor velocidad de generación de radicales hidroxilo. Este comportamiento permite relacionar linealmente la constante de consumo de peróxido de hidrógeno y la intensidad de radiación mediante la Ecuación 6.4, mostrando de nuevo que, en estas condiciones experimentales, el ciclo de foto-Fenton a pH neutro se encuentra foto-limitado.

$$k_{H_2O_2} = (2.0 \pm 0.7) 10^{-4} \cdot I_{UV-A} + (7 \pm 3) 10^{-4}; R^2 = 0.96 \quad (6.4)$$

De los resultados obtenidos, puede deducirse que hay una correlación entre la inactivación de *E. faecalis* y el consumo de peróxido de hidrógeno, estando ambos procesos limitados por la intensidad de radiación. Los mecanismos que causan la inactivación bacteriana durante el proceso foto-Fenton a pH neutro son principalmente: i) la generación de radicales hidroxilo externos (Ecs. 1.6 y 1.26); ii) la difusión del Fe<sup>2+</sup> dentro de las células que, junto con el peróxido de hidrógeno metabólico, conduce a la producción de radicales hidroxilo mediante reacciones de Fenton internas (Spuhler *et al.*, 2010) y iii) la oxidación directa o indirecta de lípidos, proteínas, azúcares, ADN por los radicales hidroxilo y el daño asociado por la oxidación del hierro (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014).

## 6.2. Estudio de la influencia de la energía acumulada en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar

Si se considera que la velocidad de inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton se encuentra limitada por la intensidad de radiación solar, la inactivación de *E. faecalis* y la dosis de energía acumulada en el sistema deben relacionarse linealmente. Este hecho se explica porque la dosis



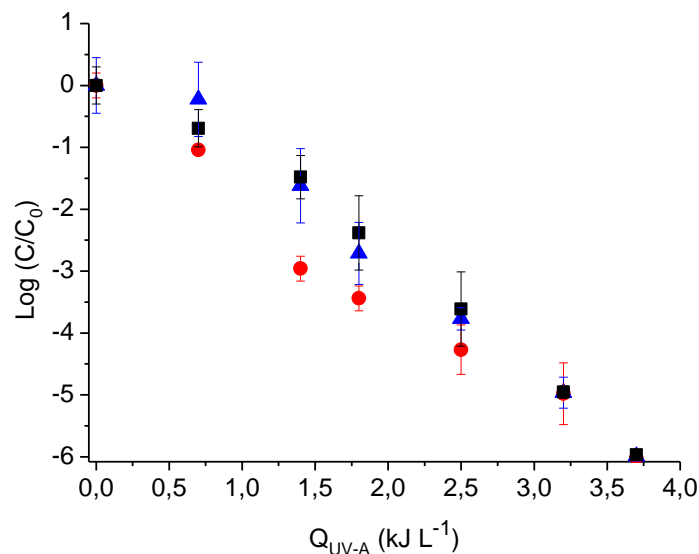
de energía recibida por unidad de volumen es un cálculo directo de la irradiancia que alcanza la superficie del reactor integrada en el tiempo de exposición solar (para una geometría de reactor dada) dividida por el volumen total del reactor (Ec. 6.5):

$$Q_{UV} = \sum_n \overline{UV}_{n-1} \cdot \frac{A_r}{V_t} \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad (6.5)$$

donde,  $t_n$  es el tiempo experimental para la muestra  $n$ ,  $\overline{UV}_{n-1}$  es la media de la irradiancia UV-A solar media durante el período de exposición  $t_n - t_{n-1}$ ,  $A_r$  es el área iluminada del reactor ( $m^2$ ) y  $V_t$  es el volumen total de agua tratada (L).

Para demostrar esta hipótesis, se evaluó la inactivación de *E. faecalis* frente a diferentes dosis de energía acumulada (0.6, 1.4, 1.8, 2.5, 3.2 y 3.7  $\text{kJ L}^{-1}$ ) alcanzadas a las diferentes intensidades de radiación ensayadas (10, 20 y 30  $\text{W m}^{-2}$ ). La Figura 6.3 muestra un descenso lineal en la concentración de *E. faecalis* con la energía acumulada independientemente de la intensidad de radiación UV-A utilizada para alcanzar dicha dosis de energía (Ec. 6.6):

$$\log(C/C_0) = (-1.65 \pm 0.07) \cdot Q_{UV-A}; R^2 = 0.97 \quad (6.6)$$



**Figura 6.3.** Inactivación de *E. faecalis* mediante foto-Fenton solar a pH neutro frente a la dosis de energía acumulada alcanzada a diferentes intensidades de radiación UV-A: **a)** 10 (●), **b)** 20 (▲) y **c)** 30 (■)  $\text{W m}^{-2}$ .  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $[\text{Fe}^{2+}] = 20 \text{ mg L}^{-1}$ .  $T^{\text{a}} = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En los ensayos con menor irradiancia, el tiempo de exposición necesario para conseguir el mismo efecto en la inactivación bacteriana, es decir, misma dosis de energía acumulada, fue mayor. Por lo tanto, la inactivación de *E. faecalis* podría estimarse como una función de la dosis

de energía acumulada en el rango de irradiancias solares utilizadas en este estudio. Por tanto, según los resultados obtenidos, la energía acumulada es un parámetro adecuado para evaluar la desinfección de aguas residuales bajo condiciones de foto-limitación.

La inactivación bacteriana mediante foto-Fenton está promovida y limitada por la cantidad de radicales hidroxilos generados. Por lo tanto, la velocidad de inactivación está limitada por la cantidad total de fotones ( $Q_{UV-A}$ ) recibidas en el sistema independientemente del nivel de irradiancia. Adicionalmente, se observó que después de la exposición solar bacteriana no hubo recrecimiento en ningún caso, lo que demuestra que los daños bacterianos producidos no se deben a mecanismos reversibles (que pueden ser generados por respuestas genéticas al estrés oxidante producido por la radiación UV-A), sino a mecanismos irreversibles producidos por los radicales hidroxilo. Todos estos resultados pueden tener claras implicaciones en la caracterización cinética requerida para la obtención de modelos predictivos para el diseño de reactores y escalado de sistemas de desinfección de aguas residuales.

## CAPÍTULO 7

---

# INACTIVACIÓN DE BACTERIAS ENTÉRICAS NATURALES EN AGUA DE EDAR





## 7. INACTIVACIÓN DE BACTERIAS ENTÉRICAS NATURALES PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO MUNICIPAL MEDIANTE FOTO-FENTON A pH NEUTRO

En el capítulo 5 se han puesto de manifiesto las diferencias en la inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar a pH neutro en presencia de diversas fuentes de materia orgánica en el agua a tratar. Por ello, la aplicación práctica de este proceso requiere evaluar la desinfección de efluentes reales procedentes del tratamiento secundario de una EDAR (sección 3.2.4). Al igual que en el capítulo 5, el proceso foto-Fenton se llevó a cabo en una planta piloto con colectores parabólicos compuestos (CPC) bajo la luz solar natural (secciones 3.3.4 y 3.4.2) y a pH neutro. Sin embargo, se evaluó la inactivación de bacterias entéricas propias del agua depurada, *E. coli* y coliformes totales, que representan la existencia potencial de un amplio número de microorganismos patógenos (sección 3.1.2). Se investigaron los efectos individuales y combinados de los parámetros involucrados en el proceso, así como las principales variables que afectan al tratamiento, como el efecto de la concentración de bicarbonato y la dosis de reactivos (hierro y peróxido de hidrógeno). Finalmente, se estudió la estabilidad del proceso de desinfección frente a la variabilidad estacional de la composición de estos efluentes durante el otoño y el invierno, puesto que estas estaciones representan las condiciones medioambientales más desfavorables del año.

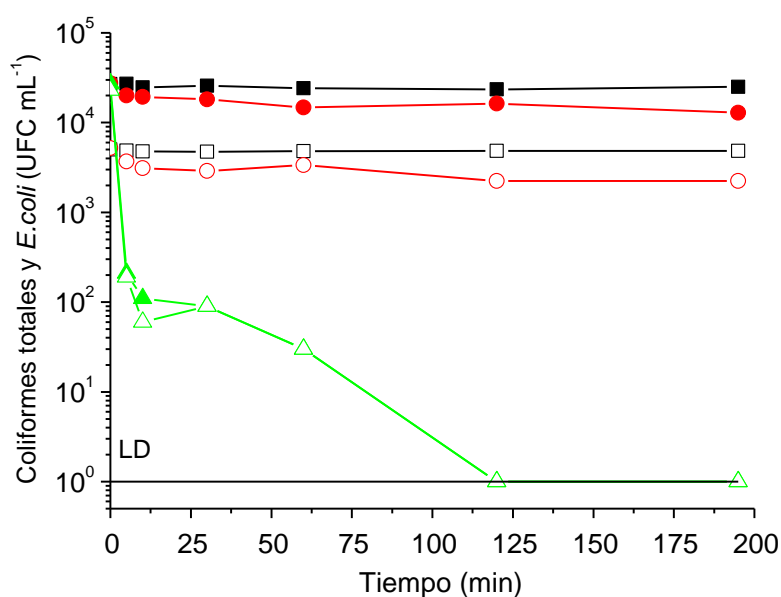
### 7.1. Efecto individual y combinado del pH, estrés mecánico, luz solar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup>

En primer lugar, se evaluó experimentalmente el efecto que tienen los principales factores involucrados en el proceso foto-Fenton en la inactivación bacteriana. Para ello, se realizaron los siguientes ensayos con agua real (efluente del tratamiento secundario de EDAR, ESEDAR) y en CPC:

- i) pH
- ii) Estrés mecánico
- iii) Luz solar
- iv) 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oscuridad
- v) 100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oscuridad
- vi) Fenton, 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>
- vii) 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> en oscuridad
- viii) Luz solar/20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>

- ix) Luz solar/50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- x) Luz solar/100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La eficiencia del proceso foto-Fenton es mayor a valores de pH alrededor de 2.8 (Pignatello *et al.*, 2006), aunque en los últimos años algunos autores han comenzado a aplicar con éxito el tratamiento de aguas mediante foto-Fenton a pH cercano al neutro con el objetivo de reducir los costes de operación (Spuhler *et al.*, 2010; Klammerth *et al.*, 2012; García-Fernández *et al.*, 2012; De la Cruz *et al.*, 2013). El pH ácido puede ser letal para los microorganismos entéricos, por lo que se llevó a cabo un estudio previo de la supervivencia de coliformes totales y *E. coli* a diferentes valores de pH. Los resultados de estos ensayos corroboran que la viabilidad celular de ambos grupos de bacterias se ve negativamente afectada a valores de pH cercanos a 2.8 (Figura 7.1). Sin embargo, durante el tiempo experimental, la concentración de bacteria se mantuvo constante a valores de pH de 5 y 7 (Figura 7.1). Por tanto, en los siguientes experimentos de desinfección mediante foto-Fenton a pH neutro, se descarta que la inactivación observada en las bacterias pueda ser atribuida al pH del ensayo. La concentración inicial de coliformes totales varió en el rango 10<sup>4</sup> – 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> debido a la variabilidad de las muestras recogidas en la planta depuradora.



**Figura 7.1.** Efecto del pH (2.8 (-▲-), 5 (-●-) y 7 (-■-)) en la viabilidad de coliformes totales (símbolos cerrados) y *E. coli* (símbolos abiertos).

El estrés mecánico debido al flujo y bombeo del agua a través del sistema experimental no tuvo ningún efecto en la viabilidad de las bacterias presentes en la matriz estudiada (Figura 7.2). Sin embargo, la radiación solar condujo a una ligera disminución en la concentración de

coliformes totales (1-log) después de 180 min de tratamiento (Figura 7.2), lo que está en concordancia con otros estudios de desinfección solar de *E. coli* y coliformes totales en agua de pozo (Ndounla *et al.*, 2014).

El descenso en la población microbiana se ajustó mediante una cinética de primer orden según la Ecuación 7.1:

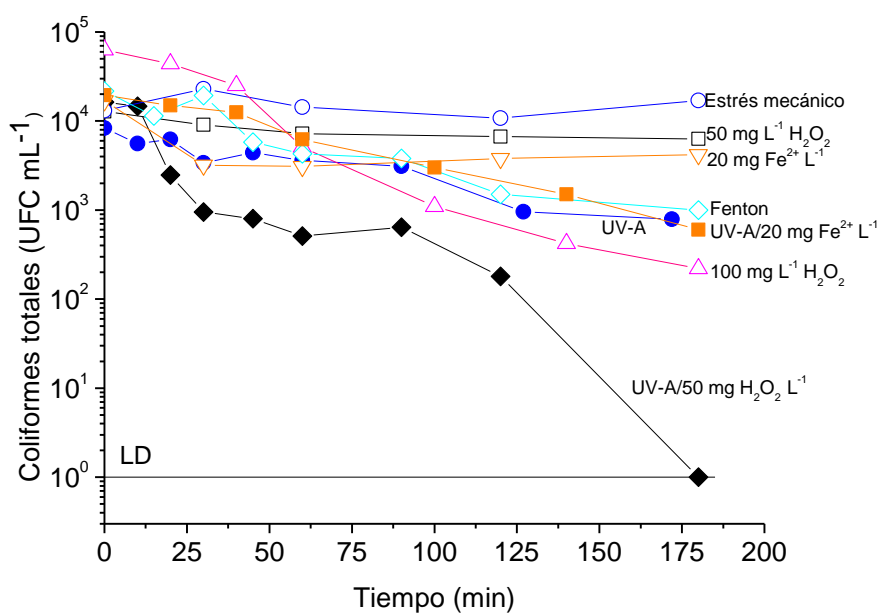
$$\log C/C_0 = -k \cdot t \quad (7.1)$$

donde  $C/C_0$  representa la reducción en la concentración microbiana,  $k$  es la constante cinética de desinfección ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo de tratamiento (t).

Para el ensayo con luz solar la constante cinética de inactivación fue  $k=0.013 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.9$  y disminuyó en presencia de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oscuridad ( $k=0.0035 \pm 0.0005 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.89$ ), ya que durante el experimento no se observó ningún daño significativo en la concentración bacteriana (Figura 7.2). Sin embargo, cuando se añadieron  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oscuridad, se mejoró apreciablemente la inactivación ( $k=0.034 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.96$ ) produciendo un descenso de 2.5-log en la concentración de coliformes totales (Figura 7.2). Por otro lado, el tratamiento Fenton ( $k=0.018 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.89$ ) provocó una bajada de tan solo 1-log después de 180 min de experimento con  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 7.2). Estos resultados confirman, al igual que con las matrices simuladas utilizadas en el capítulo 5, que el proceso de Fenton a pH neutro es más efectivo que la mera adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que está en concordancia con la investigación reciente llevada a cabo para inactivar bacterias entéricas (coliformes totales, *E. coli* y *Salmonella spp.*) presentes en agua de pozo con diferentes a valores de pH cercanos a la neutralidad (Ndounla *et al.*, 2013). La adición de  $\text{Fe}^{2+}$  en oscuridad (Figura 7.2) produjo una ligera disminución en la concentración de coliformes totales como observó Ksibi ( $k=0.0075 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.89$ ) (Kisbi, 2006). Con la misma concentración de hierro y bajo la radiación solar, se produjo una reducción en la viabilidad de la bacteria de 1.5-log ( $k=0.021 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.83$ ). Las diferencias observadas entre ambos procesos se deben a que la difusión del  $\text{Fe}^{2+}$  dentro de las células bacterianas durante la exposición a la luz solar mejora la generación de radicales hidroxilo a través de una reacción de Fenton intracelular con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido durante la actividad metabólica bacteriana (Imlay, 2008; Polo-López *et al.*, 2013).

Algunos autores han examinado el efecto de la combinación de luz solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$  en la inactivación de varios microorganismos con resultados prometedores (Sichel *et al.*, 2009; Polo-

López *et al.*, 2010; Sciacca *et al.*, 2010). La Figura 7.2 muestra que cuando se añaden  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de luz solar, el límite de detección se alcanza a los 180 min de tratamiento ( $k=0.036 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.89$ ). Como se mencionó en capítulos anteriores, el efecto de ambos parámetros combinados mejora la desinfección principalmente debido a la acción de la radiación solar en las células parcialmente dañadas por exposición al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Feuerstein *et al.*, 2006; Sichel *et al.*, 2009). El peróxido de hidrógeno se introduce libremente en las células a través de sus membranas y reacciona con el hierro intracelular. Los radicales hidroxilo generados oxidan las estructuras internas produciendo finalmente la muerte celular (Spuhler *et al.*, 2010). Por otro lado, bajo radiación UV, el principal sistema de defensa celular enzimática contra el estrés oxidante (catalasa y superóxidodismutasa) puede ser inactivado favoreciéndose así la muerte celular por la sobrecarga interna de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Imlay, 2008). Este sistema combinado también se usó por otros autores para la inactivación de microorganismos entéricos de efluentes secundarios de plantas de tratamiento de aguas residuales obteniendo una reducción de más de 4-log en la concentración de coliformes fecales (Xie *et al.*, 2007).



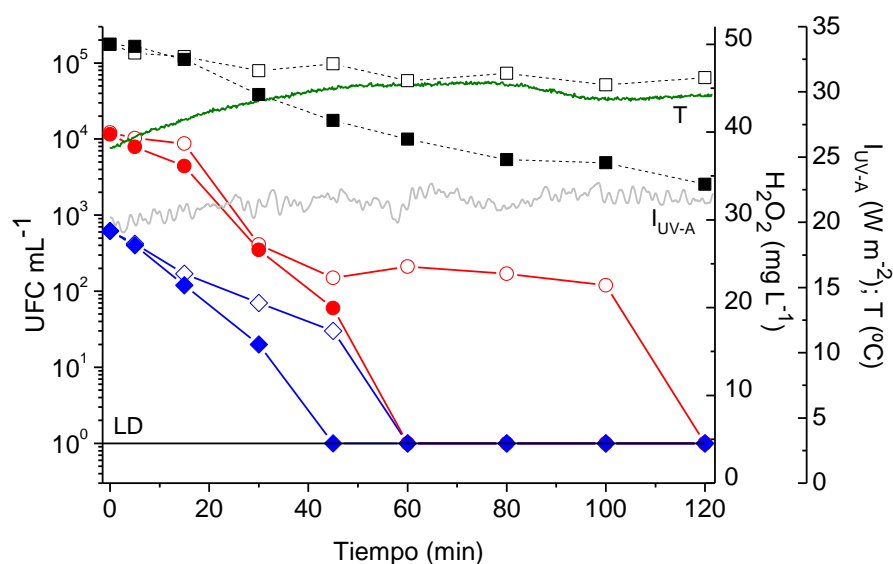
**Figura 7.2.** Inactivación de coliformes totales en fotorreactores CPC. Experimentos en oscuridad: estrés mecánico (-o-),  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-□-),  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-△-),  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  (-▽-), Fenton (-◇-). Experimentos con radiación solar: UV-A (-●-), UV-A/ $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  (-■-) y UV-A/ $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-◆-).



## 7.2. Desinfección mediante foto-Fenton solar a pH neutro

La inactivación bacteriana mediante foto-Fenton solar a pH neutro (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) y la condición más eficiente ensayada en la sección 7.1 (luz solar/50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se estudió simultáneamente en reactores CPC gemelos con el objetivo de comparar ambos procesos. Como muestra la Figura 7.3, mediante el proceso foto-Fenton, el límite de detección se alcanzó en 45 min para *E. coli* y en 60 min para coliformes totales, mientras que mediante el tratamiento luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dicho límite se alcanzó en 60 y 120 min para *E. coli* y coliformes totales, respectivamente. Por lo tanto, la adición de hierro (tratamiento foto-Fenton) condujo a diferencias significativas en el tiempo de inactivación respecto al proceso luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, la constante cinética de inactivación de coliformes totales aumentó desde  $k=0.053 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$  ( $R^2=0.8$ ) para el sistema luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta duplicarse ( $k=0.11 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ ;  $R^2=0.96$ ) para el foto-Fenton. Aunque a pH neutro precipita una cantidad elevada del hierro añadido y la concentración de hierro remanente en disolución es de aproximadamente 1.2 mg L<sup>-1</sup>, algunos compuestos de la materia orgánica y/o sus productos de degradación pueden formar con el hierro complejos foto-activos a pH neutro favoreciendo así la eficiencia del proceso foto-Fenton (Moncayo-Lasso *et al.*, 2012). El consumo de peróxido de hidrógeno (Figura 7.3) fue menor en el tratamiento luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que en el proceso foto-Fenton puesto que durante el tratamiento foto-catalítico el peróxido de hidrógeno se consumió en la formación de radicales hidroxilo. En el proceso luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la luz solar natural no puede producir la ruptura homolítica del peróxido de hidrógeno para generar radicales hidroxilo, puesto que ésta tiene lugar a longitudes de onda (comprendidas entre 200 y 280 nm) fuera del espectro solar.

Durante los primeros minutos del tratamiento mediante luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y foto-Fenton, las curvas de inactivación se encuentran solapadas (Figura 7.3). En el tratamiento luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> penetra y difunde en la célula donde se producen reacciones de foto-Fenton interno generando especies reactivas capaces de ocasionar la muerte celular. En contraste, durante el proceso foto-Fenton solar, la mayor parte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera rápidamente radicales hidroxilo de forma externa que causan una inactivación más eficiente, disminuyendo el tiempo de tratamiento en un 50% respecto al proceso luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También, el proceso foto-Fenton fue más efectivo que el tratamiento Fenton (Figura 7.2) con un incremento del 82% en la velocidad de inactivación, debido a la re-generación del Fe<sup>2+</sup> por el efecto foto-catalítico de la luz solar y a la mayor producción de radicales hidroxilo. El mismo comportamiento fue observado por Moncayo-Lasso *et al.* para la inactivación de *E. coli* a pH neutro en agua de río (Moncayo-Lasso *et al.*, 2009).



**Figura 7.3.** Inactivación de coliformes totales y *E. coli* mediante el tratamiento UV-A con 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (símbolos abiertos) y el proceso foto-Fenton (50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) (símbolos cerrados). Coliformes totales (-○-), *E. coli* (-◇-) y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-).

### 7.3. Cumplimiento de la normativa actual en materia de regeneración de aguas residuales

Hasta la fecha hay pocos estudios de la inactivación de microorganismos mediante foto-Fenton solar a pH neutro en planta piloto y utilizando como matriz un efluente del tratamiento secundario de una EDAR (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2013; Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014, Polo-López *et al.*, 2014). Sin embargo, en estos estudios no se ha evaluado la posterior reutilización del agua tratada mediante foto-Fenton conforme a la legislación vigente. Dependiendo de las necesidades de reutilización del agua residual depurada (urbano, agrícola, industrial, recreativo o uso medioambiental) los tratamientos terciarios deben asegurar la calidad del agua siguiendo las directrices de cada país. Puesto que la agricultura consume al menos el 70% del total del agua fresca del planeta (FAO, 2012), se ha estudiado la viabilidad del proceso de foto-Fenton para la reutilización del agua con propósitos de riego agrícola. En las normativas actuales de la calidad del agua residual depurada, la concentración de *E. coli* es uno de los parámetros microbiológicos más importantes usados como indicador fecal. El real decreto español de utilización de agua tratada para diferentes usos, y entre ellos para riego agrícola (RD 1620/2007), establece, para el caso más restrictivo, una concentración máxima de *E. coli* de 1 UFC mL<sup>-1</sup>. Por tanto, la desinfección alcanzada en estos ensayos por el proceso foto-Fenton satisface esta legislación (1 UFC mL<sup>-1</sup>).

Adicionalmente, se midieron otros parámetros biológicos exigidos en el RD 1620/2007, como son *Legionella spp.* y huevos de nematodos una vez recogido el ESEDAR y después de ser sometido al tratamiento por foto-Fenton. *Legionella spp.* no fue detectada ni en el ESEDAR ni tras el tratamiento de desinfección. Sin embargo, se detectó un huevo de nematodo (en 10 L) antes del tratamiento y ninguno tras el proceso foto-Fenton. Por tanto, el ESEDAR sometido al proceso de desinfección mediante foto-Fenton cumple los niveles de concentración respecto a los principales parámetros biológicos contemplados en el RD1620/2007 y es apta para su reutilización con fines agrícolas en España. Asimismo, el agua puede reutilizarse para otros fines como se muestra en la Tabla 7.1.

**Tabla 7.1.** Valores máximos admisibles para los criterios biológicos de calidad para la reutilización de las aguas según sus usos. Las casillas en gris son aquellas en las que el efluente de ESEDAR, tras el tratamiento por foto-Fenton solar a pH neutro, cumple los valores máximos admisibles.

USO DEL AGUA PREVISTO	Nematodos intestinales	<i>Escherichia coli</i>
<b>1. USOS URBANOS</b>		
<b>CALIDAD 1.1: RESIDENCIAL</b> a) Riego de jardines privados. b) Descarga de aparatos sanitarios.	1 huevo/10 L	0 UFC/ 100 mL*
<b>CALIDAD 1.2: SERVICIOS</b> a) Riego de zonas verdes urbanas (parques, campos deportivos y similares). b) Baldeo de calles. c) Sistemas contra incendios. d) Lavado industrial de vehículos.	1 huevo/10 L	2 UFC/mL
<b>2. USOS AGRÍCOLAS</b>		
<b>CALIDAD 2.1</b> a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco.	1 huevo/10 L	1 UFC/mL
<b>CALIDAD 2.2</b> a) Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero el consumo no es en fresco sino con un tratamiento industrial posterior. b) Riego de pastos para consumo de animales Productores de leche o carne. c) Acuicultura.	1 huevo/10 L	10 UFC/mL

Tabla 7.1. Continuación.

USO DEL AGUA PREVISTO	Nematodos intestinales	<i>Escherichia coli</i>
<b>CALIDAD 2.3</b> a) Riego localizado de cultivos leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana. b) Riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones. c) Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas.	1 huevo/10 L	100 UFC/mL
<b>3. USOS INDUSTRIALES</b>		
<b>CALIDAD 3.1</b> a) Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria. b) Otros usos industriales.	No se fija límite	100 UFC/mL
c) Aguas de proceso y limpieza para uso en la industria alimentaria.	1 huevo/10 L	10 UFC/mL
<b>CALIDAD 3.2</b> a) Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.	1 huevo/10 L	Ausencia/100 mL*
<b>4. USOS RECREATIVOS</b>		
<b>CALIDAD 4.1</b> a) Riego de campos de golf.	1 huevo/10 L	2 UFC/mL
<b>CALIDAD 4.2</b> a) Estanques, masas de agua y caudales circulantes ornamentales, en los que está impedido el acceso del público al agua.	No se fija límite	100 UFC/mL
<b>5. USOS AMBIENTALES</b>		
<b>CALIDAD 5.1</b> a) Recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno.	No se fija límite	10 UFC/mL
<b>CALIDAD 5.2</b> a) Recarga de acuíferos por inyección directa.	1 huevo/10 L	0 UFC/100 mL*
<b>CALIDAD 5.3</b> a) Riego de bosques, zonas verdes y de otro tipo no accesibles al público. b) Silvicultura.	No se fija límite	No se fija límite
<b>CALIDAD 5.4</b> a) Otros usos ambientales (mantenimiento de humedales, caudales mínimos y similares).	La calidad mínima requerida se estudiará caso por caso	

\*Para verificar estos casos habría que cuantificar un volumen de muestra mayor.

#### 7.4. Efecto de la concentración natural de bicarbonato en el tratamiento foto-Fenton

Varios autores han demostrado que la presencia de aniones carbonato y bicarbonato en el agua tiene un efecto negativo en el proceso de foto-Fenton (Pignatello *et al.*, 2006; Klammerth *et al.*, 2009). Ambos aniones actúan como captadores de radicales hidroxilo generando radical carbonato mediante las Ecuaciones 7.2 Y 7.3, y consecuentemente, disminuyen la eficiencia del proceso (Kochany y Lipczynska-Kochany, 1992). A los valores de pH de trabajo ( $7-7.4 \pm 0.2$ ), puesto que la principal especie es  $\text{HCO}_3^-$  (80%), el anión  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  es formado principalmente por la Ecuación 7.2. El radical carbonato es una especie oxidante (1.78 V a pH 7), que puede degradar contaminantes orgánicos (Dell’Arciprete *et al.*, 2012) aunque su potencial redox es menor que el del radical hidroxilo (2.8 V a pH 7).

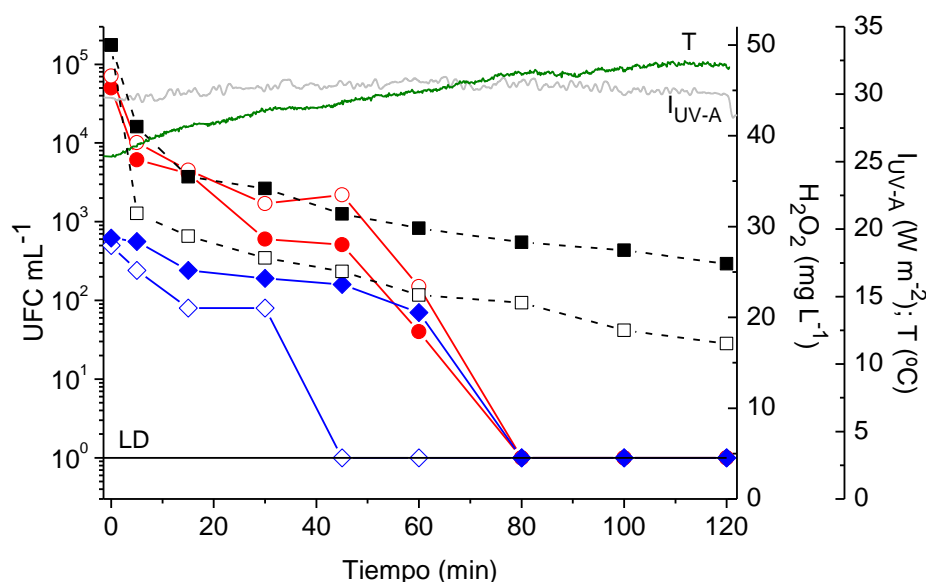


Algunos autores han propuesto diversas estrategias para evitar que los radicales hidroxilo sean capturados por estas especies y no comprometer la eficiencia del proceso. Una de estas estrategias es reducir la concentración de aniones carbonato y bicarbonato en el agua residual depurada antes del tratamiento por foto-Fenton añadiendo una cantidad adecuada de ácido concentrado (Klammerth *et al.*, 2009). Siguiendo esta última estrategia, y con el objetivo de evaluar la eficiencia de desinfección a dos niveles de concentración de  $\text{HCO}_3^-$ , se llevaron a cabo simultáneamente los siguientes ensayos:

- i) En el efluente secundario de EDAR según fue recogido con una concentración de  $\text{HCO}_3^-$  de  $250 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$ .
- ii) En el mismo efluente pero reduciendo la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  a  $100 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para reducir la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el segundo ensayo, se adicionó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (2 N) a los 7 L de agua tratar. La cantidad de ácido empleada fue aquella que permitía que la concentración final de  $\text{HCO}_3^-$  fuera la suficiente para evitar la pérdida de su capacidad como tampón e impedir que cambios bruscos en el pH pudieran afectar la viabilidad bacteriana. En la Figura 7.4 puede observarse que la concentración de coliformes totales alcanzó el límite de detección en 80 min en ambas matrices (i y ii). El límite de detección para *E. coli* se alcanzó a los 80 min de tratamiento en la matriz con la mayor concentración de  $\text{HCO}_3^-$  (i), y a los 40 min cuando la concentración inicial de  $\text{HCO}_3^-$  se redujo a  $100 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$  (ii). En ambos ensayos no se observó competencia por las especies reactivas de oxígeno entre microorganismos,

materia orgánica y aniones bicarbonato, puesto que se aplicaron condiciones muy oxidantes durante el proceso foto-Fenton y se generó un exceso de radicales. Como se detalló en el capítulo 5.4, a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno y hierro, se observó un retraso marcado en el proceso de desinfección de *E. faecalis* en presencia de resorcinol. Sin embargo, a elevadas concentraciones de reactivos ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ :  $50/20 \text{ mg L}^{-1}$ ) la formación de radicales fue tan alta que la degradación del resorcinol no supuso un retardo en la eficiencia de desinfección. Por tanto, al contrario de lo observado en la degradación de contaminantes orgánicos, la reducción de la concentración natural de bicarbonato del agua no produce ninguna mejora significativa en la inactivación de coliformes totales presentes en el efluente secundario de una EDAR durante su tratamiento mediante foto-Fenton a un pH estable alrededor de 7. Si se procediera a la eliminación completa del bicarbonato se podría producir un incremento en la velocidad de inactivación como consecuencia de una caída del pH a valores ácidos, pero la posterior neutralización del agua tratada supondría un coste adicional.



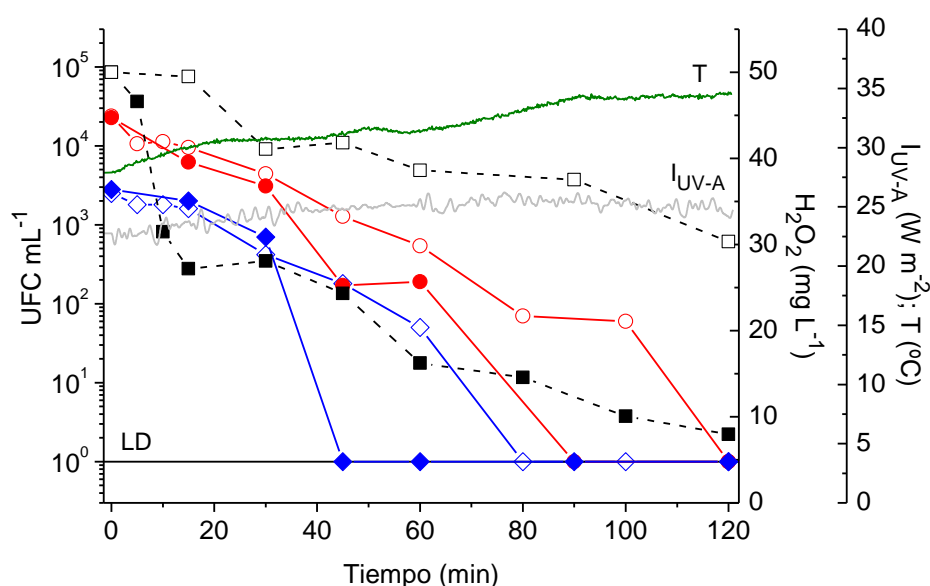
**Figura 7.4.** Efecto de la concentración de bicarbonato en la desinfección de agua mediante foto-Fenton ( $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ). Coliformes totales (—○—), *E. coli* (—◇—) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (—□—). Símbolos abiertos,  $\text{HCO}_3^- = 100 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ . Símbolos cerrados,  $\text{HCO}_3^- = 250 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 7.5. Efecto de la adición de hierro en el proceso foto-Fenton

Recientemente, se ha propuesto una nueva estrategia para poder llevar a cabo la eliminación de contaminantes orgánicos mediante foto-Fenton a valores de pH neutro consistente en hacer sucesivas adiciones de hierro durante el proceso en lugar de una única adición inicial (Carra *et*

al., 2013). Con el objeto de evaluar si esta estrategia produce una mejora en el proceso de inactivación bacteriana, se realizó la dosificación de hierro durante la desinfección del efluente por foto-Fenton. La experimentación se llevó a cabo realizando simultáneamente los siguientes ensayos:

- Foto-Fenton con tres adiciones secuenciales de hierro: una inicial de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  y otras dos de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  cada una, a los 5 y 10 min respectivamente desde el comienzo del experimento.
- Foto-Fenton con una única adición inicial de hierro de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  añadida al comienzo del experimento.



**Figura 7.5.** Efecto de la dosificación de hierro en la desinfección por foto-Fenton. Coliformes totales (-○-), *E. coli* (-◇-) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-□-). Símbolos abiertos, adiciones de hierro  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , a  $t=0$ ;  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , a  $t=5 \text{ min}$ ;  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , a  $t=10 \text{ min}$ . Símbolos sólidos, con una adición de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ .

En ambos casos, el agua se empleó según fue recogida a la salida del secundario de la EDAR y la concentración de peróxido de hidrógeno fue de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . En el ensayo con adiciones secuenciales de hierro el tiempo de inactivación necesario para alcanzar el límite de detección aumentó significativamente. Como muestra la Figura 7.5, en el ensayo i), el límite de detección se alcanzó en 120 min para coliformes totales y en 80 min para *E. coli*, mientras que en el ensayo ii), dicho límite fue alcanzado en 90 y 45 min, respectivamente. Estos resultados están en concordancia con estudios recientes, en los que la presencia de hierro precipitado a valores de pH cercanos al neutro causa un ligero descenso en la eficiencia de la inactivación debido a la

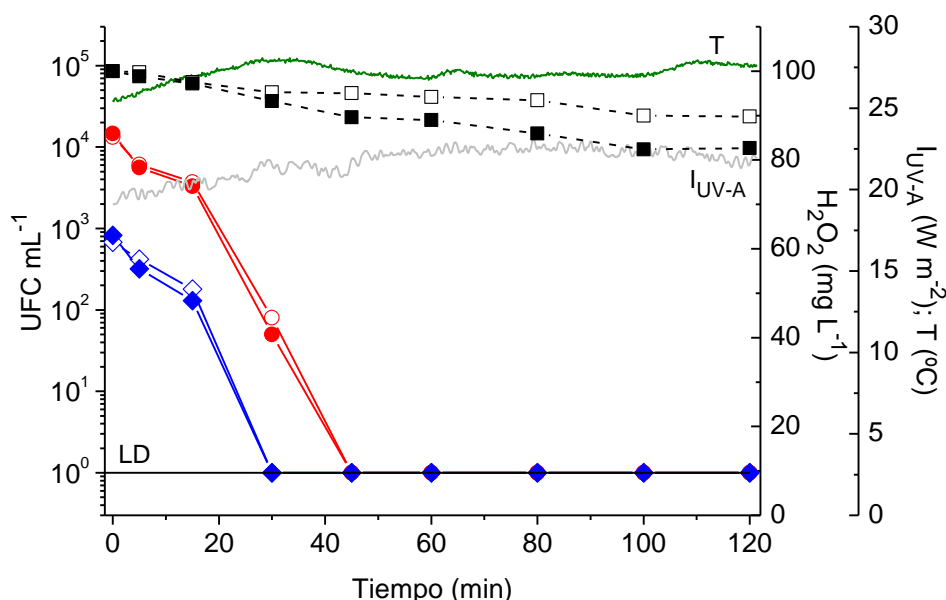
dispersión de la luz (turbidez) (Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014). El consumo de peróxido de hidrógeno fue mayor cuando se realizaron varias adiciones de hierro debido a que cada vez que se adiciona hierro a la disolución, reacciona más peróxido de hidrógeno (Ecuación 1.6).

### 7.6. Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno en la eficiencia de foto-Fenton

Con el objetivo de minimizar el tiempo de inactivación en el proceso foto-Fenton, se ensayó una mayor concentración de peróxido de hidrógeno y se llevaron a cabo simultáneamente los siguientes experimentos:

- Luz solar/100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Foto-Fenton solar con 100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>

La Figura 7.6 muestra perfiles de inactivación muy similares para ambos ensayos, alcanzando el límite de detección en 30 min para *E. coli* y 45 min para coliformes totales. Por tanto, cuando se emplean concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno, el proceso foto-Fenton no supone ninguna mejora respecto al proceso luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la inactivación bacteriana, a pesar de que se consume una mayor cantidad de oxidante. En el proceso luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la especie de oxígeno reactiva predominante es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es un compuesto estable y es tóxico para las células en concentraciones elevadas.



**Figura 7.6.** Desinfección de agua con concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno. Símbolos abiertos, UV-A/100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Símbolos cerrados, foto-Fenton (100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>). Coliformes totales (-○-), *E. coli* (-◇-) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-).

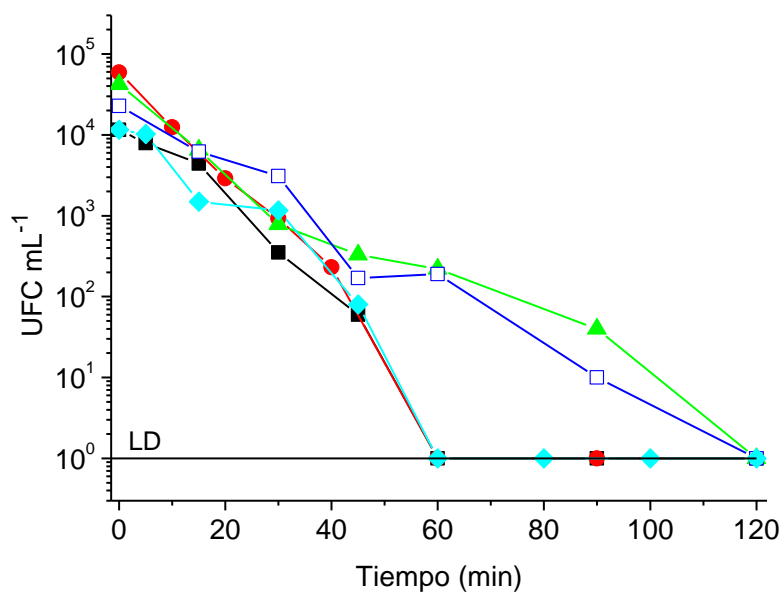


Como se demostró en la sección 7.1, la adición de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa una reducción de 2-log en la concentración bacteriana (Figura 7.2). Por tanto, la inactivación completa observada utilizando esta alta concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) y en presencia de luz solar, se debe al efecto sinérgico entre ambos procesos (Feuerstein *et al.*, 2006). Asimismo, cabe destacar que se produce una mejora en la eficiencia del proceso de desinfección por foto-Fenton a mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno. Cuando la concentración de peróxido de hidrógeno se elevó de 50 a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , los tiempos de inactivación se redujeron un 33% y un 25% para *E. coli* y coliformes totales respectivamente, aunque la cantidad residual de peróxido de hidrógeno fue el doble en el tratamiento con la mayor concentración de oxidante (Figuras 7.3 y 7.6).

### **7.7. Efecto de la variabilidad estacional del efluente secundario de una estación depuradora de aguas residuales**

Muchos parámetros físico-químicos y biológicos característicos de las aguas residuales como pH, turbidez, concentración de bacterias entéricas, composición del agua, etc., suelen sufrir variaciones en sus valores diaria y estacionalmente. Para evaluar los efectos de la variabilidad del efluente secundario de EDAR en el proceso de foto-Fenton, se llevaron a cabo varios ensayos de desinfección con la misma concentración de reactivos ( $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ) en cinco efluentes (ESEDAR1-ESEDAR5) recogidos en los meses de febrero, octubre y noviembre de 2012 y enero y febrero de 2013.

Durante los primeros 45 min de reacción (Figura 7.7) las curvas de inactivación de coliformes totales fueron similares en todos los ensayos. A este tiempo, se inactivaron 2-log de bacterias (99% de reducción), siendo las células remanentes más resistentes a la inactivación. Por tanto, la inactivación de esta población restante es la que determina el tiempo total para la desinfección del efluente (desde 60 a 120 min, Figura 7.7). Durante los cinco ensayos la constante de inactivación cinética varió entre  $0.07$  y  $0.17 \text{ min}^{-1}$  (Tabla 7.2). El elevado número de parámetros involucrados en el proceso dificulta la atribución de las diferencias observadas en el tiempo de inactivación a algunos de ellos. Por tanto, para asegurar un tiempo de operación efectivo para la desinfección total, independientemente de las condiciones medioambientales y la composición del agua residual, debe de considerarse la condición más conservativa, correspondiente a la de menor velocidad de inactivación.



**Figura 7.7.** Inactivación de coliformes totales mediante foto-Fenton ( $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ), réplicas con ESEDAR obtenidas en 5 días diferentes de un año: ESEDAR1 (-■-), ESEDAR2 (-●-), ESEDAR3 (-◆-), ESEDAR4 (-□-) y ESEDAR5 (-▲-).

**Tabla 7.2.** Constantes cinéticas de inactivación para la desinfección de coliformes totales mediante foto-Fenton a diferentes días durante las estaciones de otoño e invierno.

Muestra	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$ (descenso de 2-log)	$R^2$	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$ (desde $C_0$ a LD)	$R^2$
ESEDAR 1	0.12	0.94	0.15	0.96
ESEDAR 2	0.14	0.99	0.17	0.97
ESEDAR 3	0.08	0.93	0.14	0.93
ESEDAR 4	0.10	0.91	0.09	0.96
ESEDAR 5	0.11	0.97	0.07	0.92
Media	0.11	-	0.13	-
Desviación estándar	0.02	-	0.04	-

## CAPÍTULO 8

---

# INACTIVACIÓN DE VIRUS MEDIANTE FOTO-FENTON





## 8. PRINCIPALES PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA INACTIVACIÓN DE VIRUS MEDIANTE EL PROCESO FOTO-FENTON SOLAR A pH NEUTRO Y CONCENTRACIONES $\mu\text{M}$ DE $\text{H}_2\text{O}_2$ Y $\text{Fe}^{2+/3+}$

El desarrollo de la investigación llevada a cabo en éste capítulo se ha realizado en el grupo de Procesos de Oxidación Avanzada de la Escuela Politécnica Federal de Lausana (Suiza) liderado por el Prof. Dr. D. César Pulgarín. En este capítulo se estudia la inactivación de virus en agua mediante el proceso foto-Fenton a pH neutro. Con este propósito, se evaluaron experimentalmente los efectos individuales de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y exposición solar y los efectos de las variables combinadas  $\text{Fe}^{2+/3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ , exposición solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y exposición solar/ $\text{Fe}^{2+/3+}$ . Además, se estudió el efecto de la radiación solar, concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+/3+}$  y pH en la inactivación de virus mediante foto-Fenton. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando el colifago MS2 como modelo de virus humano (sección 3.1.3) en una disolución de tampón carbonato (DTC) a pH 8 como matriz acuosa (sección 3.2.5), en un reactor tanque agitado de vidrio borosilicatado de 0.1 L y bajo radiación solar artificial (secciones 3.3.2 y 3.4.1). También, para confirmar la eficiencia del proceso de foto-Fenton a pH neutro en condiciones reales, se realizaron ensayos empleando agua natural del lago Lemán (Suiza) (sección 3.2.6) y un virus humano (Echovirus) (sección 3.1.4). Para completar el estudio se propone una interpretación mecanística basada en los resultados experimentales obtenidos y en una exhaustiva revisión bibliográfica que ilustra las posibles vías involucradas en la inactivación del virus MS2 durante el tratamiento foto-Fenton.

### 8.1. Influencia del $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , exposición solar y sus combinaciones en la inactivación del virus MS2

Con el objetivo de comprender los mecanismos de inactivación del virus MS2 mediante el proceso foto-Fenton, es importante tener en cuenta que las partículas virales se unen a los receptores del flagelo de *E. coli*, a través de los cuales el genoma del virus es inyectado dentro de la célula receptora. Una vez dentro de ésta, las proteínas de MS2 son traducidas por el ribosoma del hospedador y el ARN del virus es transcrito. Para ser infectivo, el virus debe conservar las siguientes funciones: i) reconocer y unirse a la célula receptora, ii) inyectar su genoma dentro de ésta, y iii) replicarse una vez que su genoma está dentro de la célula receptora (Wigginton *et al.*, 2012).

### 8.1.1. Efecto de las variables individuales: $H_2O_2$ , $Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$ y exposición solar

En condiciones de oscuridad, y sin ningún reactivo añadido, la viabilidad de MS2 en la matriz acuosa de tampón carbonato (DTC) no se vio afectada (Figura 8.1). Bajo estas mismas condiciones pero añadiendo  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $H_2O_2$ , tampoco se detectó ninguna inactivación del virus por la acción de este agente oxidante (Figura 8.1). Estos resultados están en concordancia con otros encontrados en bibliografía. Así, al mismo pH inicial y durante el mismo tiempo experimental, otros investigadores no detectaron inactivación del virus con una concentración similar de  $H_2O_2$  ( $0.9 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Nieto-Juárez *et al.*, 2010) o incluso en presencia de una concentración mayor de agente oxidante ( $17 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Kim *et al.*, 2011). El  $H_2O_2$  tiene una gran capacidad desinfectante según la concentración utilizada y el modo en que se emplea, por ejemplo, el vapor de peróxido de hidrógeno se usa en la inactivación de virus entéricos y respiratorios (Tuladhara *et al.*, 2012). Sin embargo, a concentraciones pequeñas de  $H_2O_2$  (como las empleadas en este estudio) no se genera ningún efecto que perjudique la infectividad del colifago MS2.

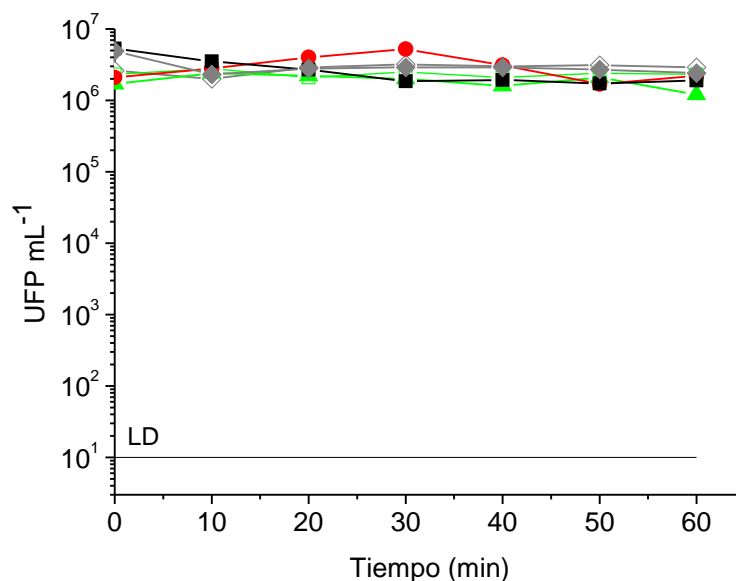
Análogamente, la exposición del virus a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$  en oscuridad no produjo ningún efecto perjudicial en la viabilidad del virus después de 60 min de ensayo (Figura 8.1). Otros estudios revelan que se produce una inactivación de 1.5-log usando una mayor concentración inicial de  $Fe^{2+}$  ( $5.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que usando la misma concentración de  $Fe^{3+}$  en la oscuridad no se produce ninguna inactivación (Kim *et al.*, 2010). Cuando el  $Fe^{2+}$  está presente en el agua a pH 8, la especie predominante en disolución es el ion ferroso hidrolizado  $[Fe(OH)_2(H_2O)_4]$  (Morgan y Lahav, 2007). Por otro lado, como se ha descrito en otras publicaciones, a este pH el  $Fe^{3+}$  está mayoritariamente en forma de hidróxido de hierro (Nieto-Juárez *et al.*, 2010; Pecson *et al.*, 2012; Nieto-Juárez *et al.*, 2013). Estos autores demostraron que hay una adsorción física de las partículas de óxido férrico en las partículas de virus. La agregación virus-partícula es probablemente consecuencia de interacciones hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas, puesto que el  $Fe^{3+}$  puede actuar como aceptor de electrones y el colifago MS2 está negativamente cargado a pH 8 (Gerba *et al.*, 1984; Pecson *et al.*, 2012). También se ha demostrado que, aunque la presencia de óxidos metálicos favorece la adsorción física del virus, este efecto no conduce a ninguna desinfección (Nieto-Juárez *et al.*, 2010; Pecson *et al.*, 2012) como muestran los resultados representados en la Figura 8.1.

La exposición del bacteriófago MS2 a una irradiancia UV-A de  $30 \text{ W m}^{-2}$  durante 60 min no produjo ninguna inactivación (Figura 8.1), en línea con los estudios previos llevados a cabo

por Mamane *et al.* que confirman que el virus MS2 es muy resistente a la radiación solar (Mamane *et al.*, 2007). Otros trabajos demuestran la inactivación de MS2 por la exposición a la luz UV, aunque la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con lámparas de UV-C, cuyo rango espectral no está presente en la radiación solar que alcanza la superficie terrestre (Ijpelaar *et al.*, 2010; Timchak *et al.*, 2012; Sherchan *et al.*, 2014). Por tanto, los resultados presentados en este capítulo solo pueden ser comparados con la investigación de Hadas-Mamane *et al.* puesto que su estudio está realizado con longitudes de onda mayores de 295 nm, que pertenecen a la parte UV-A de la radiación solar (Hadas-Mamane *et al.*, 2007). Estos autores demostraron que los virus T4 y T7 pueden ser inactivados severamente por la mera acción de la radiación UV-A solar. Esta inactivación puede ser causada por un daño al genoma, dando lugar a la inhibición de la replicación del ARN dentro de la célula receptora y/o del proceso de inyección del genoma. También, se puede explicar por un efecto negativo sobre las proteínas del virus, dando lugar a una pérdida de infectividad (Hadas-Mamane *et al.*, 2007). Más concretamente esta inhibición puede ser atribuida:

- i. A una absorción de fotones por los componentes del virus, que conduce a una modificación química del material genético, como por ejemplo, la formación de dímeros en la estructura del ARN y otros foto-productos que las células de la bacteria receptora no pueden reparar (Hadas-Mamane *et al.*, 2007).
- ii. Un daño en las proteínas como resultado de la foto-oxidación de aminoácidos seleccionados (Silverman *et al.*, 2013).

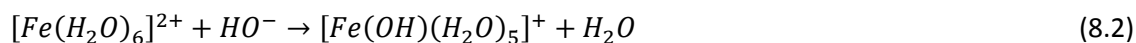
Davies-Colley *et al.* demostraron que los espectros UV-B (290-320 nm), UV-A (320-400 nm) y el rango de la luz visible comprendido entre el azul y el verde (400-550 nm) contribuyen al daño de fagos f-ARN como MS2 (Davies-Colley *et al.*, 1997). Sin embargo, algunos de los mecanismos que restringen la capacidad de infección pueden ser reparados. Los mecanismos de reparación son especialmente significativos en MS2, puesto que es uno de los virus más resistentes (excluyendo adenovirus) a la inactivación por radiación UV (Rodríguez *et al.*, 2014). En algunos virus, longitudes de onda entre 370 y 550 nm son las responsables de restablecer la infectividad mediante mecanismos de reparación, por lo que éstos son dependientes de la luz. De este modo, la fotorreactivación compensa en gran medida el daño causado por la luz solar al material genético de los virus (Weinbauer *et al.*, 1997). También, otros factores que están involucrados en la resistencia de los virus a la irradiación UV son altos contenidos de citosina y guanina (Meng y Gerba, 1996).



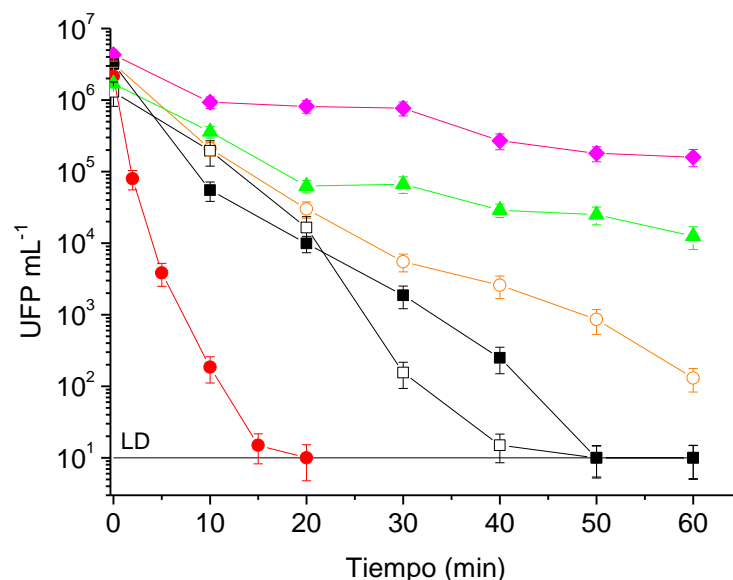
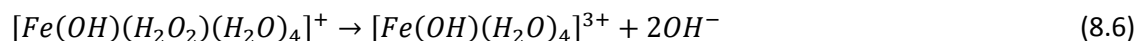
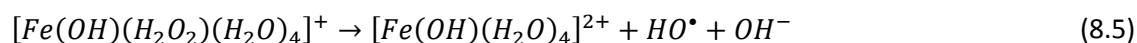
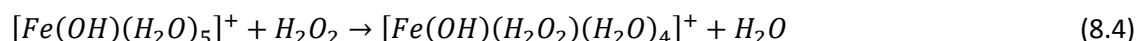
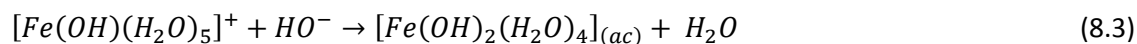
**Figura 8.1.** Inactivación de MS2 en DTC a pH 8 mediante el efecto individual del estrés mecánico (□), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (▲), Fe<sup>2+</sup> (◆), Fe<sup>3+</sup> (◇) y la radiación solar (●) y el efecto combinado de luz solar/Fe<sup>2+</sup> (■). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1 mg L<sup>-1</sup>, Fe<sup>2+/3+</sup> = 1 mg L<sup>-1</sup> y I<sub>UV</sub> = 30 W m<sup>-2</sup>).

### 8.1.2. Efecto del proceso Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>)

En la inactivación del virus MS2 mediante el efecto combinado de Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fenton) se observaron ligeras diferencias en la disminución de la concentración del virus en función de la fuente de hierro utilizada (Figura 8.2). El tratamiento de Fenton llevado a cabo con 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> y 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en oscuridad), produjo un descenso de 1.5-log en la concentración de MS2 tras 1 h de experimento. Sin embargo, cuando el Fe<sup>3+</sup> fue la fuente de hierro usada, se alcanzó una mayor inactivación (2-log). De acuerdo con la reacción de Fenton, donde las principales especies responsables de la oxidación son los radicales hidroxilo, la velocidad de inactivación del virus debería ser mayor en presencia de Fe<sup>2+</sup> (Ec. 1.6) que con Fe<sup>3+</sup> (Ec. 1.10) (Bokare y Choi, 2014).







**Figura 8.2.** Inactivación de MS2 en DTC a pH 8 mediante la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (reacción de Fenton) (-◆-), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> (reacción de Fenton) (-▲-), luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-□-), luz solar/Fe<sup>3+</sup> (-○-), luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> (reacción de foto-Fenton) (-■-) y luz solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup> (reacción de foto-Fenton) (-●-) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1 mg L<sup>-1</sup>, Fe<sup>2+/3+</sup> = 1 mg L<sup>-1</sup> y I<sub>UV</sub> = 30 W m<sup>-2</sup>).

A pH neutro, el Fe<sup>2+</sup> está presente principalmente como complejo inorgánico (Ec. 8.1-8.4), aunque la identidad de los oxidantes producidos en las siguientes etapas todavía es incierta. En los últimos años, algunos investigadores han sugerido que durante la reacción de Fenton a pH neutro, pueden formarse otros oxidantes alternativos, como el ión ferrilo, Fe<sup>4+</sup> (Keenan y Sedlak, 2008). Sin embargo, existe cierta polémica en bibliografía respecto a cuáles son los principales intermedios oxidantes (Wink *et al.*, 1991; Bossmann *et al.*, 1998; Hug y Leupin, 2003; Keenan y Sedlak, 2008; Pang *et al.*, 2011; Remucal *et al.*, 2011). Algunos autores sugieren que los complejos de Fe<sup>2+</sup> pueden disociarse para formar HO<sup>•</sup> (Ec. 8.5) o especies ferrilo (Ec. 8.6) que pueden generar también HO<sup>•</sup> en agua (Keenan y Sedlak, 2008). Por otra parte, diversas condiciones como el pH de la disolución acuosa o la presencia de ligandos son cruciales en las reacciones 8.5 y 8.6. Esto podría marcar diferencias claras en las velocidades de inactivación de los virus en función de la especie inicial de hierro (Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>) en la reacción de

Fenton, como han observado otros autores para la inactivación de bacterias (Spuhler *et al.*, 2010) y esporas de hongos (Polo-López *et al.*, 2013). Independientemente de cual sea la especie oxidativa dominante durante el proceso Fenton, el hecho de que su generación se produzca muy cerca de la partícula de virus, es lo que la hace más susceptible de causar daño. Incluso, Nieto-Juárez *et al.* sugirieron que el virus es capaz de ser inactivado únicamente cuando el  $\text{Fe}^{3+}$  es adsorbido en la partícula de virus (Nieto-Juárez *et al.*, 2010).

### 8.1.3. Efecto combinado de la radiación solar y $\text{H}_2\text{O}_2$

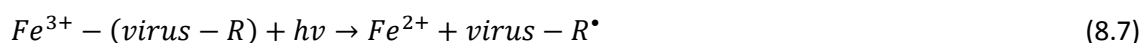
Como se muestra en la Figura 8.2, la combinación de  $30 \text{ W m}^{-2}$  de irradiancia solar UV-A con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  conduce a la total inactivación del virus MS2 tras 50 min de ensayo, mientras que ambos tratamientos por separado no producen ninguna inactivación significativa durante el mismo tiempo (Figura 8.1). Estos resultados evidencian la acción de un efecto sinérgico entre la exposición solar y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como previamente demostraron algunos autores para la inactivación de bacterias y hongos (Sichel *et al.*, 2009; Polo-López *et al.*, 2011). Agulló-Barceló *et al.* obtuvieron una reducción de 2.5-log y 2-log en las concentraciones de colifagos somáticos y bacteriófagos ARN F-específicos respectivamente en aguas residuales urbanas empleando radiación solar junto con una alta concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 5 h de ensayo (Agulló-Barceló *et al.*, 2013). Mientras que solo la acción de la luz solar produjo una reducción en la concentración de ambos virus de 2-log en 5 h de tratamiento.

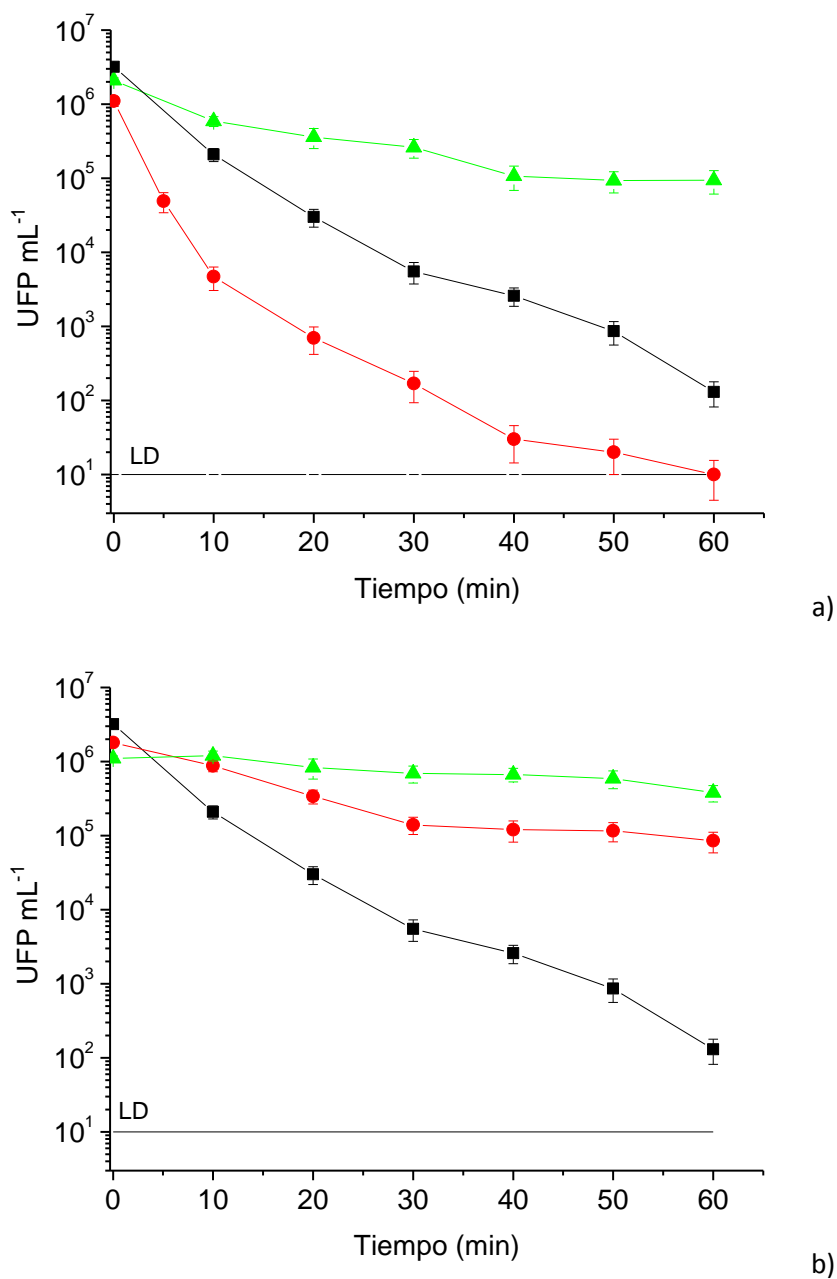
Hay que tener en cuenta que el efecto producido por los fotones de longitud de onda corta (200-280 nm) conduce a la ruptura homolítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar radicales hidroxilo (Ijpelaar *et al.*, 2010; Timchak *et al.*, 2012). Sin embargo, este rango espectral no está presente en la radiación solar y, por tanto, no puede ser el mecanismo de inactivación cuando se usa el tratamiento luz solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las modificaciones producidas en el material genético del virus debido al efecto de la exposición solar, pueden ser reparadas una vez que éstos se encuentran en la célula receptora. Simultáneamente a la exposición solar, la presencia de agentes fuertemente oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, pueden causar modificaciones o daños en la estructura superficial del virus, afectando por ejemplo a los sitios de ensamblaje con la célula receptora (Koivunen y Heinonen-Tanski, 2005). Teniendo esto en cuenta, el efecto sinérgico podría deberse a que el daño causado por la radiación solar hace al virus más sensible a la acción del agente oxidante y, por tanto, el daño causado por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene una mayor repercusión.

8.1.4. Efecto combinado de la exposición solar y  $Fe^{2+/3+}$ 

La acción de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Fe^{3+}$  bajo radiación solar ( $30 \text{ W m}^{-2}$  de irradiancia UV-A) induce a un descenso de 3.5-log en la concentración de MS2 (Figura 8.2), mientras que cuando se emplea la misma cantidad de  $Fe^{2+}$  e irradiancia no se observa ninguna pérdida de infectividad en el colifago (Figura 8.1). Estos resultados vuelven a poner de manifiesto el importante papel que juega la fuente de hierro utilizada durante la foto-inactivación de MS2 (Nieto-Juárez *et al.*, 2010; Nieto-Juárez *et al.*, 2013). Algunos estudios han demostrado que la exposición del virus a la radiación UV en presencia de partículas de hierro adsorbidas sobre su superficie conduce a la inactivación de los colifagos (Templeton *et al.*, 2006; Pecson *et al.*, 2012; Nieto-Juárez *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado un estudio exhaustivo de los principales factores que afectan al proceso luz solar/ $Fe^{3+}$  en la inactivación del virus MS2. Para llevar a cabo este estudio, se evaluaron diferentes intensidades de radiación UV-A ( $15$ ,  $30$  y  $45 \text{ W m}^{-2}$ ) bajo la misma concentración de  $Fe^{3+}$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Como se muestra en la Figura 8.3a, después de 60 min de experimento, la concentración de MS2 descendió 1-log y 4-log a  $15$  y  $30 \text{ W m}^{-2}$  de irradiancia UV-A respectivamente, mientras que en ese mismo tiempo y bajo una intensidad de radiación de  $45 \text{ W m}^{-2}$  se alcanzó el límite de detección. También, con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración inicial de hierro en el proceso luz solar/ $Fe^{3+}$  se evaluaron tres concentraciones diferentes de  $Fe^{3+}$  ( $0.1$ ,  $0.5$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizando la misma intensidad de radiación solar UV-A ( $30 \text{ W m}^{-2}$ ). En este caso, también se observaron diferencias significativas (Figura 8.3b), puesto que cuando se añadieron  $0.1$ ,  $0.5$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Fe^{3+}$  se produjo un descenso en la infectividad de MS2 de 0.5, 1.1 y 4.2-log, respectivamente.

Debido a la composición y estructura de los virus, el agregado virus-hierro puede funcionar como sensibilizador, favoreciendo la absorción de radiación y actuando como un complejo de transferencia de carga ligado a metal (TCLM). Estos complejos presentan una fuerte absorción de la radiación UV-visible mediante bandas originadas por la transición de electrones desde orbitales moleculares del ligando a orbitales del metal. La presencia de bandas de transferencia de carga del ligando al metal hace que el complejo sea fotoquímicamente activo y genere  $Fe^{2+}$  y ROS mediante la reacción 8.7:





**Figura 8.3.** Inactivación de MS2 a pH 8 con: **a)** 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup> y 15 (-▲-), 30 (-■-) y 45 (-●-) W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A y **b)** 30 W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A y 0.1 (-▲-), 0.5 (-●-) y 1 (-■-) mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>.

Otra posible vía de generación de radicales oxidantes podría atribuirse al papel semiconductor de los hidróxidos de hierro. Los hidróxidos de hierro pueden actuar como semiconductores con un ancho de banda reducido y ser foto-activos en presencia de radiación solar. Los electrones y huecos foto-generados en la malla del óxido de hierro son capturados por la superficie del virus produciendo  $HO^\bullet$  y  $Fe^{2+}$  (Ruales-Lonfat *et al.*, 2014). En ambos casos los ROS generados (radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peroxilo ( $RO_2^\bullet$ ), alcoxilo ( $RO^\bullet$ ), e hidroperoxilo ( $HO_2^\bullet$ ), entre otros) causan daños a los constituyentes virales (Wigginton *et al.*, 2010). Por tanto, los radicales producidos provocan un daño endógeno indirecto en el microorganismo debido a que los fotones son absorbidos por una parte del virus y, sin embargo, dicho daño es reflejado en otra región de éste (Silverman, 2013). Por el contrario, no se observa ningún efecto sinérgico por la combinación de  $Fe^{2+}$  e irradiancia solar puesto que la formación de complejos fotoactivos no está favorecida.

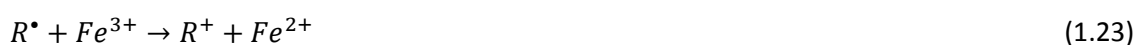
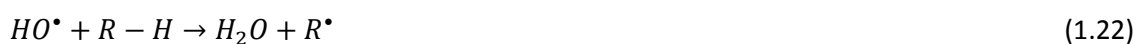
Si se mantiene la misma concentración de hierro y se aumenta la irradiancia solar, se favorece la generación de especies oxidantes y, por tanto, se alcanzan mayores niveles de inactivación del virus (Figura 8.3a). Por otro lado, en los ensayos con una misma irradiancia solar, al disminuir la dosis de hierro inicial se obtiene una menor inactivación (Figura 8.3b) por encontrarse limitada la disponibilidad de  $Fe^{3+}$  y, por tanto, la producción de especies reactivas de oxígeno. Con estos resultados se pone de manifiesto que tanto la intensidad de radiación como la concentración de hierro tienen un papel crítico en la eficiencia del proceso.

## 8.2. Inactivación de MS2 mediante el proceso foto-Fenton a pH neutro

Como se muestra en la Figura 8.1.b, la fuente de hierro usada (iones férricos o ferrosos) también tiene una marcada influencia en la inactivación del virus MS2 mediante foto-Fenton ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Fe$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $H_2O_2$  bajo una exposición UV-A de  $30 \text{ W m}^{-2}$ ). Cuando se añade  $Fe^{3+}$ , el límite de detección se alcanza en 20 min, mientras que cuando la fuente de hierro es  $Fe^{2+}$  se necesitan 50 min para alcanzarlo (Figura 8.2). Estos resultados concuerdan con trabajos previos donde se utilizaron partículas de hidróxido de hierro comerciales. Durante el tratamiento foto-Fenton, las partículas que contenían  $Fe^{3+}$  causaron una mayor inactivación en el virus respecto a aquellas que contenían  $Fe^{2+}$  (Nieto-Juárez *et al.*, 2013). Polo-López, *et al.* también encontraron diferencias similares respecto al uso de  $Fe^{3+}$  o  $Fe^{2+}$  durante la inactivación solar de *Phytophthora capsici* en agua a bajas concentraciones de hierro (desde  $1$  a  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Polo-López *et al.*, 2013).

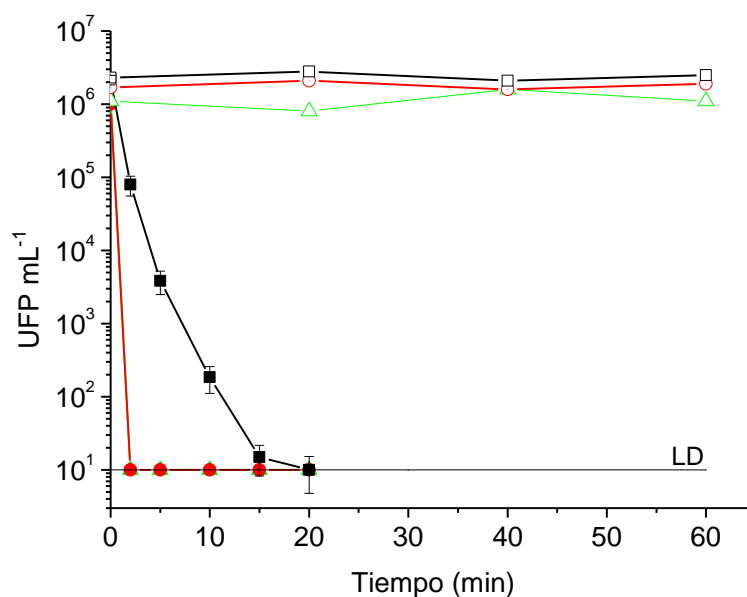
Al emplear  $Fe^{3+}$  junto con radiación solar, las especies sólidas de hierro en forma coloidal e hidróxidos son foto-químicamente convertidas a iones ferrosos ( $Fe^{2+}$ ) vía TCLM, con la

formación de un equivalente adicional de radical hidroxilo (Ec. 1.26). El  $Fe^{2+}$  formado en la ecuación 1.26 reacciona con el  $H_2O_2$  durante el proceso foto-Fenton. Por otro lado, como se muestra en la ecuación 1.27, se forman complejos intermedios disociados. Dependiendo del ligando radical, el producto formado podría ser un radical hidroxilo, como en las Ecs. 1.28 – 1.29, u otro radical derivado del ligando (Ec. 1.30). Puesto que estas especies oxidantes se generan cerca del virus, hay una alta probabilidad de dañar su estructura (Nieto-Juárez *et al.*, 2010). También, cuando las partículas de hierro están formando un agregado con el virus, puede tener lugar un proceso foto-Fenton heterogéneo, donde las especies generadas dañan directamente al colifago. Sin embargo, en el proceso foto-Fenton con  $Fe^{2+}$  la cantidad de  $Fe^{2+}$  en disolución a pH neutro es despreciable y las especies oxidantes formadas en las Ecs. 1.6, 1.7, 1.22-1.30 son probablemente generadas en el seno de la reacción. Solo se podría encontrar  $Fe^{2+}$  activo en el caso de que éste se encontrara complejado con materia orgánica o con posibles metabolitos derivados de la degradación de los constituyentes virales (Barona *et al.*, 2015).



Una vez demostrado que el tratamiento por foto-Fenton (radiación solar/ $H_2O_2/Fe^{3+}$ ) es el más efectivo en la inactivación de MS2, se estudian en profundidad los mecanismos involucrados en la pérdida de infectividad del colifago MS2 durante el proceso. El efecto del pH inicial (6, 7 y 8) en el proceso foto-Fenton se evaluó usando  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $H_2O_2$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Fe^{3+}$  y  $30 \text{ W m}^{-2}$  de radiación solar UV-A. En ensayos preliminares realizados a estos valores de pH en DTC se confirmó que no tiene lugar inactivación de MS2, por tanto el efecto de inactivación solo puede ser atribuido al proceso foto-Fenton (Figura 8.4). La Figura 8.4 muestra diferencias destacables entre la inactivación a pH 8 y a la inactivación a los valores de pH 6 y 7. A pH 8,

fueron necesarios 20 min para alcanzar el límite de detección, mientras que a pH 6 y 7 se alcanzó en menos de 10 min. Otros autores también han observado una marcada influencia del pH durante la inactivación del virus MS2 mediante la reacción de Fenton (Kim *et al.*, 2010). Hu *et al.* explicaron que existe una fuerte dependencia del pH en el tratamiento de diferentes colifagos como MS2, f2 y Q $\beta$  con Fe (IV) (Hu *et al.*, 2012). Por tanto, la matriz de agua utilizada fue una disolución de tampón carbonato (DTC) con el fin de mantener el valor de pH alrededor de  $8.0 \pm 0.2$  a lo largo de los experimentos.



**Figura 8.4.** Inactivación de MS2 mediante el proceso foto-Fenton con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $30 \text{ W m}^{-2}$  de intensidad de radiación UV-A a pH 6 ( $\blacktriangle$ ), pH 7 ( $\bullet$ ) y pH 8 ( $\blacksquare$ ). Viabilidad de MS2 a pH 6, 7 y 8 (símbolos abiertos).

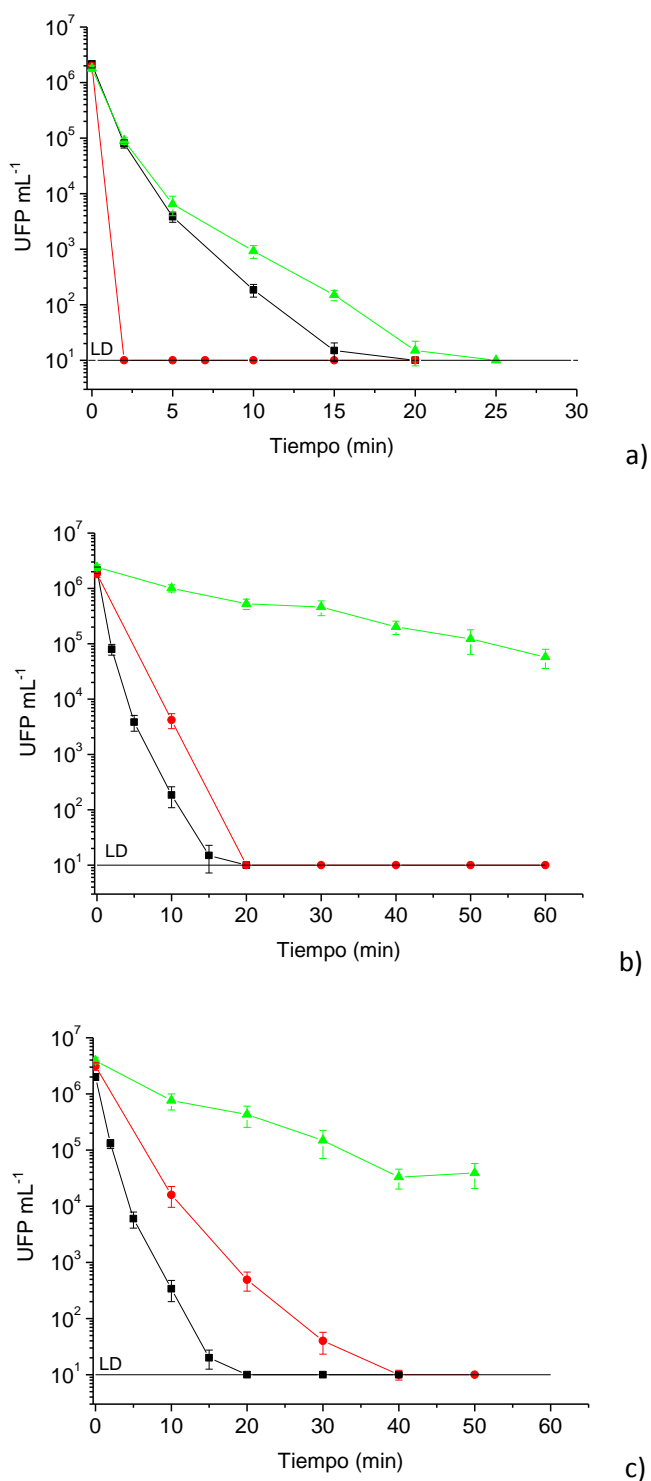
En segundo lugar, se evaluaron diferentes intensidades de radiación solar UV-A (15, 30 y  $45 \text{ W m}^{-2}$ ) utilizando la misma concentración inicial de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ). A las irradiancias de 15 y  $30 \text{ W m}^{-2}$  tan solo se observó una ligera diferencia en la inactivación de MS2 puesto el límite de detección se alcanzó en 25 y 20 min respectivamente (Figura 8.5a). Sin embargo, a la mayor intensidad de radiación, el límite de detección se alcanzó en menos de 2 min. Como es sabido, la irradiancia juega un papel importante en el proceso de foto-Fenton puesto que la velocidad de reacción entre  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  es de al menos 3 órdenes de magnitud más rápida que en la reacción de Fenton (Bokare y Choi, 2014). Durante el proceso catalítico, se requiere irradiancia UV para acelerar la generación reductiva del  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de  $\text{Fe}^{3+}$  (Ec. 13). La luz favorece la producción de especies oxidantes puesto que hay más  $\text{Fe}^{2+}$  disponible para reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el sistema

foto-Fenton (Ec. 12). Por esta razón, una disminución en la absorción de luz se traduce en un descenso de la velocidad de inactivación.

Durante el tratamiento por foto-Fenton, la variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno tuvo un efecto muy significativo en la eficiencia de inactivación (Figura 8.5b). Cuando se empleó la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  más baja ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) el descenso en la concentración de virus infectivos fue de solo 1.4-log. Sin embargo, usando 1 y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se alcanzó el límite de inactivación en 20 min. La reacción entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el hierro mediante la reacción de foto-Fenton conduce a la generación de ROS (Ec. 12), que causan la desnaturalización de las proteínas que forman la cápsida del virus dando lugar a una pérdida de actividad de las funciones involucradas en la capacidad infecciosa del virus (Mamane *et al.*, 2007). El proceso foto-Fenton fue ineficaz cuando se usó la menor concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (Figura 8.5b), puesto que las especies reactivas de oxígeno formadas reaccionan posiblemente con el peróxido de hidrógeno (que actúa como capturador de ROS) y, por tanto, la disponibilidad de especies oxidantes para atacar el colifago es menor. Si se utiliza una concentración mayor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el exceso de reactivo puede reaccionar con  $\text{Fe}^{3+}$  produciendo más especies oxidantes y la competición  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ROS es despreciable. Por tanto, la concentración inicial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la reacción de foto-Fenton debe ser suficiente para asegurar una adecuada eficiencia del proceso global.

Cuando la concentración inicial de  $\text{Fe}^{3+}$  disminuye (Figura 8.5c) la velocidad de inactivación de MS2 es menor. Con una concentración inicial de hierro de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ , se observó únicamente una reducción de 2-log en la concentración de virus. Sin embargo, al emplear  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{3+}$ , el límite de detección se alcanzó en 20 min, mientras que se necesitó el doble de tiempo cuando la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  se redujo a la mitad. Estos resultados pueden explicarse porque posiblemente a mayores concentraciones de hierro la formación del agregado virus-hierro se encuentra favorecida y, consecuentemente, las especies ROS son producidas cerca del virus. Sin embargo, cuando la concentración de hierro es limitada, la reacción entre el  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es probablemente preferente respecto a la formación del agregado. De esta forma, los ROS se producen en el seno de la reacción y tienen una menor probabilidad de reaccionar con el virus. De las Figuras 8.3, 8.5b y 8.5c es destacable que un pequeño aumento en el valor de la variable estudiada conduce a un gran incremento en la inactivación de MS2, y que los parámetros ensayados no se encuentran en condiciones de saturación.





**Figura 8.5.** Inactivación de MS2 mediante foto-Fenton a pH 8 con: **a)** 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup> y 15 (▲), 30 (■) y 45 (●) W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A; **b)** 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>, 30 W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A y 0.1 (▲), 0.5 (●) y 1 (■) mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **c)** 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 W m<sup>-2</sup> de intensidad de radiación UV-A y 0.1 (▲), 0.5 (●) y 1 (■) mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>.

### 8.3. Aplicabilidad del proceso foto-Fenton en la inactivación de virus

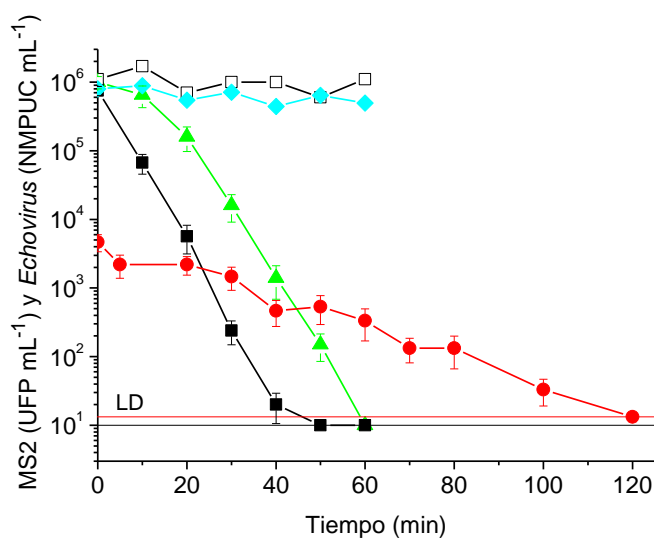
Con el objetivo de estudiar la inactivación de virus en una matriz de agua real, se llevaron a cabo diferentes ensayos en agua procedente del Lago Lemán (Suiza). Se evaluó la inactivación del virus en agua natural y el efecto de la exposición a la radiación solar UV-A ( $30 \text{ W m}^{-2}$ ) y no se observó ningún descenso en la viabilidad del colifago MS2 (Figura 8.6). En contraste con los resultados encontrados en la matriz DTC (Figura 8.2), en agua natural el proceso luz solar/ $\text{Fe}^{3+}$  no mostró ninguna inactivación significativa del colifago MS2 (Figura 8.6). Además, en agua natural, la inactivación del virus MS2 por el efecto combinado de la exposición solar ( $30 \text{ W m}^{-2}$  de UV-A) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) fue más lenta que en la matriz acuosa de DTC ya que el límite de detección se alcanzó 10 min después. También, se observa este retraso en el proceso foto-Fenton, ya que la inactivación fue 2.5 veces más lenta que la conseguida en DTC (Figuras 8.2 y 8.6).

La materia orgánica presente en el agua forma complejos foto-activos con hierro que ayudan a mantener el hierro en disolución a pH neutro y que producen ROS vía TCLM causando un daño indirecto exógeno en el virus (Spuhler *et al.*, 2010). Rosado-Lausell *et al.* sugirieron que  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\bullet$ , y el estado triplete excitado de la materia orgánica disuelta del agua depurada o natural son los principales responsables de la inactivación del virus MS2 (Rosado-Lausell *et al.*, 2013). Por otra parte, durante la inactivación de virus, la degradación de la MON compite por los radicales hidroxilo y por otros ROS producidos durante las reacciones de foto-inactivación (Spulher *et al.*, 2010; Moncayo-Lasso, 2012; Polo-López *et al.*, 2012; Agulló-Barceló *et al.*, 2013; Rodríguez-Chueca *et al.*, 2014). Por tanto, el marcado retraso observado en la inactivación de virus mediante el proceso foto-Fenton en agua de lago es probablemente debido a la competición entre la inactivación del virus y la degradación de la materia orgánica presente en el agua natural por los radicales hidroxilo y otros ROS y por la competencia entre el virus y la MON por la adsorción en la partícula de  $\text{Fe}^{3+}$ .

En el proceso luz solar artificial/ $\text{Fe}^{3+}$ , el hierro puede ser predominantemente absorbido en la MON en lugar de en el colifago MS2, interfiriendo en la formación del agregado virus-partícula. Los ROS formados a través de mecanismos exógenos indirectos no lo hacen cerca del virus y, por tanto, no se alcanza ninguna inactivación significativa. Puesto que el hierro presente en agua natural se eliminó mediante filtración, durante el proceso luz solar artificial/ $\text{H}_2\text{O}_2$  el descenso en la concentración de MS2 no puede ser atribuido a un proceso foto-Fenton. Por esta razón, la menor velocidad de inactivación en el ensayo luz solar/ $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua natural puede ser atribuida a la competencia entre la degradación de MON y la inactivación del virus MS2 por el agente oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Pecson *et al.* sugirieron otra causa de pérdida de infectividad

demostrando que cambios en la matriz acuosa, tales como la presencia de ácidos húmicos, podrían conducir a la desorción del virus de la superficie del metal. Esta desorción podría inducir a una inactivación del virus debido a que solo los virus adsorbidos en los coloides de hierro son susceptibles de ser inactivados (Pecson *et al.*, 2012).

Con el propósito de validar la capacidad del proceso foto-Fenton a valores de pH cercanos al neutro para la inactivación de virus humanos, se ensayó la inactivación de *Echovirus*. Hasta la fecha, este es el primer estudio que lleva a cabo la inactivación de un virus humano mediante el proceso foto-Fenton. El tratamiento se realizó con las mismas concentraciones de hierro y peróxido de hidrógeno e intensidad de radiación utilizadas en el tratamiento del colifago MS2 (1 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup> y 1 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo la exposición a 30 W m<sup>-2</sup> de radiación solar UV-A) y utilizando como matriz acuosa DTC. Como se muestra la Figura 8.6, el límite de detección se alcanzó en 120 min de tratamiento. En este experimento, en la matriz acuosa se encontraba disuelto un alto contenido de materia orgánica aportada por el medio criogénico en el que se desarrolló el virus humano que no pudo ser eliminado. En consecuencia, la competición por las especies oxidantes entre la materia orgánica proveniente del medio criogénico y las partículas virales *Echovirus* podría ser una de las razones por las que la velocidad de inactivación de *Echovirus* fue más lenta que la del colifago MS2.



**Figura 8.6.** Inactivación de MS2 utilizando como matriz agua natural del lago Lemán: UV-A (□-), UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-▲-), UV-A/Fe<sup>3+</sup> (-◆-) y foto-Fenton a pH 8 (-■-). Inactivación de Echovirus por foto-Fenton a pH 8 en una matriz DTC (-●-). Límites de detección para las medidas de concentración de MS2 (-) y Echovirus (-). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1 mg L<sup>-1</sup>, Fe<sup>3+</sup> = 1 mg L<sup>-1</sup> y I<sub>UV</sub> = 30 W m<sup>-2</sup>).

#### 8.4. Mecanismos involucrados en la inactivación de MS2 por foto-Fenton neutro

Basándose en los resultados experimentales mostrados en este capítulo y una exhaustiva revisión de la bibliografía, se ha realizado una propuesta de los mecanismos involucrados en la inactivación del colifago MS2 mediante las reacciones de foto-Fenton (Figura 8.7):

1. Adsorción física de los óxidos metálicos en la superficie del virus. El agregado virus-hidróxido de hierro es principalmente formado mediante interacciones electrostáticas puesto que el  $\text{Fe}^{3+}$  puede actuar como aceptor de electrones y el colifago MS2 está negativamente cargado a valores de pH cercanos al neutro (Nieto-Juárez *et al.*, 2010; Pecson *et al.*, 2012).

2. a) La luz solar produce un daño endógeno directo en los componentes del virus como son los ácidos nucleicos o proteínas de la cápsida que afecta a la unión del virus a su célula receptora, a la inyección de su material genético en el interior de ésta o a la replicación del ARN del virus (Mamane *et al.*, 2007). Por otro lado, b) el daño endógeno directo puede ser reparado en la célula receptora (Mamane *et al.*, 2007).

3. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  (en pequeñas cantidades) produce un estrés oxidante en el virus previamente dañado por la luz solar (Ananthaswamy y Eisenstark, 1977; Ananthaswamy *et al.*, 1979, Agulló-Barceló *et al.*, 2013).

4. El complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -virus puede actuar como foto-sensibilizador o complejo de transferencia de carga ligado a metal (TCLM) que es fotoquímicamente activo y absorbe la luz solar resultando en la formación de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{HO}^{\bullet}$  y produciendo un daño endógeno indirecto en el virus (Nieto-Juárez *et al.*, 2010, Nieto-Juarez *et al.*, 2013, Ruales-Lonfat *et al.*, 2014).

5. En presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los ROS son generados cerca del virus por la reducción del hidróxido de hierro adsorbido mediante un proceso de foto-Fenton solar heterogéneo (Nieto-Juárez *et al.*, 2013; Bokare y Choi, 2014).

6. En presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y luz solar, los complejos foto-activos formados entre el  $\text{Fe}^{3+}$  y la MON dan lugar a un foto-Fenton homogéneo con la posterior formación de ROS (Sichel *et al.*, 2009; Sphuler *et al.*, 2010).

7. La exposición de la materia orgánica presente en agua natural a la luz solar forma un estado triplete excitado de la materia orgánica disuelta que, en presencia de oxígeno, produce ROS (Rosado-Lausell *et al.*, 2013).





# CAPÍTULO 9

---

## CONCLUSIONES/CONCLUSIONS







## 9. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

### CONCLUSIONES

De la discusión de los resultados presentados, se destacan las siguientes conclusiones como respuesta a los objetivos planteados en esta investigación:

1. De entre todos los tratamientos solares ensayados, UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV-A/Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe (Fenton) y UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe (foto-Fenton a pH neutro), independientemente del microorganismo, tipo de matriz acuosa o reactor usado, el proceso foto-Fenton solar a pH neutro ha demostrado ser el más efectivo, alcanzando una reducción en la concentración de microorganismos de hasta 6-log.
2. En el intervalo de temperaturas ensayado (de 10 a 40 °C), la constante cinética de desinfección mediante el proceso foto-Fenton a pH neutro varía con la temperatura de acuerdo con una cinética tipo Arrhenius. Un incremento de 20 °C reduce el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton a la mitad.
3. La materia orgánica presente en las aguas residuales compite con los microorganismos por los radicales oxidantes durante el proceso de desinfección mediante foto-Fenton solar a pH neutro. Con objeto de disminuir el tiempo de tratamiento y minimizar el efecto competitivo, la generación de radicales oxidantes no debe ser limitante.
4. En condiciones oxidantes (concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe que aseguren la suficiente generación de radicales hidroxilo), una matriz acuosa compleja favorece la cinética de desinfección bacteriana por foto-Fenton solar a pH neutro, disminuyendo el tiempo necesario para alcanzar el límite de detección. Esta característica hace especialmente interesante el uso del proceso foto-Fenton como una alternativa a los tratamientos terciarios actualmente empleados en las EDAR urbanas e industriales donde la complejidad de la matriz acuosa es destacable.
5. Las constantes cinéticas de desinfección obtenidas en el tratamiento de aguas residuales mediante foto-Fenton solar a pH neutro mantienen una correlación lineal con la irradiancia. Al aumentar la irradiancia, aumenta el consumo de peróxido de hidrógeno y, por tanto, la generación de especies oxidantes es el principal responsable de la inactivación bacteriana observada.
6. La energía acumulada es un parámetro adecuado para evaluar la inactivación de microorganismos mediante el proceso foto-Fenton solar a pH neutro bajo condiciones de foto-

limitación. Este hecho tiene importantes implicaciones en el diseño de fotorreactores y en la automatización del proceso de desinfección solar de aguas residuales.

7. Se ha demostrado que el uso del proceso foto-Fenton a pH neutro en fotorreactores CPC solares es eficaz para la desinfección de efluentes del secundario de una EDAR. En estas condiciones, se alcanzan tiempos cortos de inactivación y se obtiene un efluente tratado que cumple con los criterios de calidad exigidos por la legislación española para la reutilización del agua tratada para riego en agricultura.

8. El proceso foto-Fenton solar a pH neutro es un tratamiento adecuado para obtener una reducción de 6-log en la concentración de virus presentes en aguas naturales. Existe un efecto competitivo entre la inactivación de virus y la degradación de la materia orgánica cuando las condiciones oxidantes son suaves.

9. Se ha propuesto un modelo mecanístico para interpretar los resultados del proceso de foto-Fenton solar y proponer los fenómenos más importantes que ocurren durante la inactivación de virus. Según este modelo, en la inactivación de virus mediante foto-Fenton solar a pH neutro, la posible adsorción de las partículas de hierro en el virus tiene un efecto significativo en la eficiencia de inactivación del colifago MS2. La fuente de hierro tiene un papel fundamental, puesto que el tratamiento foto-Fenton llevado a cabo con  $\text{Fe}^{3+}$  es más eficiente que el realizado con  $\text{Fe}^{2+}$ . En este proceso, las especies oxidantes generadas cerca del virus tienen más probabilidad de causar daños letales que aquellas generadas en el seno del líquido.

**CONCLUSIONS**

Based on the discussion of the results obtained, the following conclusions can be drawn in answer to the aims of this research:

1. All through the solar treatments tested, UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV-A/Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe (Fenton) and UV-A/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe (photo-Fenton at neutral pH), independent of the microorganism, the kind of water matrix or the reactor used, the solar photo-Fenton process at neutral pH has proved to be the most effective, achieving a 6-log reduction in microorganisms concentration.
2. In the temperatures range tested (from 10 to 40 °C), the disinfection kinetic constant by the photo-Fenton process varies with the temperature according to an Arrhenius kinetic. An increase of 20 °C reduces the treatment time by half through photo-Fenton.
3. The organic matter in the wastewater competes with microorganisms for oxidant radicals in the disinfection process by solar photo-Fenton at neutral pH. With the aim of both decreasing the treatment time and minimizing the competitive effect, the generation of oxidant radicals should not be limiting.
4. Under oxidant conditions (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe concentrations guaranteeing enough generation of hydroxyl radicals) a complex water matrix benefits the bacterial disinfection kinetic by solar photo-Fenton at neutral pH, reducing the necessary time to achieve the detection limit. This feature makes the use of photo-Fenton process become of interest as an alternative to tertiary treatments currently used in urban and industrial WWTP, where the water matrix complexity is remarkable.
5. Disinfection kinetic constants obtained in the treatment of wastewater by solar photo-Fenton at neutral pH maintain a linear correlation with irradiance. The higher the irradiance is, the higher the consumption of hydrogen peroxide, so the generation of oxidant species is the chiefly responsible for the bacterial inactivation observed.
6. The accumulated energy is an adequate parameter to evaluate the inactivation of microorganisms through solar photo-Fenton at neutral pH under photolimitation conditions. This has important consequences for the design of photoreactors and in the automation of wastewater solar disinfection process.
7. The use of photo-Fenton process at neutral pH in CPC photoreactors has proved to be efficient for the disinfection of WWTP secondary effluents. Under these conditions, low inactivation

times are achieved and a treated effluent meeting the quality criteria demanded by Spanish law about treated water recycling for irrigation in agriculture is obtained.

8. The solar photo-Fenton process at neutral pH is an adequate treatment for a 6-log reduction of virus concentration in natural water. A competitive effect between virus inactivation and organic matter degradation exists when soft oxidant conditions are employed.

9. A mechanistic model for interpreting the results of the solar photo-Fenton process and suggesting the most important phenomena during the virus inactivation has been proposed. Based on this model, during the virus inactivation by the solar photo-Fenton process at neutral pH, the possible adsorption of iron particles on the virus has a significant effect on the inactivation efficiency of the MS2 coliphage. The iron source plays a key role since the photo-Fenton treatment carried out using  $\text{Fe}^{3+}$  is more efficient than that using  $\text{Fe}^{2+}$ . In this process, the oxidant species generated close to the virus are more likely to produce lethal damage than those generated within the liquid.

# REFERENCIAS





## REFERENCIAS

A

- Adams, C., Scanlon, P. A. y Secrist, N. D. (1994). Oxidation and biodegradability enhancement of 1, 4-dioxane using hydrogen peroxide and ozone. *Environmental Science and Technology*, 28, 1812-1818
- Agüera, A., Almansa, E., Tejedor, A., Fernández-Alba, A., Malato, S. y Maldonado, M.I. (2000). Photocatalytic pilot scale degradation study of pyrimethanil and of main degradation products in waters by means of solid-phase extraction followed by gas and liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Environmental Science Technology*, 34(8), 1563-1571
- Agulló-Barceló, M., Polo-López, M. I., Lucena, F., Jofre, J. y Fernández-Ibáñez, P. (2013). Solar advanced oxidation processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: Implications for water reclamation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 136-137, 341-350
- APHA (1998). American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF). Standard Methods for the examination of Water and Waste Water. 20th Edition. *United Book Press Inc.*, Maryland.
- Ananthaswamy, H. N. y Eisenstark, A. (1977). Repair of hydrogen peroxide induced single strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 130(1), 187-191
- Ananthaswamy, H. N., Hartman, P. S. y Eisenstark, A. (1979). Synergistic lethality of phage T7 by near-UV radiation and hydrogen peroxide: An action spectrum. *Photochemistry and Photobiology*, 29(1), 53-56
- Anjem, A. y Imlay, J. A. (2012). Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15544-15556.
- AWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology. (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research*, 25(5) 529-545

Augugliaro, V., Baiocchi, C., Bianco Prevot, A., García-López, E., Loddo, V., Malato, S., Marci, G., Palmisano, L., Pazzi, M. and Pramauro, E. (2002). Azo-dyes photocatalytic degradation in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub> under solar irradiation. *Chemosphere*, 49, 1223-1230

## **B**

Backhaus, K., Marugán, J., Van Grieken, R. y Sordo, C. (2010). Photocatalytic inactivation of *E. faecalis* in secondary wastewater plant effluents. *Water Science and Technology*, 61(9), 2355-2361

Bandala, E. R., González, L., Sánchez-Salas, J. L. y Castillo, J.H. (2012). Inactivation of ascaris eggs in water using sequential solar driven photo-Fenton and free chlorine. *Journal of Water and Health*. 10(1), 20-30

Barona, J.F., Morales, D.F., González-Bahamón, L. F., Pulgarín, C. y Benítez, L.N. (2015). Shift from heterogeneous to homogeneous catalysis during resorcinol degradation using the solar photo-Fenton process initiated at circumneutral pH. *Applied Catalysis B: Environmental*, 165, 620-627

Barrell, R. A., Hunter, P. R. y Nichols, G. (2000). Microbiological standards for water and their relationship to health risk. *Communicable Disease and Public Health/PHLS*, 3(1), 8-13

Basu, S., Page, J. y Wei, I.W. (2007). UV disinfection of treated wastewater effluent: Influence of colour, reactivation and regrowth of coliform bacteria. *Environmental Engineer and Scientist: Applied Research*, 4, 1-8

Baus, C., Sona, M. y Brauch, H. (2007). Ozonation and combined ozone/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/ozone and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for treatment of fuel oxygenates MTBE, ETBE, TAME, and DIPE from water - A comparison of removal efficiencies. *Water Science and Technology*, 55(12), 307-311

Bernabeu, A., Vercher, R. F., Santos-Juanes, L., Simón, P. J., Lardín, C., Martínez, M. A. y Amat, A. M. (2011). Solar photocatalysis as a tertiary treatment to remove emerging pollutants from wastewater treatment plant effluents. *Catalysis Today*, 161(1), 235-240

Berney, M., Weilenmann, H., Ihssen, J., Bassin, C. y Egli, T. (2006). Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2586-2593



- Blanco, J., Malato, S., Fernández, P., Vidal, A., Morales, A., Trincado, P., Oliveira, J.C., Minero, C., Musci, M., Casalle, C., Brunotte, M., Tratzky, S., Dischinger, N., Funken, KH., Sattler, C., Vincent, M., Collares-Pereira, M., Mendes, J.F. y Rangel, C.M. (2000). Compound parabolic concentrator technology development to comercial solar detoxification applications. *Solar Energy*, 67(4-6), 317-330
- Blanco, J. (2002a). Desarrollo de colectores solares sin concentración para aplicaciones fotoquímicas de degradación de contaminantes persistentes en agua. (*Tesis Doctoral*). Universidad de Almería.
- Blanco, J., Malato, S., Lans, P., Hulshoff, L., Wildener, P. y Asano, T. (2002b). Solar photocatalysis: Application to the treatment of pesticides in water. Water recycling and resource recovery. En: Industry: Analysis, Technologies and Implementations. *IWA Publish (Eds.)*, London, UK.
- Bokare, A. D. y Choi, W. (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 275, 121-135
- Bolton, J. R. y Linden, K. G. (2003). Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering*, 129(3), 209-215
- Bosshard, F., armand, F., Hamelin, R. y Kohn, T. (2013). Mechanisms of human adenovirus inactivation by sunlight and UVC light as examined by quantitative PCR and Quantitative proteomics. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1325-1332
- Bossmann, S. H., Oliveros, E., Göb, S., Siegwart, S., Dahlen, E. P., Payawan, L., Straub, M., Wörner, M. y Braun, A. M. (1998). New evidence against hydroxyl radicals as reactive intermediates in the thermal and photochemically enhanced Fenton reactions. *Journal of Physical Chemistry A*. 1998, 102(28), 5542–5550
- Boutibonnes, P., Giard, J. C., Hartke, A., Thammavongs y B., Auffray, Y. (1993). Characterization of the heat shock response in enterococcus faecalis. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 64(1), 47-55
- Bull, R.J. y Kopfler, F.C. (1991). Formation and occurrence of disinfection by-products. In: Health effects of disinfectants and disinfection by-products. Denver, CO, *American Water Works Association Research Foundation*, 55-103

C

- Cadenas, E. y Davies, K. J. A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 222-230
- Camper, A. K., McFeters, G. A., Characklis, W. G. y Jones, W. L. (1991). Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2233-2239
- Carra, I., Casas, J. L., Santos-Juanes, L., Malato, S. y Sánchez, J. A. (2013). Iron dosage as a strategy to operate the photo-Fenton process at initial neutral pH. *Chemical Engineering Journal*, 224(1), 67-74
- Carra, I., García, J. L., Casas, J. L., Malato, S. y Sánchez, J. A. (2014). Phenomenological study and application of the combined influence of iron concentration and irradiance on the photo-Fenton process to remove micropollutants. *Science of the Total Environment*, 478, 123-132
- Catastini, C., Sarakha, M., Mailhot, G. y Bolte, M. (2002). Iron (III) aquacomplexes as effective photocatalysts for the degradation of pesticides in homogeneous aqueous solutions. *Science of the Total Environment*, 298(1-3), 219-228
- Chen, F., Yang, X., Xu, F., Wu, Q. y Zhang, Y. (2009). Correlation of photocatalytic bactericidal effect and organic matter degradation of TiO<sub>2</sub> part I: Observation of phenomena. *Environmental Science and Technology*, 43(4), 1180-1184
- Chikthimmah, N., Laborde, L. F. y Beelman, R. B. (2005). Hydrogen peroxide and calcium chloride added to irrigation water as a strategy to reduce bacterial populations and improve quality of fresh mushrooms. *Journal of Food Science*, 70(6), 273-278
- Cho, M., Lee, Y., Chung, H. y Yoon, J. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* by photochemical reaction of ferrioxalate at slightly acidic and near-neutral pHs. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1129-1134
- Chung, C., Lin, H., Chou, C., Hsieh, P., Hsiao, C., Shi, Z. y He, J. (2009). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surface and Coatings Technology*, 203(8), 1081-1085

- Colford Jr., J. M., Roy, S. L., Beach, M. J., Hightower, A., Shaw, S. E. y Wade, T. J. (2006). A review of household drinking water intervention trials and an approach to the estimation of endemic waterborne gastroenteritis in the United States. *Journal of Water and Health*, 4(2), 71-88
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierzo, V., Boque, M., Gawler, A., Höller, C., Lambiri, M., Mirolo, G., Moreno, B., Niemi, M., Sommer, R., Valentin, B., Wiedenmann, A., Young, V. y Jofre, J. (2002). Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Research*, 36(20), 4963-4974
- Collares-Pereira, M. (1995). The relevance of Non-Imaging optics for solar energy: a review. *Revista de Ingeniería Técnica*, IST, 3

## D

- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M. y Speed, D.J. (1997). Sunlight wavelengths inactivating faecal indicator microorganisms in waste stabilisation ponds. *Water Science and Technology*, 35, 219-225
- Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 761-770
- De la Cruz, N., Esquius, L., Grandjean, D., Magnet, A., Tungler, A., de Alencastro, L. F. y Pulgarín, C. (2013). Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. *Water Research*, 47(15), 5836-5845
- Dell'Arciprete, M. L., Soler, J. M., Santos-Juanes, L., Arques, A., Mártire, D. O., Furlong, J. P. y Gonzalez, M. C. (2012). Reactivity of neonicotinoid insecticides with carbonate radicals. *Water Research*, 46(11), 3479-3489
- Dorfman, L. M., Bühler, R. E. y Taub, I. A. (1962). Absolute rate constant for the reaction of hydroxyl radicals with benzene in water. *The Journal of Chemical Physics*, 36(2), 549-550
- Drakopoulou, S., Terzakis, S., Fountoulakis, M. S., Mantzavinos, D. y Manios, T. (2009). Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(5), 629-634

Duffie, J.A. y Beckman, W.A. (2006). Solar engineering of thermal processes, 3rd edition. ISBN: 978-0-471-69867-8. Ed. John Wiley & Sons, Inc., 928

## F

FAO (2006). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Statistical Yearbook, FAO Electronic Publishing, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, ISBN 92-5-005506-4, p. 55.

Faust, B. C. y Hoigne, J. (1990). Photolysis of Fe(III)-hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. *Atmospheric Environment - Part A General Topics*, 24 A(1), 79-89

Feachem, R. G., Hogan, R. C. y Merson, M. H. (1983). Diarrhoeal disease control: Reviews of potential interventions. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(4), 637-640

Fernández-Ibáñez, P. (2004). Propiedades coloidales de partículas de TiO<sub>2</sub>: aplicación al tratamiento fotocatalítico solar de aguas. (*Tesis Doctoral*). Universidad de Granada, España.

Fernández-Ibáñez, P., Sichel, C., Polo-López, M. I., de Cara-García, M. y Tello, J. C. (2009). Photocatalytic disinfection of natural well water contaminated by *Fusarium solani* using TiO<sub>2</sub> slurry in solar CPC photo-reactors. *Catalysis Today*, 144(1-2), 62-68

Feuerstein, O., Moreinos, D. y Steinberg, D. (2006). Synergic antibacterial effect between visible light and hydrogen peroxide on streptococcus mutans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 872-876

Flynn Jr., C. M. (1984). Hydrolysis of inorganic iron(III) salts. *Chemical Reviews*, 84(1), 31-41

## G

Geldreich, E. E. (1996). Pathogenic agents in freshwater resources. *Hydrological Processes*, 10(2), 315-333

García-Fernández, I., Polo-López, M. I., Oller, I. y Fernández-Ibáñez, P. (2012). Bacteria and fungi inactivation using Fe<sup>3+</sup>/sunlight, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study. *Applied Catalysis B: Environmental*, 121-122, 20-29

- García-Fernández, I., Fernández-Calderero, I., Polo-López, M. I. y Fernández-Ibáñez, P. (2015). Disinfection of urban effluents using solar TiO<sub>2</sub> photocatalysis: A study of significance of dissolved oxygen, temperature, type of microorganism and water matrix. *Catalysis Today*, 240, 30–38
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H. y Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P. y Van Impe, J. F. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 95-105
- Gerba, C. P. (1984). Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied Microbiology*, 30, 133-168
- Giannakis, S., Papoutsakis, S., Darakas, E., Escalas-Cañellas, A., Pétrier, C. y Pulgarín C. (2015). Ultrasound enhancement of near-neutral photo-Fenton for effective *E. coli* inactivation in wastewater. *Ultrasonic Sonochemistry*, 22, 515-26
- Gibbons, C. D., Rodríguez, R. A., Tallon, L. y Sobsey, M. D. (2010). Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of noroviruses, adenoviruses and male-specific coliphages from seawater. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 635-641
- Gibson, K. E., Opryszko, M. C., Schissler, J. T., Guo, Y. y Schwab, K. J. (2011). Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(1), 20-29
- Gofti, L., Zmirou, D., Seigle Murandi, F., Hartemann, P. y Potelon, J. L. (1999). Waterborne microbiological risk assessment: A state of the art and perspectives. *Revue d'Epidemiologie Et De Sante Publique*, 47(1), 61-73
- Gogate, P. R. y Pandit, A. B. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: Oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, 8(3-4), 501-551

Gomes, A. I., Vilar, V. J. P. y Boaventura, R. A. R. (2009). Synthetic and natural waters disinfection using natural solar radiation in a pilot plant with CPCs. *Catalysis Today*, 144(1-2), 55-61

Grabow, W.O.K. (2001). Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA*, 27(2), 251-268

Grocock, N.H. (1984). Disinfection of drinking water by ultraviolet light. *Journal of the Institute of Water Engineers and Scientists*, 38(20), 163-172

Guía para la aplicación del R.D. 1620/2007 por el que se establece el Régimen Jurídico de la Reutilización de las Aguas Depuradas. (2010). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Marino y Rural. Gobierno de España. ISBN 978-84-491-0998-0

## **H**

Havelaar, A. H., Van Olphen, M. y Drost, Y. C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 2956-2962

Hawker, P. N. y Twing, M. V. (1994). King, P. B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. Wiley, Chichester, 1968.

Herrmann, J.M., Guillard, Ch., Disdier, J., Lehaut, C., Malto, S. y Blanco, J. (2002). New industrial titania photocatalysts for the solar detoxification of water containing various pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 35, 281-294

Huang, S. W., Chang, C. H., Tai, T. F. y Chang, T. C. (1997). Comparison of the  $\beta$ -glucuronidase assay and the conventional method for identification of *Escherichia coli* on eosin-methylene blue agar. *Journal of Food Protection*, 60(1), 6-9

Hu, L., Page, M. A., Sigstam, T., Kohn, T., Mariñas, B. J. y Strahmann, T. J. (2012). Inactivation of Bacteriophage MS2 with Potassium Ferrate (VI) *Environmental Science and Technology*, 46, 12079-12087

Huang, S.W., Hsu, B. M., Ma, P. H. y Chien, K. T. (2009). Legionella prevalence in wastewater treatment plants of Taiwan. *Water Science & Technology*, 60(5), 1303-1310

---

Hug, S. J. y Leupin, O. (2003). Iron-catalyzed oxidation of arsenic (III) by oxygen and by hydrogen peroxide: pH-dependent formation of oxidants in the Fenton reaction. *Environmental Science and Technology*, 37, 2734–2742

Hutton, G., Haller, L. y Bartram, J. (2007). *Economic and Health Effects of Increasing Coverage of Low Cost Household Drinking-Water Supply and Sanitation Interventions to Countries Off-Track to Meet MDG Target 10*

Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Scraufstatter, I. U., Cochrane, C. G., Kunz, S. y Vosbeck, K. (1995). Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: Implications for host defense. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(1), 31-37

## I

Ijpelaar, G. F., Harmsen, D. J. H., Beerendonk, E. F., van Leerdam, R. C., Metz, D. H., Knol, A. H., Fulmer, A. y Krijnen, S. (2010). Comparison of low pressure and medium pressure UV lamps for UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of natural waters containing micro pollutants. *Ozone: Science and Engineering*, 32(5), 329-337

Imlay, J. A. y Linn, S. (1986). Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 166(2), 519-527

Imlay, J. A., Chin, S. M. y Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240(4852), 640-642

Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 755-776

Jiménez-Hernández, M. E., Manjón, F., García-Fresnadillo, D. y Orellana, G. (2006). Solar water disinfection by singlet oxygen photogenerated with polymer-supported ru(II) sensitizers. *Solar Energy*, 80(10), 1382-1387

## J

Jolivet, J., Tronc, E. y Chanéac, C. (2006). Iron oxides: From molecular clusters to solid. A nice example of chemical versatility. *Comptes Rendus - Geoscience*, 338(6-7), 488-497

Jurzik, L., Hamza, I. A., Puchert, W., Überla, K. y Wilhelm, M. (2010). Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(3), 210-216

## **K**

Kadir, K. y Nelson, K. L. (2014). Sunlight mediated inactivation mechanisms of *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* in clear water versus waste stabilization pond water. *Water Research*, 50, 307-317

Kamel, A. H., Ali, M. A., El-Nady, H. G., Aho, S., Pothier, P. y Belliot, G. (2010). Evidence of the co-circulation of enteric viruses in sewage and in the population of greater Cairo. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1620-1629

Keenan, C. R. y Sedlak, D. L. (2008). Factors affecting the yield of oxidants from the reaction of nanonarticulate zero-valent iron and oxygen. *Environmental Science and Technology*, 42(4), 1262-1267

Kim, J. Y., Lee, C., Sedlak, D. L., Yoon, J. y Nelson, K. L. (2010). Inactivation of MS2 coliphage by Fenton's reagent. *Water Research*, 44(8), 2647-2653

Kim, J.Y., Lee, C., Love, D.C., Sedlak, D.L., Yoon, J. y Nelson, K.L. (2011). Inactivation of MS2 coliphage by ferrous ion and zero-valent iron nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 45(16), 6978-6984

Klamerth, N., Miranda, N., Malato, S., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R., Maldonado, M. I. y Coronado, J. M. (2009). Degradation of emerging contaminants at low concentrations in MWTPs effluents with mild solar photo-Fenton and TiO<sub>2</sub>. *Catalysis Today*, 144(1-2), 124-130

Klamerth, N., Malato, S., Agüera, A., Fernández-Alba, A. y Mailhot, G. (2012). Treatment of municipal wastewater treatment plant effluents with modified photo-Fenton as a tertiary treatment for the degradation of micro pollutants and disinfection. *Environmental Science and Technology*, 46(5), 2885-2892

Klamerth, N., Malato, S., Agüera, A. y Fernández-Alba, A. (2013). Photo-Fenton and modified photo-fenton at neutral pH for the treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluents: A comparison. *Water Research*, 47(2), 833-840



- Kochany, J. y Lipczynska-Kochany, E. (1992). Application of the EPR spin-trapping technique for the investigation of the reactions of carbonate, bicarbonate, and phosphate anions with hydroxyl radicals generated by the photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Chemosphere*, 25(12), 1769-1782.
- Koivunen, J. y Heinonen-Tanskiöf. H. (2005). Enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research*, 39(8), 1519–1526
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: The main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 81-92.
- Ksibi, M. (2006). Chemical oxidation with hydrogen peroxide for domestic wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 119(2-3), 161-165
- Kühn, K. P., Chaberny, I. F., Massholder, K., Stickler, M., Benz, V. W., Sonntag, H. y Erdinger, L. (2003). Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere*, 53(1), 71-77

## L

- Lam, S. W., Chiang, K., Lim, T. M., Amal, R. y Low, G. K. (2005). The role of ferric ion in the photochemical and photocatalytic oxidation of resorcinol. *Journal of Catalysis*, 234(2), 292-299
- Lazarova, V., Savoye, P., Janex, M. L., Blatchley III, E. R. y Pommepuy, M. (1999). Advanced wastewater disinfection technologies: State of the art and perspectives. *Water Science and Technology*, 40(4-5), 203-213
- LeChevallier, M. W. y Au, K. K. (2004). *Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*.
- LeChevallier, M. W. (1990). Coliform regrowth in drinking water. A review. *Journal / American Water Works Association*, 82(11), 74-86
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V. y Delattre, J.M. (2000). Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 5-21

- Le Dantec, C., Duguet, J. Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. y Vincent, V. (2002). Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1025-1032
- Li, H. y Ni, J. (2012). Electrogeneration of disinfection byproducts at a boron-doped diamond anode with resorcinol as a model substance. *Electrochimica Acta*, 69, 268-274
- Lin, J. y Ganesh, A. (2013). Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses (review). *International Journal of Environmental Health Research*, 23(6), 484-506
- Linn, S., y Imlay, J. A. (1987). Toxicity, mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Cell Science*, 6, 289-301
- Lytle, C. D. y Sagripanti, J.L. (2005). Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *Journal of Virology*, 79(22), 14244-14252

## **M**

- Mailhot, G., Sarakha, M., Lavedrine, B., Cáceres, J. y Malato, S. (2002). Fe(III)-solar light induced degradation of diethyl phthalate (DEP) in aqueous solutions. *Chemosphere*, 49(6), 525-532
- Malato, S., Richter, C., Blanco, J. y Vincent M. (1996). Photocatalytic degradation of industrial residual waters. *Solar Energy*, 56(5), 401-410
- Malato, S., Blanco, J., Richter, C. y Maldonado, M.I. (2000a). Optimization of pre-industrial solar photocatalytic mineralization of commercial pesticides. Application to pesticide container recycling. *Applied Catalysis B: Environmental*, 25, 31-38
- Malato, S., Blanco, J., Maldonado, M.I., Fernández-Ibáñez, P. y Campos, A. (2000b). Optimising solar photocatalytic mineralization of pesticides by adding inorganic oxidizing species: application to the recycling of pesticide containers. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28(3), 163-174
- Malato, S., Blanco, J., Vidal, A. y Richter, C. (2002a). Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. *Applied Catalysis B: Environmental*, 37, 1-15

- Malato, S., Blanco, J., Vidal, A., Fernández, P., Cáceres, J., Trincado, P., Oliveira, J.C. y Vincent, M. (2002b). New large solar photocatalytic plant: set-up and preliminary results. *Chemosphere*, 47, 235-240
- Malato, S., Blanco, J., Maldonado, M.I., Fernández, P., Alarcón, D., Collares, M., Farinha, J. y Correia de Oliveira, J. (2004). Engineering of solar photocatalytic collectors. *Solar Energy*, 77, 513-524
- Malato, S., Blanco, J., Maldonado, M. I., Fernández, P., Gernjak, W. y Oller, I. (2005). *Chemosphere*, 58, 391-398
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J. y Gernjak, W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147(1), 1-59
- Maldonado, M. I., Passarinho, P. C., Oller, I., Gernjak, W., Fernández, P., Blanco, J. y Malato, S. (2007). Photocatalytic degradation of EU priority substances: A comparison between TiO<sub>2</sub> and Fenton plus photo-Fenton in a solar pilot plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 185(2-3), 354-363
- Mamane, H., Shemer, H. y Linden, K.G. (2007). Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 146(3), 479-486
- Mariñas, J.L., Owens, B.J. y Rice, J.H. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Rennecker*, 33(11), 2481-2488
- Marugán, J., Van Grieken, R., Sordo, C. y Cruz, C. (2008). Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 82(1-2), 27-36
- Marugán, J., van Grieken, R., Pablos, C. y Sordo, C. (2010). Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Research*, 44(3), 789-796
- Marugán, J., Van Grieken, R. y Pablos, C. (2011). Photocatalytic disinfection of water. *Water Disinfection*, 169-197

- Maunula, L., Miettinen, I. T. y Von Bonsdorff, C. (2005). Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerging Infectious Diseases*, 11(11), 1716-1721
- Masschelein, W. J. (2002). Ultraviolet light in water and wastewater sanitation. ISBN 1-56670-603-3, 174. Ed. R.P. Rice., CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- McFeters, G. A., Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., Thomson, C. A. y Stuart, D. G. (1974). Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Journal of Applied Microbiology*, 27(5), 823-829
- McGuigan, K. G., Joyce, T. M., Conroy, R. M., Gillespie, J. B. y Elmore-Meegan, M. (1998). Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: Characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1138-1148
- McGuigan, K. G., Conroy, R. M., Mosler, H., du Preez, M., Ubomba-Jaswa, E. y Fernández-Ibañez, P. (2012). Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top. *Journal of Hazardous Materials*, 235-236, 29-46
- Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R. y Mazumder, A. (2004). Source tracking fecal bacteria in water: A critical review of current methods. *Journal of Environmental Management*, 73(1), 71-79
- Meng, Q.S. y Gerba, C.P. (1996). Comparative inactivation of enteric adenoviruses, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Research*, 30(11), 2665-2668
- Miles, A.A., Misra, S.S. y Irwin, J.O., (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene*, 38(6), 732-749
- Moncayo-Lasso, A., Torres-Palma, R. A., Kiwi, J., Benítez, N. y Pulgarín, C. (2008). Bacterial inactivation and organic oxidation via immobilized photo-Fenton reagent on structured silica surfaces. *Applied Catalysis B: Environmental*, 84(3-4), 577-583
- Moncayo-Lasso, A., Sanabria, J., Pulgarin, C. y Benítez, N. (2009). Simultaneous *E. coli* inactivation and NOM degradation in river water via photo-Fenton process at natural pH in solar CPC reactor. A new way for enhancing solar disinfection of natural water. *Chemosphere*, 77(2), 296-300

---

Moncayo-Lasso, A., Mora-Arismendi, L.E., Rengifo-Herrera, J., Sanabria, J., Benítez, N. y Pulgarín, C. (2012). The detrimental influence of bacteria (*E. coli*, *Shigella* and *Salmonella*) on the degradation of organic compounds (and vice versa) in TiO<sub>2</sub> photocatalysis and near-neutral photo-Fenton processes under simulated solar light. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 11(5), 821-827

Morgan, B. y Lahav, O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O<sub>2</sub> in aqueous solution-basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere*, 68(11), 2080-2084

Muñoz, M., Alonso, J., Bartroli, J. y Valiente, M. (1990). Automated spectrophotometric determination of titanium(IV) in water and brines by flow injection based on its reaction with hydrogen peroxide. *Analyst*, 115(3), 315-318

## N

Naidoo S. y Olaniran A. O. (2014). Treated Wastewater Effluent as a Source of Microbial Pollution of Surface Water Resources. *International Journal on Environmental Research and Public Health*, 11, 249-270

Navntoft, C., Ubomba-Jaswa, E., McGuigan, K. G. y Fernández-Ibañez, P. (2008). Effectiveness of solar disinfection using batch reactors with non-imaging aluminium reflectors under real conditions: Natural well-water and solar light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 93(3), 155-161

Navntoft, L.C., Fernández-Ibañez, P. y Garreta, F. (2012). UV solar radiation on a tilted and horizontal plane: Analysis and comparison of 4 years of measurements. *Solar Energy*, 86, 307-318

Ndounla, J., Spuhler, D., Kenfack, S., Wéthé, J. y Pulgarin, C. (2013). Inactivation by solar photo-fenton in pet bottles of wild enteric bacteria of natural well water: Absence of re-growth after one week of subsequent storage. *Applied Catalysis B: Environmental*, 129, 309-317

Ndounla, J., Kenfack, S., Wéthé, J. y Pulgarín, C. (2014). Relevant impact of irradiance (vs. dose) and evolution of pH and mineral nitrogen compounds during natural water disinfection by photo-Fenton in a solar CPC reactor. *Applied Catalysis B: Environmental*, 148-149, 144-153

Ndounla, J. y Pulgarín C. (2014). Evaluation of the efficiency of the photo-Fenton disinfection of natural drinking water source during the rainy season in the Sahelian region. *Science of the Total Environment*, 493, 229-38

Neyens, E. y Baeyens, J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials*, 98(1-3), 33-50

Nieto-Juárez, J. I., Pierzchla, K., Sienkiewicz, A. y Kohn, T. (2010). Inactivation of MS2 coliphage in fenton and fenton-like systems: Role of transition metals, hydrogen peroxide and sunlight. *Environmental Science and Technology*, 44(9), 3351-3356

Nieto-Juárez, J.I. y Kohn, T. (2013). Virus removal and inactivation by iron (hydr)oxide-mediated Fenton-like processes under sunlight and in the dark. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 12(9), 1596-1605

Nogueira, R. F. P., Oliveira, M. C. y Paterlini, W. C. (2005). Simple and fast spectrophotometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta*, 66(1), 86-91

## O

OMS. (2006). Guidelines for the safe use of wastewater. Vol. 4: Excreta and greywater. *Organización Mundial de la Salud*. ISBN: 92 4 154685 9

OMS. (2011). Evaluating Household Water Treatment Options: Health based targets and microbiological performance specifications. *Organización Mundial de la Salud*. ISBN: 978 92 4 154822 9.

OMS. (2011). Guidelines for drinking water. 4<sup>th</sup> edition. *Organización Mundial de la Salud*. ISBN: 978 924 154815 1. pp 564.

Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K. y Ezura, Y. (2003). Seven-hour fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of enterobacteriaceae in food and environmental water sample. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1182-1190

## P

- 
- Pang, S.-Y., Jiang, J. y Ma, J. (2011). Document Oxidation of sulfoxides and arsenic (III) in corrosion of nanoscale zero valent iron by oxygen: Evidence against ferryl ions (Fe(IV)) as active intermediates in Fenton reaction. *Environmental Science and Technology*, 45(1), 307-312
- Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E. y Prévost, M. (1997). A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *International Journal of Environmental Health Research*, 7(1), 5-31
- Pecson, B.M., Decrey, L. y Kohn, T. (2012). Photoinactivation of virus on iron-oxide coated sand: Enhancing inactivation in sunlit waters. *Water Research*, 46(6), 1763-1770
- Peeters, E., Sass, A., Mahenthiralingam, E., Nelis, H. y Coenye, T. (2010). *BMC Genomics*, 1-18.
- Pereira, R. O., Postigo, C., de Alda, M. L., Daniel, L. A. y Barceló, D. (2011). Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, 82(6), 789-799
- Pignatello, J. J., Oliveros, E. y MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1-84
- Polo-López, M. I., Fernández-Ibáñez, P., García-Fernández, I., Oller, I., Salgado-Tránsito, I. y Sichel, C. (2010). Resistance of *Fusarium sp* spores to solar TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Influence of spore type and water (scaling-up results). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(8), 1038-1048
- Polo-López, M. I., García-Fernández, I., Oller, I. y Fernández-Ibáñez, P. (2011). Solar disinfection of fungal spores in water aided by low concentrations of hydrogen peroxide. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10(3), 381-388
- Polo-López, M. I., García-Fernández, I., Velegraki, T., Katsoni, A., Oller, I., Mantzavinos, D. y Fernández-Ibáñez, P. (2012). Mild solar photo-Fenton: An effective tool for the removal of *fusarium* from simulated municipal effluents. *Applied Catalysis B: Environmental*, 111-112, 545-554

Polo-López, M. I., Oller, I. y Fernández-Ibáñez, P. (2013). Benefits of photo-Fenton at low concentrations for solar disinfection of distilled water. A case study: *Phytophthora capsici*. *Catalysis Today*, 209, 181-187

Polo-López, M. I., Castro-Alfárez, M., Oller, I. y Fernández-Ibáñez, P. (2014). Assessment of solar photo-Fenton, photocatalysis, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for removal of phytopathogen fungi spores in synthetic and real effluents of urban wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 257, 122-130

Prado, T., Silva, D. M., Guilayn, W. C., Rose, T. L., Gaspar, A. M. C. y Miagostovich, M. P. (2011). Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Research*, 45(3), 1287-1297

## **R**

Ramirez, J. H., Maldonado-Hódar, F. J., Pérez-Cadenas, A. F., Moreno-Castilla, C., Costa, C. A. y Madeira, L. M. (2007). Azo-dye orange II degradation by heterogeneous Fenton-like reaction using carbon-Fe catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 75(3-4), 312-323

Real Decreto 1620/2007 del 7 de diciembre 2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de aguas depuradas. BOE nº 294.

Remucal, C.K., Lee, C. y Sedlak, D.L. (2011). Comment on "oxidation of sulfoxides and arsenic (III) in corrosion of nanoscale zero valent iron by oxygen: Evidence against ferryl ions (Fe(IV)) as active intermediates in Fenton reaction". *Environmental Science and Technology*, 45(7), 3177-3178

Rennecker, J. L., Mariñas, B. J., Owens, J. H. y Rice, E. W. (1999). Inactivation of cryptosporidium parvum oocysts with ozone. *Water Research*, 33(11), 2481-2488

Rincón, A. y Pulgarín, C. (2004a). Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub>: Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 51(4), 283-302

Rincón, A. y Pulgarín, C. (2004b). Field solar *E. coli* inactivation in the absence and presence of TiO<sub>2</sub>: Is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection? *Solar Energy*, 77(5), 635-648



- Rincón, A. y Pulgarín, C. (2006). Comparative evaluation of Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 63(3-4), 222-231
- Rincón, A. y Pulgarin, C. (2007a). Absence of *E. coli* regrowth after Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> solar photoassisted disinfection of water in CPC solar photoreactor. *Catalysis Today*, 124(3-4), 204-214
- Rincón, A. y Pulgarín, C. (2007b). Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> solar-light-assisted inactivation of *E. coli* at field scale. Implications in solar disinfection at low temperature of large quantities of water. *Catalysis Today*. 122(1-2), 128-36
- Rios-Enriquez, M., Shahin, N., durán-de-Bazúa, C., Lang, J., Oliveros, E., Bossmann, S. H. and Braun, A. M. (2004). Optimization of the heterogeneous Fenton-oxidation of the model pollutant 2,4-xylidine using the optimal experimental design methodology. *Solar Energy*, 77, 491-501.
- Robert, D. y Malato, S. (2002). Solar photocatalysis: a clean process for water detoxification. *Science of the Total Environment*, 291, 85-97
- Robertson, J. M. C., Robertson, P. K. J. y Lawton, L. A. (2005). A comparison of the effectiveness of TiO<sub>2</sub> photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 175(1), 51-56
- Rodríguez-Chueca, J. R., Mosteo, R., Ormad, M. P., Miguel, N. y Ovelleiro, J. L. (2012). Heterogeneous Fenton and photo-Fenton processes for disinfection of treated urban wastewater. *Water Technology*, 32(337), 72-7
- Rodríguez-Chueca, J., Morales, M., Mosteo, R., Ormad, M. P. y Ovelleiro, J. L. (2013). Inactivation of *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* present in treated urban wastewater by coagulation-flocculation and photo-Fenton processes. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 12(5), 86-871
- Rodríguez-Chueca, J., Polo-López, M. I., Mosteo, R., Ormad, M. P. y Fernández-Ibáñez, P. (2014). Disinfection of real and simulated urban wastewater effluents using a mild solar photo-Fenton. *Applied Catalysis B: Environmental*, 150-151, 619-629

- Rodriguez, R.A., Bounty, S., Beck, S., Chan, C., McGuire, C. y Linden, K.G. (2014). Photoreactivation of bacteriophages after UV disinfection: Role of genome structure and impacts of UV source. *Water Research*, 55, 143-149
- Romero, M., Blanc, J., Sánchez, B., Vidal, A., Malato, S., Cardona, A. y García, E. (1999). Solar photocatalytic degradation of water and air pollutants: challenges and perspectives. *Solar Energy*, 66(2), 169-182
- Rosado-Lausell, R. L., Wang, H., Gutiérrez, L., Romero-Maraccini, O. C., Niu, X-Z., Gin, K. H., Croué, J. P. y Nguyen, T. H. (2013). Roles of singlet oxygen and triplet excited state of dissolved organic matter formed by different organic matters in bacteriophage MS2 inactivation. *Water Research*, 47(14), 4869-79
- Ruales-Lonfat, C., Benítez, N., Sienkiewicz, A. y Pulgarín, C. (2014). Deleterious effect of homogeneous and heterogeneous near-neutral photo-Fenton system on *Escherichia coli*. comparison with photo-catalytic action of TiO<sub>2</sub> during cell envelope disruption. *Applied Catalysis B: Environmental*, 160-161(1), 286-297
- Rubio, D., Nebot, E., Casanueva, J. F. y Pulgarín, C. (2013). Comparative effect of simulated solar light, UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton treatment (UV-Vis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+/3+</sup>) in the *Escherichia coli* inactivation in artificial seawater. *Water Research*, 47(16), 6367-79
- Ruiz-Aguirre, A., Polo-López, M. I., Fernández-Ibáñez, P. y Zaragoza, G. (2014). Assessing the validity of solar membrane distillation for disinfection of contaminated water. *Desalination and Water Treatment*. In press.

## S

- Sánchez-Pérez, J. A., Román, I. M., Carra, I., Cabrera, A., Casas, J. L. y Malato, S. (2013). Economic evaluation of a combined photo-Fenton/MBR process using pesticides as model pollutant. Factors affecting costs. *Journal of Hazardous Materials*, 244-245, 195-203
- Santos, M. C., Martín, I. y Trujillo, E. M. (2014). Nematodes as a factor for consideration in the wastewater treatment and water reuse process. *Desalination and Water Treatment*, 52(25-27), 4715-4720

- 
- Santos-Juanes, L., Ballesteros, M. M., Ortega, E., Cabrera, A., Román, I. M., Casas, J. L. y Sánchez, J. A. (2011a). Economic evaluation of the photo-Fenton process. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 1924-1929
- Santos-Juanes, L., Sánchez, J. L. G., López, J. L. C., Oller, I., Malato, S. y Sánchez Pérez, J. A. (2011b). Dissolved oxygen concentration: A key parameter in monitoring the photo-Fenton process. *Applied Catalysis B: Environmental*, 104(3-4), 316-323
- Sattler, U., Calsou, P., Boiteux, S. y Salles, B. (2000). Detection of oxidative base DNA damage by a new biochemical assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376(1), 26-33
- Sciacca, F., Rengifo-Herrera, J. A., Wéthé, J. y Pulgarín, C. (2010). Dramatic enhancement of solar disinfection (SODIS) of wild *Salmonella sp.* in PET bottles by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition on natural water of Burkina Faso containing dissolved iron. *Chemosphere*, 78(9), 1186-1191
- Sherchan, S.P., Snyder, S.A., Gerba, C.P. y Pepper, I.L. (2014). Inactivation of MS2 coliphage by UV and hydrogen peroxide: Comparison by cultural and molecular methodologies. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49(4), Pages 397-403
- Sichel, C., Blanco, J., Malato, S. y Fernández-Ibáñez, P. (2007). Effects of experimental conditions on *E. coli* survival during solar photocatalytic water disinfection. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 189(2-3), 239-246
- Sichel, C., Fernández-Ibáñez, P., de Cara, M. y Tello, J. (2009). Lethal synergy of solar UV-radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on wild *Fusarium solani* spores in distilled and natural well water. *Water Research*, 43(7), 1841-1850
- Silverman, A. I., Peterson, B. M., Boehm, A. B., McNeill, K. y Nelson, K. L. (2013). Sunlight inactivation of human viruses and bacteriophages in coastal waters containing natural photosensitizers. *Environmental Science and Technology*, 47(4), 1870-1878
- Sinclair, R.G., Jones E.L. y Gerba, C.P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 769-1780

- Sivaraja, R. y Nagarajan, K. (2014). Levels of indicator microorganisms (total and fecal coliforms) in surface waters of rivers cauvery and bhavani for circuitously predicting the pollution load and pathogenic risks. *International Journal of PharmTech Research*, 6(2), 455-461
- Spinks, A. T., Dunstan, R. H., Harrison, T., Coombes, P. y Kuczera, G. (2006). Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Research*, 40(6), 1326-1332
- Spuhler, D., Andrés Rengifo-Herrera, J. y Pulgarin, C. (2010). The effect of  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $H_2O_2$  and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. *Applied Catalysis B: Environmental*, 96(1-2), 126-141
- Symonds, E.M., Griffin, D.W. y Breitbart, M. (2009). Viruses in wastewater samples from the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1402-1409
- Szewzyk, U., Manz, W., Amann, R., Schleifer, K. y Stenström, T. (1994). Growth and in situ detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water-bacterium by use of 16S- and 23S-rRNA- directed fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*, 13(3), 169-175

## I

- Tchobanoglous, G., Burton, F. L. y Stensel, H. D. (2005). Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. *Metcalf & Eddy Inc.*
- Templeton, M.R., Andrews, R.C. y Hofmann, R. (2006). Impact of iron particles in groundwater on the UV inactivation of bacteriophages MS2 and T4. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 732-741
- Teodoro, A., Boncz, M. Á., Júnior, A. M. y Paulo, P. L. (2014). Disinfection of greywater pre-treated by constructed wetlands using photo-Fenton: Influence of pH on the decay of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2(2), 958-62
- Thompson, S. S., Jackson, J. L., Suva-Castillo, M., Yanko, W. A., El Jack, Z., Kuo, J., Chen, C.-L., Williams, F.P. y Schnurr, D. P. (2003). Detection of infectious human adenoviruses in

- tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environment Research*, 75(2), 163-170
- Timchak, E. y Gitis, V. (2012). A combined degradation of dyes and inactivation of viruses by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Chemical Engineering Journal*, 192, 164-170
- Tokumura, M., Morito, R., Hatayama, R. y Kawase, Y. (2011). Iron redox cycling in hydroxyl radical generation during the photo-fenton oxidative degradation: Dynamic change of hydroxyl radical concentration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 106(3-4), 565-576
- Tolba, K.M. (1992). Saving our planet: Challenges y hopes. UNEP (United Nations Environment Programme). Springer, Nairobi, ISBN: 0 412 47370 4, pp 293.
- Tong, H. y Lu, Y. (2011). Effective detection of human adenovirus in Hawaiian waters using enhanced PCR methods. *Virology Journal*, 8
- Trovó, A. G., Nogueira, R. F. P., Agüera, A., Fernandez-Alba, A. R., Sirtori, C. y Malato, S. (2009). Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. *Water Research*, 43(16), 3922-3931
- Tuladhar, E., Terpstra, P., Koopmans, M. y Duizer, E. (2012). Virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour disinfection. *Journal of Hospital Infection*, 80(2), 110-115
- U**
- Ubomba-Jaswa, E., Boyle, M. A. R. y McGuigan, K. G. (2008). Inactivation of enteropathogenic *E. coli* by solar disinfection (SODIS) under simulated sunlight conditions. *Journal of Physics: Conference Series*, 101(1)
- Ubomba-Jaswa, E., Navntoft, C., Polo-López, M. I., Fernandez-Ibáñez, P. y McGuigan, K. G. (2009). Solar disinfection of drinking water (SODIS): An investigation of the effect of UV-A dose on inactivation efficiency. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(5), 587-595
- Ubomba-Jaswa, E., Fernández-Ibáñez, P., Navntoft, C., Polo-López, M.I. y McGuigan, K.G. (2010). Investigating the microbial inactivation efficiency of a 25 L batch solar disinfection (SODIS) reactor enhanced with a compound parabolic collector (CPC) for household use. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(8), 1028-1037

Umali, D.L. (1993). Irrigation-induced salinity: a growing problem for development and the environment. World Bank Technical Paper Nº 215. Banco Mundial, Washington DC, ISBN: 0-8213-2508-6, pp 98

## V

Valegard, K., Liljas, L., Fridborg, K. y Unge, T. (1990). The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature*, 345(6270), 36-41

Van Grieken, R., Marugán, J., Pablos, C., Furones, L. y López, A. (2010). Comparison between the photocatalytic inactivation of gram-positive *E. faecalis* and gram-negative *E. coli* faecal contamination indicator microorganisms. *Applied Catalysis B: Environmental*, 100(1-2), 212-220

Vidal, A., Díaz, A.I., El Hraiki, A., Romero, M., Muguruza, I., Senhaji, F. y González, J. (1999). Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of contaminated water: pilot plant studies. *Catalysis Today*, 54(2-3), 283-290

Villén, L., Manjón, F., García-Fresnadillo, D. y Orellana, G. (2006). Solar water disinfection by photocatalytic singlet oxygen production in heterogeneous medium. *Applied Catalysis B: Environmental*, 69(1-2), 1-9

## W

Wegelin, M., Canonica, S., Mechsner, K., Fleischmann, T., Pesaro, F. y Metzler, A. (1994). Solar water disinfection: Scope of the process and analysis of radiation experiments. *Aqua: Journal of Water Supply Research and Technology*, 43(4), 154-169

Weinbauer, M.G., Wilhelm, S.W., Suttle, C.A. y Garza, D.R. (1997). Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2200-2205

Wigginton, K.R., Menin, L., Montoya, J. P. y Kohn, T. (2010). Oxidation of virus proteins during UV254 and singlet oxygen mediated inactivation. *Environmental Science and Technology*, 44(14), 5437-5443

- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F. y Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental Science and Technology*, 46(21), 12069-12078
- Wilkes, D. (2009). Drinking water quality optimization: Distribution system focus. *Distribution Systems Symposium and Exhibition 2009, DSS 2009*, 446-454
- Wilson, B. A., Salyers, A. A., Whitt, D. D. y Winkler, M. E. (2011). Bacterial Pathogenesis, A molecular approach. Third edition. *ASM Press*.
- Wink, D. A., Nims, R. W., Desrosiers, M. F., Ford, P. C. y Keefer, L. K. (1991). A kinetic investigation of intermediates formed during the Fenton reagent mediated degradation of N-nitrosodimethylamine: Evidence for an oxidative pathway not involving hydroxyl radical. *Chemical Research in Toxicology*, 4(5), 510–512
- Woodmansee, A. N. y Imlay, J. A. (2002). Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34055-34066

## X

- Xie, R. J., Gomez, M. J. y Xing, Y. J. (2007). Field investigation of advanced oxidation of secondary effluent from municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 42(13), 2047-2057

## Z

- Zamxaka, M., Pironcheva, G. y Muyima, N. Y. O. (2004). Microbiological and physico-chemical assessment of the quality of domestic water sources in selected rural communities of the eastern cape province, south africa. *Water SA*, 30(3), 333-340
- Zapata, A., Oller, I., Bizani, E., Sánchez-Pérez, J. A., Maldonado, M. I. y Malato, S. (2009). Evaluation of operational parameters involved in solar photo-Fenton degradation of a commercial pesticide mixture. *Catalysis Today*, 144(1-2), 94-99

Zhang, Z. y Gamage, J. (2010). Applications of photocatalytic disinfection. *International Journal of Photoenergy*, Article ID 764870

Zhang, K., Meng, Z. y Oh, W. (2010). Degradation of rhodamine B by Fe-carbon nanotubes/TiO<sub>2</sub> composites under UV light in aerated solution. *Chinese Journal of Catalysis*, 31(7), 751-758



---

**PÁGINAS WEBS CITADAS**

- BBC (British Broadcasting Corporation):  
<http://www.bbc.co.uk/spanish/especiales/agua/default.stm>
- FAO (Food and Agriculture Organization) Water at a Glance (2011):  
[www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf](http://www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf)
- WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme (JMP) for Water Supply and Sanitation:  
<http://www.wssinfo.org/>
- Human Development Report, UNDP, 2006:  
<http://hdr.undp.org/en/reports/global/hdr2006/chapters/>
- UN-water global analysis and assessment of sanitation and drinking-water, WHO, 2014:  
<http://www.unwater.org/publications/publications-detail/en/c/269604/>
- Estado de la población mundial, UNFPA, 2011:  
[http://foweb.unfpa.org/SWP2011/reports/SP-SWOP2011\\_Final.pdf](http://foweb.unfpa.org/SWP2011/reports/SP-SWOP2011_Final.pdf)
- Reutilización de las aguas residuales para riego. Centro Tecnológico de la energía y del Medio Ambiente, 2005:  
<http://www.esamur.com/jornadas/ponencias/ponencia44.pdf>
- CEDEX. (2008). Informe sobre “la reutilización de las aguas residuales depuradas en España. Perspectivas, oportunidades y barreras” del Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX del Ministerio de Fomento y Medio Ambiente presentado en la Jornada sobre reutilización de aguas depuradas, Pamplona:  
<http://www.crana.org/themed/crana/files/docs/154/013/enriquecedex.pdf>
- Directiva Marco Europea del Agua (DMA, 2000/60/CE):  
<http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/planificacion-hidrologica/marco-del-agua/default.aspx>



# AGRADECIMIENTOS





## AGRADECIMIENTOS

Todo empezó un 17 de septiembre del 2007, cuando empecé a formar parte de este grupo de investigación, cuando todo estaba comenzando. El estar involucrada en los comienzos de los primeros ensayos de foto-Fenton, los primeros acoplamientos de oxidación avanzada y oxidación biológica, la puesta marcha del MBR, y los primeros pasos en modelado y control ha hecho que todo lo aprendido sea un tesoro de valor incalculable. Años más tarde y con la consecución de mi beca F.P.I. en septiembre del 2011 comenzó el desarrollo de esta tesis doctoral y nuestros primeros pasos en el proceso de desinfección por foto-Fenton. El pensar en nuestros comienzos y en lo que hemos conseguido, solo puede hacerme sentirme orgullosa de haber formado parte de este equipo y la parte fundamental de los equipos son las personas.

Qué suerte he tenido de teneros como directores. Gracias por haber creído en mí, por haber sido mis guías. He dado lo mejor de mí en el trabajo y espero no defraudaros nunca. A Menta se lo agradezco todo, sus enseñanzas, su grado de implicación en todos los trabajos y sus buenas palabras. Pilar, eres un ejemplo de mujer a seguir y somos muchos los que admiramos tu excelente calidad personal y profesional, gracias por ser el sol de este trabajo. José Antonio, gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de este equipo durante tantos años y gracias especialmente por haberme apoyado cuando la salud no ha acompañado. Gracias por tu liderazgo y ambición en la investigación que ha permitido que todos crezcamos cada vez más.

La parte humana más intensa en estos años la han marcado mis compañeros del CIESOL. Gracias por haber sido una pequeña familia con la que he pasado tantas y tantas horas, comidas, llantos, risas, confidencias, decepciones, ilusiones y todos aquellos sentimientos que pueden caber en tantos años de relación. Gracias por escucharme, ayudarme, animarme y sobre todo por ser buenas personas.

Gracias a cada uno de los miembros del grupo de tratamiento de aguas de la PSA. Mil gracias por vuestra ayuda a todos los niveles. Gracias a todos los miembros del departamento de Ingeniería Química en especial a los “becarios”, os agradezco tantos buenos momentos y lo que es una pena es que últimamente casi siempre estemos celebrando despedidas en lugar de nuevos contratos... espero que todos encontréis el futuro profesional que os merecéis.

Una de las experiencias más intensas de estos años de doctorado, ha sido mi estancia en Suiza. Gracias a César Pulgarín por acogerme en su grupo durante cuatro meses. Gracias por la

oportunidad, la experiencia y las palabras. Y mil gracias más, a todo su equipo por su amabilidad, buen trato, cariño y buenos momentos.

Mil gracias a todos aquellos a los que a pesar de no haber podido dedicaros tiempo siempre he sabido que estabais ahí, especialmente mis amigos.

Casi todas las personas de mi alrededor entienden perfectamente lo que he vivido durante esta experiencia porque son parte de este mundillo, pero a aquellos que no lo entienden tan bien mil gracias. Gracias a mis padres y a mi hermana por alegraros e ilusionaros con cada logro y por sentiros orgullosos de verme crecer. Gracias por lo mismo a “mi cuñi” y mi familia política. Me encantáis.

Y gracias como no, a las dos personas más importantes de mi vida. Una de estas personas es Javi, mi marido, compañero de vida y profesión. Lo mejor que me ha pasado en la vida. Mi constante en este mundo de variables infinitas. A la otra persona aún no la conozco, solo sé que está creciendo dentro de mí y que muy pronto estará con nosotros y a partir de ese momento y hasta el fin de mis días, tendrá lugar otro de los proyectos más emocionantes de mi vida.

Gracias.





**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**  
**ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA (DPTO. INGENIERÍA)**