



Trabajo Fin de Máster

Inactivación de *Enterococcus* sp. presentes en aguas de salida de depuradora, mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación

Autor/es

Pilar Valero Lázaro

Director/es

Rosa Mosteo Abad

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2013

Me gustaría dar las gracias...

A Rosa y Peña, por su ayuda, sus consejos y disponibilidad.

A Munia, Pili, Jorge y Andrea, por ayudarme en mis comienzos en el mundo de la microbiología.

A todos mis compañeros de laboratorio por hacer más ameno el trabajo diario, en especial a Isabel y Noelia por echarme una mano siempre que lo he necesitado.

A José Luis, por estar siempre ahí y darme ánimos en todo momento.

A mi familia y mis amigos, por su paciencia y su apoyo incondicional.

Inactivación de *Enterococcus* sp. presentes en aguas de salida de depuradora, mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación

Resumen

El agua que sale de las depuradoras todavía contiene una serie de contaminantes, entre los que se encuentran los microorganismos patógenos, capaces de causar enfermedades en el hombre. El agua residual depurada puede reutilizarse con distintos fines, incluyendo usos agrícolas, urbanos, industriales, recreativos o medioambientales, siempre que cumpla con los criterios de calidad establecidos en la legislación.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la eficacia de diversos procesos de desinfección sobre un agua residual depurada con vistas a su reutilización, utilizando *Enterococcus* sp., una bacteria grampositiva patógena para el hombre, como indicador bacteriano de origen fecal. Los tratamientos de desinfección aplicados incluyen procesos comunes como la cloración, y diversos procesos de oxidación avanzada: ozonización, peroxona (O_3/H_2O_2), irradiación/ H_2O_2 , fotocatálisis (irradiación/ TiO_2) y fotocatálisis/ H_2O_2 . Se estudia el efecto del tiempo de tratamiento, dosis y tipo de agentes desinfectantes. Además, mediante estudio de las cinéticas de inactivación bacteriana se evalúa la eficiencia de los tratamientos de desinfección aplicados en este trabajo y se comparan los resultados con los obtenidos en el grupo de investigación, Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza, en procesos de potabilización de aguas naturales. Finalmente, se realiza un estudio económico de los tratamientos de desinfección aplicados en el presente trabajo.

La cloración resulta el tratamiento más efectivo y económico de los estudiados, ya que alcanza la inactivación total de la población de enterococos (7'5 unidades logarítmicas). El aumento de la dosis de cloro en el rango estudiado (3'8 - 65 mg/L Cl_2) supone un aumento de la velocidad de desinfección, como se observa en las constantes de velocidad de inactivación bacteriana de los diversos modelos matemáticos aplicados.

Los tratamientos basados en ozono, ozonización y peroxona, con dosis de 1'4 y 20 mg/L H_2O_2 , consiguen también una desinfección eficaz (6 unidades logarítmicas de inactivación) con un consumo de ozono de hasta 110 mg/L O_3 , aunque con cinéticas de inactivación más lentas y un coste más elevado, debido principalmente al asociado a la generación de ozono. La adición de H_2O_2 en las dosis aplicadas no influye sobre la eficacia del proceso.

De los tratamientos basados en irradiación UV/visible (320-800 nm) el único que supera la unidad logarítmica de inactivación es la fotocatálisis/ H_2O_2 , siendo necesario un tiempo de tratamiento prolongado (60 minutos) y una concentración de 680 mg/L H_2O_2 para alcanzar 4 unidades logarítmicas de inactivación. El coste de este tratamiento es muy elevado debido al coste del TiO_2 empleado.

Utilizando las mismas condiciones de operación (tiempo, tipo y dosis de agentes desinfectantes), las constantes de velocidad de inactivación de *Enterococcus* sp. son mayores en aguas naturales que en aguas de salida de depuradora, lo que supone una desinfección más rápida y eficaz en las primeras, o la necesidad de aumentar los tiempos de tratamiento y las dosis para las aguas de salida de depuradora.

Índice

Memoria

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
CAPÍTULO 2. CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS DE SALIDA DE DEPURADORA	3
CAPÍTULO 3. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	5
3.1. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN CONVENCIONALES: CLORACIÓN	5
3.2. PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA	6
3.2.1. <i>Tratamientos basados en ozono</i>	6
3.2.2. <i>Tratamientos basados en luz UV/visible</i>	7
CAPÍTULO 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	11
4.1. METODOLOGÍA ANALÍTICA	11
4.1.1. <i>Análisis de parámetros físico-químicos</i>	11
4.1.2. <i>Análisis de parámetros microbiológicos: Enterococcus sp.</i>	12
4.2. MUESTRAS.....	14
4.3. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN APLICADOS	15
4.3.1. <i>Cloración</i>	15
4.3.2. <i>Tratamientos basados en ozono</i>	16
4.3.3. <i>Tratamientos basados en luz UV/vis (320-800 nm)</i>	17
4.4. TRATAMIENTO DE DATOS: MODELOS CINÉTICOS DE INACTIVACIÓN MICROBIANA	19
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN.....	21
5.1. RESULTADOS DE INACTIVACIÓN DE <i>ENTEROCOCCUS SP.</i>	21
5.1.1. <i>Cloración</i>	21
5.1.2. <i>Tratamientos basados en ozono</i>	23
5.1.3. <i>Tratamientos basados en luz UV/visible</i>	24
5.2. MODELIZACIÓN CINÉTICA	26
5.2.1. <i>Cloración</i>	26
5.2.2. <i>Tratamientos basados en ozono</i>	28
5.2.3. <i>Tratamientos basados en luz UV/vis</i>	31
5.3. ESTUDIO ECONÓMICO	32
5.3.1. <i>Cloración</i>	32
5.3.2. <i>Tratamientos basados en ozono</i>	33
5.3.3. <i>Tratamientos basados en luz UV/visible</i>	34
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	37
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	39

Anexos

ANEXO I. CRITERIOS DE CALIDAD DEL AGUA REUTILIZADA SEGÚN SUS USOS.....	47
ANEXO II. TERMINOLOGÍA MICROBIOLÓGICA.....	53
ANEXO III. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA FÍSICO-QUÍMICA	55
III.I. pH.....	55
III.II. TURBIDEZ	55
III.III. CONDUCTIVIDAD.....	55
III.IV. SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN TOTALES (SST)	55
III.V. CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT)	55
III.VI. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)	57
III.VII. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2)	57
III.VIII. NITRÓGENO AMONIACAL ($N-NH_3$)	57
III.IX. CLORO LIBRE	57
III.X. DEMANDA DE CLORO.....	57
ANEXO IV. METODOLOGÍA MICROBIOLÓGICA.....	59
IV.I. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE FORTIFICACIÓN DE MUESTRAS CON <i>ENTEROCOCCUS SP.</i>	59
IV.II. TINCIÓN DE GRAM.....	60
IV.III. ANÁLISIS DE <i>ENTEROCOCCUS SP.</i>	62
IV.III.i. <i>Medios de cultivo</i>	62
IV.III.ii. <i>Diluciones decimales seriadas</i>	62
IV.III.iii. <i>Métodos de siembra</i>	63
IV.III.iv. <i>Repetibilidad del método de análisis de Enterococcus sp.</i>	64
ANEXO V. TRATAMIENTOS BASADOS EN OZONO	67
V.I. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INSTALACIÓN DE OZONIZACIÓN.....	67
V.II. CALIBRACIÓN DEL OZONIZADOR	67
V.II.i. <i>Método yodométrico</i>	67
V.II.ii. <i>Recta de calibrado</i>	68
ANEXO VI. MODELOS CINÉTICOS DE INACTIVACIÓN MICROBIANA.....	69
VI.I. DESCRIPCIÓN DE MODELOS	69
VI.I.i. <i>Modelo de Hom (1972)</i>	71
VI.I.ii. <i>Modelo de Hom modificado (1994)</i>	71
VI.I.iii. <i>Modelo bifásico de Pruitt y Kamau (1993)</i>	72
VI.I.iv. <i>Modelo de Mafart (2002)</i>	72
VI.I.v. <i>Modelo de Geeraerd (2000)</i>	73
VI.II. AJUSTE DE DATOS EXPERIMENTALES E ÍNDICES DE ERROR	73
ANEXO VII. RESULTADOS	75
VII.I. RESULTADOS DE INACTIVACIÓN	75
VII.I.i. <i>Cloración</i>	75
VII.I.ii. <i>Tratamientos basados en ozono</i>	76
VII.I.iii. <i>Tratamientos basados en luz UV/visible</i>	77
VII.II. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN.....	78
VII.II.i. <i>Cloración</i>	78
VII.II.ii. <i>Tratamientos basados en ozono</i>	82
VII.II.iii. <i>Tratamientos basados en luz UV/vis</i>	85

MEMORIA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El agua es un bien imprescindible, limitado y a menudo escaso, cuyo consumo se ha incrementado notablemente durante las últimas décadas debido al aumento de la población, del nivel de vida y a las actividades del hombre. El agua residual depurada que abandona las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) puede reutilizarse con distintos fines, especialmente como aguas de riego para la agricultura, pero también para usos urbanos, industriales, recreativos o medioambientales. La reutilización del agua supone una gran ventaja, ya que se evita el consumo de agua potable para usos en los que no se requiere un agua de una calidad tan elevada.

En España la reutilización del agua de salida de EDAR está legislada por el Real Decreto 1620/2007, que establece unos criterios de calidad para la reutilización del agua residual depurada en función de su uso. Normalmente, el agua de salida de depuradora todavía puede contener cierta concentración de materia orgánica, sustancias peligrosas y microorganismos patógenos [Mosteo et al., 2013]. Por ello, en muchas ocasiones resulta imprescindible aplicar un tratamiento adicional que, entre otras cosas, elimine los patógenos presentes hasta niveles que no supongan un riesgo para la salud de las personas ni para el medio ambiente.

La cloración, técnica convencionalmente utilizada en la desinfección de aguas, resulta eficaz y económicamente rentable, aunque en presencia de materia orgánica produce trihalometanos, compuestos cancerígenos para el hombre [Black & Veatch Corporation, 2010]. Ante la creciente necesidad de encontrar alternativas económica y medioambientalmente sostenibles, así como de evitar los inconvenientes de las técnicas convencionales, se están investigando y desarrollando nuevos métodos de tratamiento del agua, como son los procesos de oxidación avanzada (POA). Estos procesos se basan en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre los que destaca el radical hidroxilo por su elevado poder oxidante, tan solo superado por el del flúor [Parsons, 2004]. Los POAs más utilizados incluyen la ozonización, el sistema peroxona, la irradiación ultravioleta, la fotocatálisis y el proceso Fenton.

La mayoría de estudios publicados hasta la fecha sobre desinfección mediante POAs en agua se centran en la inactivación de *Escherichia coli*, una bacteria gramnegativa comúnmente utilizada como indicador de contaminación fecal [Rincón y Pulgarín, 2003; Cho et al., 2004; Diao et al., 2004; Spuhler et al., 2010;...]. En el presente trabajo de investigación se ha seleccionado *Enterococcus* sp. como bacteria de estudio, ya que también es un indicador de contaminación fecal que, al ser su pared celular grampositiva, presenta más resistencia a los tratamientos de desinfección. La bibliografía referente a *Enterococcus* sp. no es tan extensa como para *E. coli* aunque también hay artículos publicados sobre la inactivación de esta bacteria en aguas [Tyrrel et al., 1995; Lydakis-Simantiris et al., 2010; Lanao et al., 2012;...]. Además, muchos autores han aplicado POAs en agua natural prepotable, e incluso procesos como la ozonización o la irradiación con luz UV se utilizan en la potabilización de agua en algunas instalaciones a escala real. Sin embargo, se necesitan llevar a cabo más investigaciones que evalúen la aplicabilidad de los POAs en aguas de salida de depuradora, que generalmente contienen más materia orgánica y microorganismos patógenos que el agua natural.

El objetivo principal de este trabajo es analizar el poder de desinfección de varios procesos basados en la aplicación de cloro, ozono y luz solar, utilizando como indicador

bacteriano *Enterococcus* sp., aplicables en el tratamiento de regeneración de aguas de salida de depuradora que van a ser reutilizadas. En concreto, se estudiará la cloración, la ozonización, el sistema peroxona (O_3/H_2O_2), la fotólisis (irradiación/ H_2O_2), la fotocatálisis (irradiación/ TiO_2) y la fotocatálisis/ H_2O_2 .

Para llevar a cabo el objetivo principal se plantean los siguientes objetivos secundarios:

- Estudio de la influencia de las principales variables que pudieran afectar al grado de desinfección: tiempo de tratamiento, tipo y dosis de agentes empleados.
- Análisis comparativo de eficiencia de los tratamientos de desinfección aplicados mediante estudio de las cinéticas de inactivación bacteriana.
- Comparación de los resultados de este trabajo con los obtenidos por el grupo de investigación en procesos de potabilización de aguas naturales.
- Estudio económico de los tratamientos de desinfección aplicados en el presente trabajo.

El presente proyecto de investigación se ha realizado en el Grupo de Investigación consolidado de “Calidad y Tratamiento de Aguas” perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza. Este trabajo forma parte del proyecto de investigación “Evaluación de procesos en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de contaminantes con riesgo sanitario y ambiental (UZ2012-TEC-06)” financiado por el Banco Santander Central Hispano S.A., Universidad de Zaragoza. Además, cuenta con la financiación DGA-FSE.

CAPÍTULO 2. CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS DE SALIDA DE DEPURADORA

Las aguas residuales urbanas deben tratarse en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) para poder ser devueltas a los cauces naturales. Generalmente, el tratamiento de depuración consta de un proceso inicial de desbaste y desarenado-desengrasado (pre-tratamiento), seguido de una etapa de coagulación-flocculación para sedimentar los sólidos en suspensión (tratamiento primario) y de un proceso biológico (tratamiento secundario) en el que una serie de microorganismos se encargan de reducir el contenido en materia orgánica. Finalmente, algunas EDARs incluyen tratamientos terciarios para completar el proceso de depuración, especialmente importantes para eliminar los compuestos de nitrógeno y fósforo que pueden promover la eutrofización [Willey et al., 2009].

Aunque el proceso de depuración del agua residual consigue eliminar gran parte de los contaminantes, el agua que sale de una EDAR todavía puede contener gran variedad de microorganismos patógenos (virus, bacterias y protozoos), materia orgánica, sólidos en suspensión y sustancias inorgánicas [Mosteo et al., 2013]. En la Tabla 1 se recogen los valores de algunos parámetros físico-químicos y microbiológicos que presenta el agua a la salida de una EDAR.

Tabla 1. Características microbiológicas y físico-químicas del agua de salida de una EDAR [Mosteo et al., 2013; Huang et al., 2011]

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
pH	7'22 - 8'61	Carbono Orgánico Total	9'0 – 27'4 mg/L C
Conductividad	832 - 3220 µS/cm	Demanda de cloro	31 - 59 mg/L Cl ₂
Turbidez	1'7 – 34'7 UNT	<i>Escherichia coli</i>	6'0·10 ² - 7'3·10 ⁶ UFC/100mL
DQO	50 - 112 mg/L O ₂	<i>Enterococcus faecalis</i>	1'2·10 ¹ – 3'2·10 ⁵ UFC/100mL
DBO ₅	12'5 - 17'5 mg/L O ₂	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1'6·10 ⁴ – 3'9·10 ⁵ UFC/100mL
SS	4 – 56 mg/L	<i>Staphylococcus aureus</i>	2'0·10 ⁴ – 3'2·10 ⁵ UFC/100mL
NH ₄ ⁺	1'8 - 37'7 mg/L NH ₄ ⁺	<i>Clostridium perfringens</i>	<1 – 1'6·10 ³ UFC/100mL

La Directiva 91/271/CEE, legislación que regula el vertido de las aguas residuales a los cauces naturales, tan solo establece límites de vertido para la demanda biológica de oxígeno (DBO₅, 25 mg/L O₂), la demanda química de oxígeno (DQO, 125 mg/L O₂), los sólidos en suspensión (SS, 60 mg/L) y en algunos casos para nitrógeno (15 mg/L N) y fósforo (2 mg/L P) en zonas propensas a eutrofización. Sin embargo, para que el agua de salida de depuradora pueda reutilizarse ha de cumplir unos criterios de calidad en función del uso al que se destine, tal y como figura en el Real Decreto 1620/2007 (ANEXO I). En España, el RD 1620/2007 fija límites máximos de turbidez, sólidos en suspensión, nematodos intestinales y *Escherichia coli*, entre otros, e impone que en los casos que haya presentes sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las Normas de Calidad Ambiental correspondientes. Además, durante los últimos años se han publicado varias guías internacionales que proponen criterios para la reutilización del agua residual [EPA, 2012; WHO, 2006].

Cabe destacar que la presencia de microorganismos patógenos en el agua de salida de depuradora no sólo puede suponer un riesgo para la salud de las personas, puesto que son transmisores de enfermedades, sino también causar turbidez, mal olor e incrementar la demanda de oxígeno. Los patógenos presentes en el agua residual no suelen medirse de forma directa ya que sus concentraciones varían y los procedimientos analíticos son difíciles de realizar o tienen un coste elevado. En su lugar, se utilizan indicadores de contaminación fecal, como *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes, o enterococos intestinales, cuya medida representa la concentración de patógenos con propiedades similares en el agua residual. La presencia de estos grupos de bacterias no siempre supone un riesgo por sí misma, sino que indica la posible existencia de patógenos causantes de enfermedades como bacterias, virus y protozoos que también viven en el sistema digestivo de animales y humanos [WHO, 2006]. Además, estos indicadores pueden servir para cuantificar la eficacia de un tratamiento de desinfección. Sin embargo, no existe un organismo que sea el indicador perfecto, ya que cada microorganismo presenta distinta resistencia a los tratamientos de desinfección, normalmente siguiendo este orden: bacterias no formadoras de esporas < virus < bacterias formadoras de esporas < helmintos < protozoos [Malato et al., 2009].

Aunque el RD 1620/2007 solo establece límites máximos para *Escherichia coli*, una bacteria gramnegativa, se considera necesario el estudio de los tratamientos de desinfección sobre otro tipo de bacterias más resistentes, como son los enterococos, bacterias grampositivas, que poseen una pared celular mucho más gruesa y por tanto resultan más difíciles de inactivar. Por eso, el microorganismo objeto de estudio del presente trabajo de investigación es *Enterococcus* sp., una bacteria que debido a su origen fecal se encuentra comúnmente en el agua de salida de depuradora. Los enterococos resultan un indicador útil tanto en aguas superficiales como en aguas marinas ya que su comportamiento se asimila más al de muchos patógenos que otros indicadores [water.epa.gov]. El género *Enterococcus* sp. presenta células esféricas u ovoides (cocos) en parejas o cadenas cortas, no esporuladas, a veces inmóviles, con un tamaño de 0'6 a 2'5 µm. Son bacterias anaerobias facultativas, grampositivas, quimioheterótrofas, y mesófilas, que fermentan los hidratos de carbono a lactato sin producción de gas. Algunas especies representativas del género *Enterococcus* sp. son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans* y *E. gallinarum*. Los enterococos como *E. faecalis*, un patógeno oportunista que puede producir infecciones urinarias y endocarditis, son habitantes normales del tracto intestinal de los seres humanos y de la mayoría de los animales [Willey et al., 2009]. En el ANEXO II se describen con más detalle algunos de los términos microbiológicos utilizados.

Teniendo en cuenta los criterios de calidad que ha de cumplir el agua para poder reutilizarse y las concentraciones de microorganismos presentes en el agua de salida de depuradora, en la mayoría de los casos va a ser necesario someter dicha agua a un tratamiento adicional de desinfección. En el Capítulo 3 se describen algunos de estos tratamientos enfocados a la eliminación de los microorganismos patógenos presentes en el agua.

CAPÍTULO 3. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

La desinfección se define como la destrucción parcial de los microorganismos patógenos mediante tratamientos físicos o químicos. Además de prevenir la propagación de enfermedades, en el caso de aplicar la desinfección en aguas residuales depuradas, se protegen los abastecimientos de agua potable, las aguas de baño y las zonas de vida piscícola. En este capítulo se describen algunos tratamientos de desinfección tanto convencionales como de oxidación avanzada habitualmente utilizados.

3.1. Tratamientos de desinfección convencionales: Cloración

La cloración es el tratamiento de desinfección más antiguo y continúa siendo un importante método para desinfectar el agua residual municipal. El cloro está disponible en diversas formas, cuyas características influyen en gran medida sobre el sistema de desinfección. Se puede utilizar cloro líquido o gaseoso, o bien en forma de hipoclorito de sodio (NaClO) o de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). El hipoclorito de sodio, comúnmente conocido como lejía, es la forma más utilizada. Se trata de un líquido transparente que suele comercializarse en concentraciones de 5%, 10% y 15% en peso de cloro disponible. En algunas EDARs de gran tamaño se prefiere el uso de NaClO como medida para evitar el peligro que supone el almacenamiento de cloro líquido o gaseoso en contenedores a elevadas presiones de vapor.

El cloro que se añade al agua residual depurada reacciona en cuestión de segundos con el nitrógeno amoniacal presente, dando lugar a la formación de cloraminas (NH_2Cl , N_2HCl , N_3Cl). Simultáneamente, se producen otras reacciones con otros iones inorgánicos como S^{2-} , HS^- , SO_3^{2-} , NO_2^- , Fe^{2+} y Mn^{2+} . Estas sustancias reaccionan tanto con el cloro libre como con las cloraminas, reduciendo ambos compuestos al ion cloruro, que es estable y no bactericida. El consumo de cloro durante el primer minuto de tratamiento se debe principalmente a su reacción con sustancias inorgánicas, mientras que durante los siguientes minutos el cloro reacciona con los compuestos orgánicos de forma mucho más lenta [Black & Veatch Corporation, 2010].

La eliminación de microorganismos durante la cloración se produce por difusión del cloro a través de la pared celular, produciendo una disfunción de los grupos enzimáticos internos y por tanto, inactivando las células. Además, el cloro puede reaccionar con los materiales de la pared celular, por ejemplo, oxidando los grupos amino de proteínas, lo que disminuye la fortaleza de la pared y acaba matando la célula. Sin embargo, la cloración no afecta a la integridad de la célula por lo que no se observan daños severos en la superficie de la célula ni lisis celular [Diao et al., 2004].

Los principales parámetros a tener en cuenta para llevar a cabo la cloración son el tiempo de contacto (T), la dosis o concentración de cloro (C) y la agitación, ya que la desinfección del agua mediante cloración es más eficaz si hay buena mezcla en el punto de aplicación. A menudo, en la práctica suele utilizarse el parámetro CT, combinación de la concentración de cloro (C) y el tiempo de contacto (T).

Uno de los problemas más importantes que plantea la cloración es la formación de subproductos de desinfección, como los trihalometanos (THMs), compuestos formados por reacción del cloro con las sustancias orgánicas presentes en el agua. Los THMs son

cancerígenos, por lo que resulta imprescindible minimizar su generación. Para ello hay que considerar diversas variables como la concentración de precursores de THMs, la concentración de cloro libre, el tiempo de contacto, la temperatura, el pH, la concentración de iones bromuro y yoduro, etc. Los THMs más importantes en el agua son el cloroformo, el bromodichlorometano, el dibromoclorometano y el bromoformo [Black & Veatch Corporation, 2010].

3.2. Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (POAs) se basan en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre las que destaca el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) por su elevado poder oxidante, tan solo superado por el del flúor. El radical hidroxilo es capaz de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos y de inactivar microorganismos patógenos. La formación de ROS puede iniciarse mediante fotólisis, ozono, peróxido de hidrógeno, calor, etc. Durante los POAs tienen lugar un gran número de reacciones, por lo que resulta difícil predecir todos los productos de oxidación. Además, el grado de oxidación de compuestos orgánicos y la desinfección alcanzadas dependen de multitud de factores, como la concentración de contaminantes, la concentración de oxígeno, el pH, la temperatura, la presencia de "scavengers" o atrapadores de radicales (ej. ión bicarbonato)... [Parsons, 2004]. A continuación se describe el fundamento teórico de los POAs aplicados en el presente trabajo de investigación.

3.2.1. Tratamientos basados en ozono

Ozonización

El ozono (O_3) se lleva utilizando desde hace mucho tiempo en las estaciones de tratamiento de aguas potables para desinfectar, controlar los compuestos que generan malos olores y sabores, y eliminar el color del agua. El ozono puede reaccionar mediante dos mecanismos: de forma directa o indirecta. Cuando el pH del agua a tratar es ácido, prevalece la reacción directa del ozono, que es muy selectiva. Por ejemplo, el ozono reacciona con la materia orgánica por adición electrofílica a los dobles enlaces. Por otra parte, el ozono se descompone en el agua generando radicales hidroxilo que reaccionan de manera no selectiva con los contaminantes presentes. El poder oxidante del ozono (2'07 eV) es inferior al del radical hidroxilo (2'80 eV), por lo que interesa favorecer la formación de $\cdot\text{OH}$. Esto puede conseguirse aumentando el pH del medio, adicionando H_2O_2 , combinando el O_3 con luz ultravioleta... En general, a pH neutro el ozono reacciona mediante los dos mecanismos citados [Matilainen y Sillanpää, 2010].

Los elevados potenciales de oxidación del ozono y del radical hidroxilo hacen de la ozonización un potente tratamiento de desinfección. Durante la ozonización, la inactivación de las células tiene lugar debido a la desintegración de la pared de la célula y la consiguiente lisis celular [Diao et al., 2004].

Sistema peroxona ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$)

La combinación del ozono con el peróxido de hidrógeno recibe el nombre de sistema peroxona. El H_2O_2 es un iniciador del mecanismo radicalario del ozono, favoreciendo la formación de radicales hidroxilo.

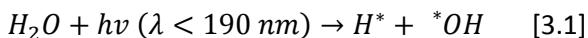
Uno de los parámetros a optimizar en el sistema peroxona es el ratio O₃/H₂O₂, ya que el peróxido de hidrógeno no solo actúa como generador de *OH, sino como “atrapador” de estos radicales. El rango óptimo de concentración de H₂O₂ depende del tipo de contaminantes presentes y su concentración en el agua a tratar [Kosaka et al., 2001].

3.2.2. Tratamientos basados en luz UV/visible

Radiación solar

La radiación solar que llega a la superficie terrestre comprende un rango que va desde el infrarrojo hasta el ultravioleta (UV) del espectro electromagnético. Dentro de este intervalo, la luz ultravioleta, que supone tan solo un 7% de la radiación, presenta las mejores propiedades de desinfección. Los rangos de las longitudes de onda del UV son: 400-315 nm para UVA, 315-280 nm para UVB y 280–100 nm para UVC. La irradiación solar que incide en un día despejado de verano sobre el ecuador es de unos 1120 W/m². Esto supone una energía óptica de 1'12 kJ/m² disponibles cada segundo para inactivar cualquier microbio patógeno presente en el agua expuesta a la radiación solar. Este valor se reduce conforme la latitud aumenta alejándose del ecuador [McGuigan et al., 2012].

Algunos contaminantes son capaces de absorber la radiación UV, pasando a un estado excitado a partir del cual tiene lugar su degradación. Además, el agua puede absorber la radiación UVC por debajo de 190 nm, produciéndose así la fotólisis del agua y la formación de ROS [Parsons, 2004], tal y como se muestra en la ecuación 3.1:

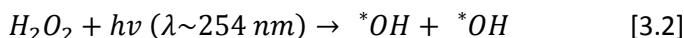


La inactivación bacteriana en el agua irradiada con luz solar se debe a que parte de la luz UV que incide sobre las células, principalmente en el rango UVB y UVC, puede absorberse por el ADN celular, modificándolo y dificultando a las enzimas polimerasa la réplica del ADN. Sin embargo, las células poseen varios mecanismos capaces de reparar su ADN, eliminando la parte afectada y sustituyéndola por ADN polimerasa. Además, aunque las longitudes de onda del UVA no son suficientemente energéticas como para modificar directamente las bases del ADN, juegan un papel importante en la formación de ROS tanto en el agua como en el interior de la célula. Una vez formadas, estas especies reactivas del oxígeno pueden causar daños en el ADN, oxidar los grupos amino de las proteínas u oxidar los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos. Cuando el agua alcanza temperaturas superiores a 45°C se observa un fuerte efecto sinergístico entre la inactivación óptica y termal, ya que, además de un efecto de pasteurización, el aumento de la temperatura del agua inhibe los mecanismos de reparación del ADN celular [McGuigan et al., 2012]. Las investigaciones realizadas hasta el momento indican que la radiación solar es capaz de inactivar con éxito una amplia variedad de bacterias, virus y protozoos parásitos presentes en el agua [Heaselgrave y Kilvington, 2011].

Los tratamientos basados en irradiación con luz solar suponen un método barato y sencillo para inactivar patógenos presentes en el agua, por lo que su uso está extendiéndose en muchos países en desarrollo con escasez de agua potable. La técnica utilizada recibe el nombre de SODIS (Solar Disinfection) y consiste en introducir el agua en recipientes de plástico o cristal y exponerlos a radiación solar entre 6 y 48 horas, dependiendo de la intensidad de la luz solar y de la sensibilidad de los patógenos.

Radiación solar con H₂O₂

La combinación de radiación solar con ciertas sustancias, como el H₂O₂, en el tratamiento de aguas puede incrementar la formación de ROS, y por tanto, favorecer la inactivación de microorganismos patógenos. La fotólisis del peróxido de hidrógeno tiene lugar a longitudes de onda de 254 nm, dando lugar a la formación de ROS (Ecuación 3.2).



Normalmente para generar una cantidad de ROS suficiente para degradar compuestos orgánicos o desinfectar el agua se necesitan concentraciones de H₂O₂ elevadas. Sin embargo, el H₂O₂ en exceso actúa como atrapador de radicales, haciendo el proceso menos efectivo, por lo que es necesario alcanzar un compromiso [Parsons, 2004].

En general, la adición de H₂O₂ acelera la descomposición de la materia orgánica y aumenta la velocidad de inactivación de las células. Además de los mecanismos descritos anteriormente en este apartado, la inactivación de bacterias en presencia de H₂O₂ y luz solar tiene lugar principalmente por tres métodos. En primer lugar la fotolisis del H₂O₂ genera [•]OH, aunque este hecho solo es significativo a longitudes de onda menores de 254 nm, y los radicales generados tienen un periodo de vida extremadamente corto. En segundo lugar, el H₂O₂ puede atacar directamente la membrana celular, incrementando su permeabilidad y afectando a la viabilidad de las células. Por último, el H₂O₂ es relativamente estable y no tiene carga, por lo que es capaz de penetrar la membrana bacteriana y difundir en las células. El H₂O₂ intracelular puede reaccionar con los iones metálicos presentes en el interior de la célula dando lugar a la formación de [•]OH altamente reactivos y otras ROS tóxicas para la célula [Spuhler et al., 2010].

Fotocatálisis

La generación de ROS en los procesos de fotocatálisis tiene lugar por combinación de un catalizador y luz. El dióxido de titanio (TiO₂) es uno de los fotocatalizadores más utilizados en el tratamiento de agua, debido a su elevada actividad fotocatalítica, a su estabilidad y a sus propiedades benignas desde el punto de vista medioambiental. La irradiación del TiO₂ con luz ultravioleta a longitudes de onda entre 300 y 390 nm, induce la excitación de los electrones desde la banda de valencia hasta la banda de conducción, dando lugar a la creación de huecos altamente oxidantes en la banda de valencia, y a la formación de ROS, como el radical hidroxilo [•]OH. La Figura 1 muestra el mecanismo de formación foto-inducido de un par hueco-electrón en una partícula semiconductora de TiO₂ en presencia de un contaminante del agua (P).

Los compuestos orgánicos se degradan en los huecos de la superficie del TiO₂ y mediante los radicales formados presentes en el agua [Matilainen y Sillanpää, 2010], dando lugar a la aparición de compuestos intermedios, y su posterior mineralización en CO₂ y agua.

La inactivación bacteriana durante la fotocatálisis con TiO₂ tiene lugar mediante varios mecanismos. Inicialmente los radicales atacan la superficie de la membrana externa de la pared celular, causando daños en la capa de peptidoglicano y en la capa de lipopolisacáridos. A continuación, tiene lugar la peroxidación de la membrana lípida y la oxidación de las proteínas y de los polisacáridos de la membrana. Esto produce la pérdida de funciones esenciales de la célula, como la actividad respiratoria, causando finalmente la muerte bacteriana.

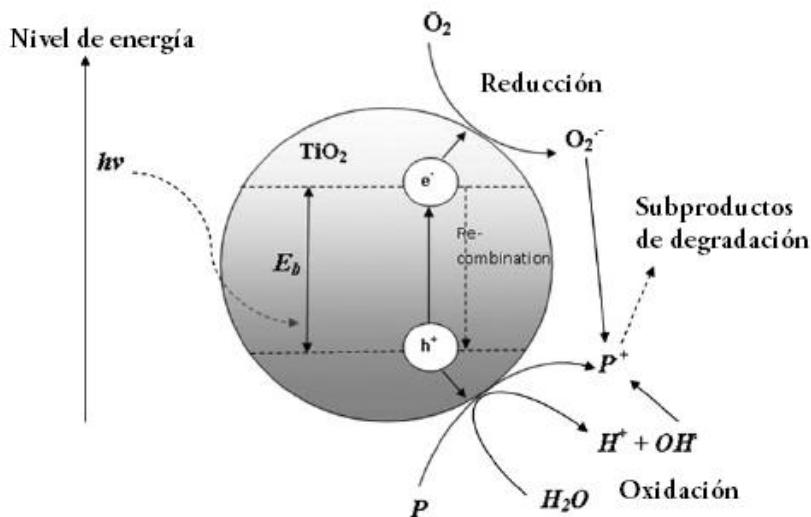


Figura 1. Formación del par hueco-electrón en una partícula de TiO_2 [Chong et al., 2010].

El dióxido de titanio ha sido utilizado con éxito como fotocatalizador en múltiples estudios, para la eliminación de distintas bacterias como *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, o *Streptococcus aureus*. Sin embargo, otros autores han encontrado muy poca diferencia en la inactivación de bacterias en agua real con luz solar en presencia o ausencia de TiO_2 [Malato et al., 2009].

Fotocatálisis con H_2O_2

Uno de los problemas que plantea el uso de TiO_2 es la recombinación del par hueco-electrón, que, en ausencia de un aceptor de electrones adecuado, limita la efectividad del proceso. Una estrategia de inhibir este efecto de recombinación es añadir otros aceptores de electrones a la reacción que, además, contribuyan a aumentar la producción de ROS. El peróxido de hidrógeno es un oxidante utilizado con este fin. En general, la adición de H_2O_2 es beneficiosa y aumenta la efectividad del proceso. Sin embargo, el efecto depende de la dosis de H_2O_2 , existiendo un rango óptimo de concentración. Si se sobrepasa cierta concentración, el H_2O_2 puede adsorberse sobre la superficie del TiO_2 , ocupando los huecos formados y reaccionando con los radicales hidroxilo producidos. La adición de H_2O_2 en dosis adecuadas consigue aumentar la velocidad de reacción, lo que se traduce en la disminución de las dimensiones del foto-reactor, que es el componente más caro y una barrera para su comercialización, reduciendo así el coste del proceso.

Los mecanismos de desinfección en la fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno incluyen los descritos para la radiación solar, el peróxido de hidrógeno y la fotocatálisis.

CAPÍTULO 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE DATOS

4.1. Metodología analítica

4.1.1. Análisis de parámetros físico-químicos

La Tabla 2 muestra los parámetros físico-químicos analizados, los métodos analíticos y la instrumentación utilizada durante el desarrollo de este proyecto.

Tabla 2. Métodos analíticos e instrumentación

Parámetro	Método	Equipo	Marca y modelo	Rango	Error
pH	4500-HB <i>Standard Methods</i>	pH-metro	<i>CRISON GLP 21</i>	1-14	± 0'02
Turbidez	ISO 7027	Turbidímetro	<i>HANNA Instruments LP 2000</i>	0 - 1000 UNT	± 0'5UNT
Conductividad	UNE-EN ISO 27888	Conductímetro	<i>CRISON Basic 30</i>	0,01 – 19999 µS/cm	± 0'02 µS/cm
Sólidos en suspensión totales (SST)	2540D <i>Standard Methods</i>	Espectrofotómetro	<i>Hach LANGE DR 2800</i>	5 – 750 mg/l	± 0'1 mg/l
Carbono Orgánico Total (COT)	5310 B <i>Standard Methods</i>	Analizador de COT	<i>SHIMADZU TOC-VCSH</i>	CT: 0-25000mg/l CI: 0-30000mg/l	5-10%
DQO	410.4 EPA (adaptado)	Fotómetro multiparámetro de sobremesa Reactor de DQO	<i>HANNA Instruments HI 83099</i> <i>HANNA Instruments HI 839800</i>	0 - 150mg/l	± 1mg/l
H ₂ O ₂	-	Test indicador de peróxidos	<i>Merckoquant®</i>	0-100mg/l 100-1000mg/l	-
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	D1426-92 Manual ASTM (adaptado)	Fotómetro multiparámetro de sobremesa	<i>HANNA Instruments HI 83099</i>	0-10 mg/L	± 0'05 mg/l
Cloro libre residual (Cl ₂)	DPD 330.5 EPA (adaptado)	Fotómetro multiparámetro de sobremesa	<i>HANNA Instruments HI 83099</i>	0-2'5 mg/L	± 0'03 mg/l
Demanda de cloro (CD)	5710 B <i>Standard Methods</i>	Valoración volumétrica	-	-	-

En el ANEXO III se presenta, de forma desarrollada, la metodología analítica y la instrumentación utilizada en este trabajo.

4.1.2. Análisis de parámetros microbiológicos: *Enterococcus* sp.

El indicador bacteriano de contaminación fecal objeto de estudio del presente trabajo de investigación es *Enterococcus* sp. El cultivo y recuento de estas bacterias se realiza siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Española UNE-EN ISO 7899-2:2001: “*Detección y recuento de enterococos intestinales*” y el método normalizado 9215.C [Clesceri et al., 2005].

Equipos

Los equipos utilizados en el análisis microbiológico de *Enterococcus* sp. se muestran en la Tabla 3. Todo el material de vidrio utilizado se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos.

Tabla 3. Equipos utilizados en los análisis microbiológicos

Instrumento	Marca	Modelo	Función
Estufas de cultivo	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Cultivo bacteriológico
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Mantenimiento de medio de cultivo en estado líquido
Autoclave	J.P. Selecta	437-P	Esterilización del material
Microscopio óptico	Zeiss	Axiostar Plus	Pruebas de confirmación bacteriológicas
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Análisis microbiológico
Agitador Vortex	Velp Scientifica	ZX3	Mezcla de soluciones en tubos
Mechero bunsen			Crear condiciones de esterilidad

Medios de cultivo

El medio utilizado para el cultivo de *Enterococcus* sp. es el agar selectivo Slanetz & Bartley (Scharlau). Las colonias de enterococos adquieren un color granate característico en este agar (Figura 2). La composición y preparación del medio de cultivo se detalla en el ANEXO IV.

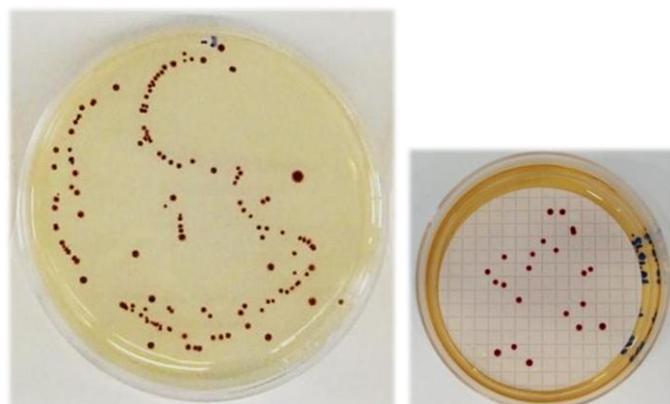


Figura 2. Aspecto de las colonias de *Enterococcus* sp. en el agar S&B. Método de siembra en superficie (izquierda) y método de filtración de membrana (derecha).

Métodos de siembra

En el presente trabajo de investigación se utilizan el método de filtración por membrana (UNE-EN ISO 7899-2:2001) y el método de siembra en superficie (Standard Methods 9215.C [Clesceri et al., 2005]) para el cultivo de *Enterococcus* sp. Cuando la población bacteriana no es muy elevada se utiliza el método de filtración, mientras que el método de siembra en superficie se utiliza cuando la población es mayor. Además, para analizar un volumen de muestra que permita un recuento adecuado de colonias de *Enterococcus* sp. en el método de siembra en superficie, se realizan diluciones decimales seriadas. En el ANEXO IV se describen los métodos de siembra y el método de diluciones decimales seriadas en mayor profundidad.

Incubación

Las placas sembradas se invierten e introducen en la estufa incubadora a 37 °C durante 48 horas. Tras finalizar el periodo de incubación, se cuentan todas las colonias que presentan una coloración roja, marrón o rosa, bien en su centro o en su periferia (Figura 2).

Recuento

Teóricamente, cada colonia procede de la multiplicación de una sola célula; sin embargo, una colonia también puede ser el resultado de la multiplicación de un agregado de células. Por otra parte, no todas las células bacterianas son capaces de formar colonias, ya que no crecen en los medios de cultivo. Por ello, en el recuento en placa lo más correcto es hablar de unidades formadoras de colonias (UFC) [Gamazo et al., 2005]. Los datos de cada experimento realizado se expresan en UFC/100 mL.

El número de colonias que aparecen en las placas no ha de ser demasiado grande, pues algunas colonias se pueden fusionar dando estimaciones erróneas, ni demasiado pequeño, para que el cálculo sea estadísticamente significativo. En el método de filtración de membrana se cuentan las placas cuyo número de colonias se encuentra entre 20 y 200. En el método de siembra en superficie se cuentan las placas con un número de colonias entre 30 y 300 [Clesceri et al., 2005]. Cuando no se detecta ningún microorganismo en la placa sembrada, el valor que se toma es 1 UFC/100 mL para permitir el cálculo posterior con logaritmos. Para obtener el número apropiado de colonias se diluye la muestra por el método de diluciones decimales seriadas, tal y como se explica en el ANEXO IV.

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la ecuación 4.1, donde F_d es el factor de dilución, es decir, la inversa de la dilución seleccionada.

$$UFC/100 \text{ mL} = UFC/mL \text{ muestra analizados} \cdot F_d \cdot 100 \text{ mL} \quad [4.1]$$

Repetibilidad del método de análisis de *Enterococcus* sp.

Ibarz (2008) calculó el coeficiente de variación del método de filtración de membrana sobre *Enterococcus* sp., estableciendo un CV entre el 3-10 %. En este trabajo se ha determinado el coeficiente de variación del método de siembra en superficie, siendo del 2%, tal y como se describe en el ANEXO IV.

4.2. Muestras

Las muestras utilizadas para la experimentación del presente trabajo de investigación consisten en agua residual depurada sintética cuyas características simulan las condiciones del agua residual a la salida de una depuradora. Para la obtención de dichas muestras se puso en marcha una planta piloto de lodos activos a escala de laboratorio (Figura 3), situada en el laboratorio del grupo de investigación de “Calidad y Tratamiento de Aguas”, perteneciente al departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

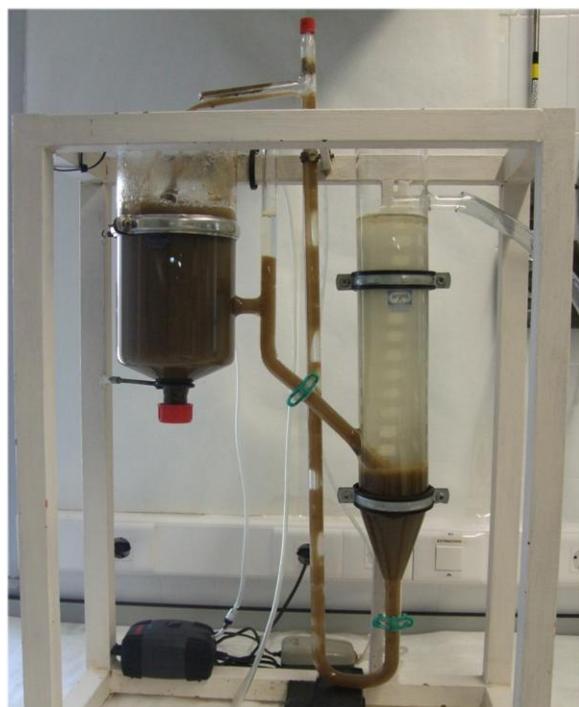


Figura 3. Planta piloto de lodos activos

La planta consta de un reactor biológico y un decantador, con un volumen de 3L y 2L respectivamente. Se alimenta agua residual sintética al reactor, con la composición mostrada en la Tabla 4, a un caudal aproximado de 1 L/h. El reactor cuenta con un sistema de aireación, que proporciona el oxígeno necesario a las bacterias encargadas de la depuración y homogeneiza los fangos. La reacción genérica que tiene lugar en el reactor se describe en la ecuación 4.2:

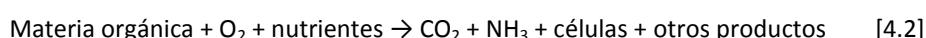


Tabla 4. Composición del agua de alimentación de la planta piloto de lodos activos [Directiva 82/243/CEE, 1982]

Compuesto	Glucosa	Peptona de carne	Extracto de carne	Urea CO(NH ₂) ₂	NaCl	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	K ₂ HPO ₄
Concentración (mg/L)	200	160	110	30	7	4	2	28

Tras abandonar el reactor, el agua pasa a un decantador donde sedimentan los fangos. Parte de ellos se recircula al reactor para mantener en éste una concentración de microorganismos adecuada, de aproximadamente 3000-3500 mg/L. El agua clarificada rebosa por la parte superior del decantador y se recoge en una garrafa.

Previamente a la realización de cada uno de los tratamientos, la muestra de agua que se va a utilizar se esteriliza en autoclave en una botella de vidrio de 1 L para eliminar los microorganismos presentes y así evitar cualquier interacción de la bacteria objeto de estudio con otros microorganismos [Medema et al., 1997]. Una vez que la muestra está esterilizada, se procede a aumentar de manera artificial la población de enterococos, bacteria objeto de estudio del presente trabajo de investigación. Este proceso recibe el nombre de “fortificación”. Para ello, se preparan suspensiones bacterianas concentradas a partir de cultivos puros de *Enterococcus* sp., que posteriormente se añaden a las muestras de agua de salida de depuradora. De esta forma se obtiene una “muestra fortificada”, que permite determinar la influencia de los tratamientos de desinfección estudiados. En el ANEXO IV se explica detalladamente el procedimiento de fortificación de las muestras.

En la Tabla 5 se muestran las características de la muestra de agua de salida de depuradora autoclavada y fortificada.

Tabla 5. Características de la muestra fortificada.

Parámetro	Valor
pH	6'5 - 8'5
Turbidez	22 - 116 UNT
Conductividad	728 - 1660 µS/cm
Sólidos en suspensión totales (SST)	61 - 117 mg/L
Carbono Orgánico Total (COT)	11'5 - 13'4 mg/L C
DQO	66 - 111 mg/L O ₂
Nitrógeno amoniacal	0'9 - 3'2 mg/L N-NH ₃
Demanda de cloro	60 - 65 mg/L Cl ₂
<i>Enterococcus</i> sp.	3'2·10 ⁷ - 1'3·10 ⁸ UFC/100 mL

Estos valores son similares a los observados en el agua de salida de EDARs a escala real (Tabla 1).

4.3. Tratamientos de desinfección aplicados

Para calcular la inactivación bacteriana y por tanto, evaluar la eficacia de cada tratamiento en la desinfección de una muestra, se utilizan unidades logarítmicas. Para ello se utiliza la expresión 4.3, donde N_0 es la población inicial bacteriana y N_t la población que sobrevive en un determinado tiempo t , ambos parámetros medidos en UFC/100 mL.

$$\text{Inactivación bacteriana} = \log_{10}(N_t/N_0) \quad [4.3]$$

4.3.1. Cloración

Los ensayos de cloración se realizan sobre 300 mL de muestra contenida en reactores de vidrio de 600 mL. Se utiliza hipoclorito sódico (NaClO, 5%, Panreac) como desinfectante, adicionando a la muestra distintas dosis de cloro (3'8 - 65 mg/L Cl₂). Tras la adición del oxidante, la muestra clorada se mantiene en agitación a 100 r.p.m. para favorecer la mezcla. A partir del instante en que se adiciona el reactivo a la muestra, se toman alícuotas a distintos

intervalos para valorar el efecto del cloro sobre la población de estudio en el tiempo. La duración máxima del tratamiento son 30 minutos.

Las dosis de cloro aplicadas, varían desde 3'8 mg/L Cl₂, dosis correspondiente a la demanda de cloro de un agua natural [Lanao, 2012], hasta la demanda de cloro de la muestra objeto de este estudio (65 mg/L Cl₂), que es agua residual depurada que contiene materia oxidable. Se aplican también concentraciones intermedias de 15 y 30 mg/L Cl₂ para estudiar la influencia de la dosis de cloro en el tratamiento.

El cloro residual de las muestras extraídas se neutraliza con tiosulfato sódico (Na₂S₂O₃·5H₂O, 99'5%, Panreac) para evitar que siga ejerciendo su efecto bactericida. Las muestras se procesan de inmediato tras la finalización del experimento.

4.3.2. Tratamientos basados en ozono

En el presente trabajo de investigación se aplican tratamientos de desinfección basados solo en el ozono (ozonización) y combinando ozono con peróxido de hidrógeno (sistema peroxona).

El ozono se genera "in situ" en el laboratorio mediante un ozonizador Fischer modelo 500. El equipo consta de dos electrodos entre los que se establece un alto voltaje y por los que fluye una corriente de oxígeno puro. En la descarga eléctrica que se produce, se genera oxígeno atómico que al combinarse con el molecular da lugar a las moléculas de ozono. En la Figura 4 se muestra un esquema de la instalación de ozonización. La descripción completa de la instalación de ozonización se detalla en el ANEXO V.

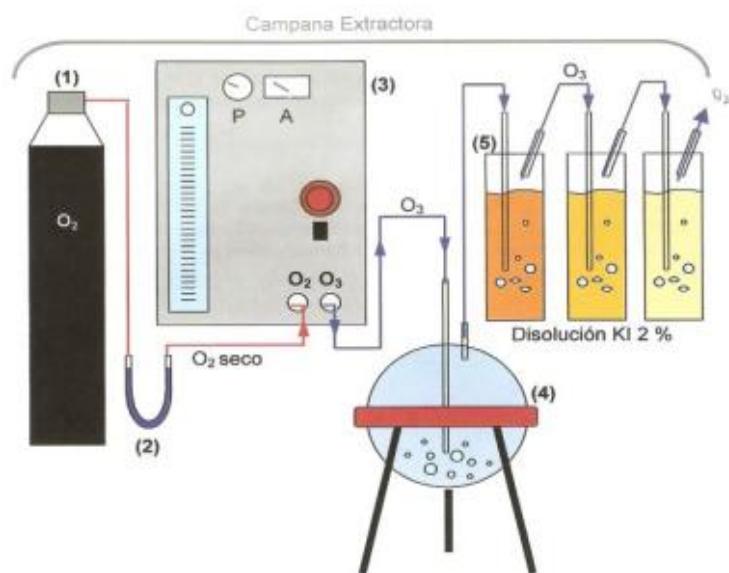
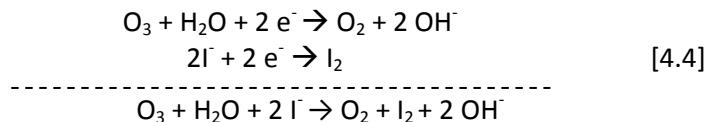


Figura 4. Esquema de la instalación de ozonización

El flujo de ozono introducido se mantiene constante a lo largo de cada experimento (O_3 introducido) y se calcula mediante calibración del equipo, tal y como se describe en el ANEXO V. Todo el ozono producido no llega a consumirse en la reacción, por lo que el exceso debe destruirse (O_3 no consumido). Para ello se conectan en serie al reactor dos o tres borboteadones que contienen una disolución de yoduro potásico al 2%. El ozono reacciona con el yoduro reduciéndose a oxígeno y el yoduro se oxida a yodo (I₂) (ecuación 4.4). El ozono no consumido

se calcula por valoración con tiosulfato de sodio (método yodimétrico), descrito en detalle en el ANEXO V. El experimento debe llevarse a cabo en una campana de extracción ya que el ozono es un elemento tóxico.



El O_3 consumido por la muestra se define por la ecuación 4.5. La cantidad de ozono residual disuelta en el agua resulta despreciable en comparación con el ozono no consumido, por lo que se desestima.

$$\text{O}_3 \text{ consumido} = \text{O}_3 \text{ introducido} - (\text{O}_3 \text{ no consumido} + \text{O}_3 \text{ residual disuelto}) \quad [4.5]$$

El caudal de ozono introducido durante los experimentos basados en ozono es de 888 mg/h O_3 , y los tiempos de tratamiento son: 0'5, 1, 3, 6, 9 y 15 minutos. De esta forma se aplican distintas dosis de ozono a la muestra según el tiempo seleccionado, pudiéndose relacionar la inactivación de enterococos con la cantidad de ozono consumido por la muestra. Las dosis de ozono aplicadas, de hasta 110 mg/L O_3 consumido, son similares a las utilizadas por otros autores en la desinfección de aguas [Gehr et al., 2003; Lanao, 2012].

En los tratamientos peroxona, se añade peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30% p/v, Panreac) en distintas dosis, 1'4 mg/L (0'04 mM) y 20 mg/L H_2O_2 (0'6 mM), e inmediatamente después se procede a la aplicación de ozono. Algunos autores han trabajado con dosis bajas de H_2O_2 (0'7 - 1'4 mg/L H_2O_2) con buenos resultados en la desinfección [Sommer et al., 2004; Lanao, 2012], mientras que otros recomiendan establecer una relación molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ de 0'5 para mejorar la eliminación de compuestos presentes en el agua [Bellamy et al., 1991; Ormad et al., 1997; Miguel, 2010]. La dosis de 20 mg/L H_2O_2 (0'6 mM H_2O_2) satisface la relación molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ de 0'5, considerando una cantidad de ozono consumido de 60 mg/L O_3 (1'2 mM O_3) que es el valor a partir del cual se observa mayor inactivación bacteriana en el presente trabajo de investigación.

El volumen de muestra a tratar es 1 L y los ensayos se realizan en reactores de vidrio de 2 L de capacidad a temperatura ambiente (23°C). Durante la realización de los experimentos, se toman muestras a diferentes intervalos de tiempo con el fin de evaluar la efectividad de los tratamientos sobre las bacterias estudiadas, hasta un máximo de 15 minutos, final del tratamiento. Tanto el ozono como el peróxido de hidrógeno residual en las muestras tomadas se neutralizan con tiosulfato sódico (99'5%, Panreac) para evitar que sigan ejerciendo su efecto bactericida sobre las poblaciones supervivientes.

4.3.3. Tratamientos basados en luz UV/vis (320-800 nm)

Los tratamientos basados en radiación aplicados en el presente trabajo, consisten en radiación, radiación combinada con H_2O_2 , radiación catalizada con dióxido de titanio (fotocatálisis) y fotocatálisis combinada con H_2O_2 .

En la realización de los experimentos basados en luz UV/vis se emplea una cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+ como fuente de radiación (Figura 5).



Figura 5. Cámara solar

Esta cámara está equipada con una lámpara de xenón que emite luz a una longitud de onda entre 290 y 800 nm, simulando la luz solar natural. Mediante dos filtros que cubren la lámpara de xenón, un filtro de cuarzo y un filtro adicional de ventana (Xenochrome 320), se consigue la emisión del rango de radiación utilizado en los tratamientos de desinfección. Este rango se sitúa entre 320 y 800 nm, y comprende las radiaciones UVA y visible, ya que el filtro de ventana intercepta las longitudes de onda por debajo de los 320 nm, eliminando el rango UVB, tal y como se muestra en la Figura 6. De esta forma, la presencia del filtro de ventana evita que las radiaciones UVB y UVC causen la inactivación directa de las bacterias, mediante lesiones en el ADN celular que impidan su replicación, y permite el estudio de la influencia de la generación de ROS sobre la inactivación de *Enterococcus* sp., mecanismo de destrucción bacteriana que tiene lugar en el rango del UVA (315-400 nm) [Robertson, 2005; Lanao, 2012].

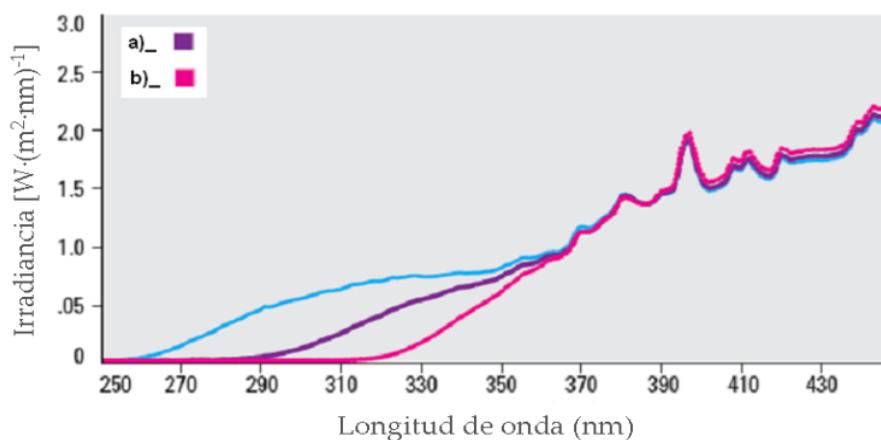


Figura 6. Espectro solar natural y simulado, a) sin filtro de ventana, b) con filtro de “vidrio de ventana” [Miguel, 2010].

Se colocan 100 mL de muestra en reactores de vidrio de 250 mL en el interior de la cámara solar con un agitador magnético, que proporciona un medio aireado y una mezcla perfecta durante los experimentos. La cámara también está equipada con un regulador de intensidad y de tiempo de exposición, además de un control de temperatura. La intensidad de la irradiación seleccionada para todos los experimentos es de 500 W/m², que corresponde al 50% de la intensidad de la radiación solar natural ecuatorial al medio día y es utilizada por diversos autores en sus estudios [Yuranova et al., 2004; Miguel, 2010]. La temperatura máxima que se puede alcanzar en la cámara solar es de 35°C, establecida mediante el controlador de temperatura.

El peróxido de hidrógeno utilizado en los experimentos es de la marca Panreac y tiene una concentración del 30% p/v. El H_2O_2 se añade a la muestra en distintas dosis (1'4 mg/L, 20mg/L, 200 mg/L y 680 mg/L H_2O_2) e inmediatamente después se procede a encender la cámara solar. Las dosis de 1'4 mg/L y 20 mg/L H_2O_2 coinciden con las utilizadas en los tratamientos peroxyona. Durante la realización de los experimentos se considera necesario aumentar la concentración de H_2O_2 , por lo que se aplican también dosis de 200 mg/L y 680 mg/L H_2O_2 , dosis máxima aplicada por Ibarz (2008) en la inactivación de enterococos en aguas naturales mediante fotocatálisis/ H_2O_2 .

El catalizador utilizado en los experimentos de fotocatálisis es TiO_2 comercial en forma de polvo (Degussa P25). La concentración de TiO_2 utilizada es de 1 g/L, tal y como aconsejan muchos autores en tratamientos de fotocatálisis [Rincón y Pulgarín, 2003; Cho et al., 2004; Ibarz, 2008].

Se realizan experimentos a distintos tiempos, hasta un máximo de 60 minutos, para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la bacteria objeto de estudio. En los ensayos en los que se utiliza H_2O_2 , su dosis residual se neutraliza con catalasa (Sigma Aldrich) para anular su efecto bactericida.

4.4. Tratamiento de datos: Modelos cinéticos de inactivación microbiana

La microbiología predictiva se utiliza para conocer la respuesta de las poblaciones de microorganismos frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos. Generalmente, las curvas de inactivación microbiana presentan una de las formas descritas en la Figura 7.

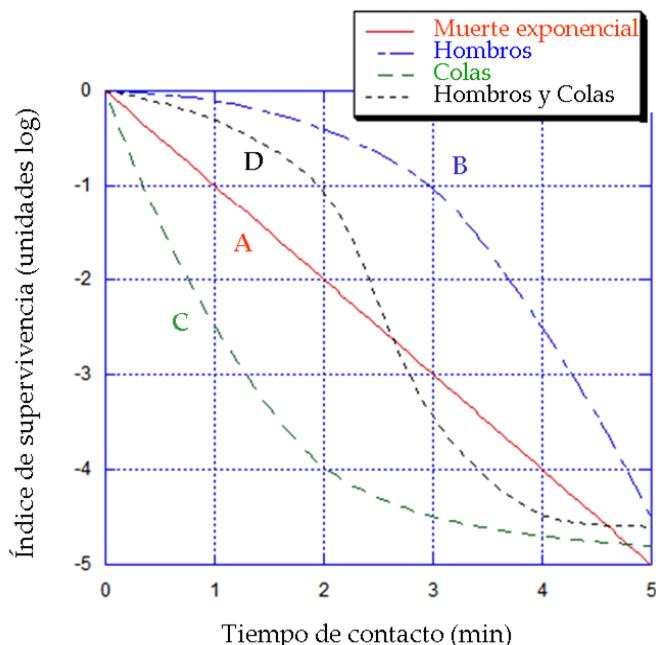


Figura 7. Curvas de inactivación microbiana: A) Lineal, B) Convexa, C) Cónvava, D) Sigmoidea [Gyürék y Finch, 1998]

Los modelos cinéticos de inactivación microbiana son modelos matemáticos que estudian el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso [Lee y Nam, 2002]. Mediante la modelización cinética se pretende obtener una expresión matemática que facilite el diseño adecuado de un sistema de desinfección.

La Tabla 6 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. En el ANEXO VI se desarrolla con más detalle cada uno de los modelos matemáticos seleccionados.

Tabla 6. Modelos cinéticos de inactivación bacteriana aplicados.

Modelo cinético	Ecuación integrada	Coeficientes cinéticos	Referencias
Modelo de Hom	$\log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -k_{ap} t^m$	k_{ap}, m	Hom, 1972
Modelo de Hom modificado	$\ln \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nk'}\right)^m k \cdot C_0^n \left[1 - e^{\left(\frac{-nk't}{m}\right)}\right]^m$	k, k', n, m	Haas y Joffe, 1994
Modelo bifásico	$\log \frac{N_t}{N_0} = \log [P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1-P) \cdot e^{-k_2 \cdot t}]$	P, k_1, k_2	Pruitt y Kamau, 1993
Modelo de Mafart	$\log \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p$	δ, p	Mafart et al., 2002
Modelo de Geeraerd	$N_t = (N_0 - N_{res}) e^{-k_{max} t} \left(\frac{e^{k_{max} \cdot SI}}{1 + (e^{k_{max} \cdot SI} - 1) e^{-k_{max} t}} \right) + N_{res}$	k_{max}, SI	Geeraerd et al., 2000

Para calcular los coeficientes cinéticos de cada modelo y tratamiento se utiliza la herramienta Solver y el complemento GIaFiT (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) [Geeraerd et al., 2005] del programa Excel (Microsoft).

La calidad de los ajustes de los modelos a los datos experimentales obtenidos se evalúa mediante dos índices: el coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático medio (ECM) (ecuaciones 4.6 y 4.7), y mediante la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente. El cálculo de estos parámetros, R^2 y ECM, se realiza con el programa Excel (Microsoft).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad [4.6]$$

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad [4.7]$$

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

5.1. Resultados de inactivación de *Enterococcus* sp.

5.1.1. Cloración

La Tabla 7 refleja la población de *Enterococcus* sp. superviviente y el cloro residual en cada tiempo muestreado para cada dosis de cloro empleada durante el proceso de cloración. La Figura 8 representa las curvas de inactivación bacteriana durante los distintos ensayos. Tras el tratamiento, en todos los casos queda cloro residual sin reaccionar, que se neutraliza con tiosulfato sódico. En el ANEXO VII se muestran todos los resultados de cloración.

Tabla 7. Recuento de *Enterococcus* sp. (N_t) y cloro residual durante los tratamientos de cloración

Tiempo (min)	Dosis de cloro aplicadas							
	3'8 mg/L Cl ₂		15 mg/L Cl ₂		30 mg/L Cl ₂		65 mg/L Cl ₂	
	N_t (UFC/ 100 mL)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)	N_t (UFC/ 100 mL)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)	N_t (UFC/ 100 mL)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)	N_t (UFC/ 100 mL)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)
0	$6'6 \cdot 10^7$	3'8	$3'2 \cdot 10^7$	15'0	$6'6 \cdot 10^7$	30'0	$3'4 \cdot 10^7$	65'0
0'5	$3'0 \cdot 10^7$	2'6	$1'6 \cdot 10^7$	10'2	$6'8 \cdot 10^5$	19'0	$1'5 \cdot 10^3$	40'1
1	$1'2 \cdot 10^7$	2'4	$1'6 \cdot 10^7$	10'1	$1'7 \cdot 10^5$	15'8	$2'8 \cdot 10^1$	33'3
3	$3'0 \cdot 10^6$	2'1	$6'8 \cdot 10^5$	8'2	$5 \cdot 10^2$	13'8	0	25'2
5	$4'5 \cdot 10^6$	1'9	$9'0 \cdot 10^4$	7'5	$2 \cdot 10^1$	12'3	0	19'2
10	$1'0 \cdot 10^6$	1'8	8	6'2	4	11'8	0	15'9
30	$4'4 \cdot 10^4$	1'5	1	6'2	2	11'7	0	15'7

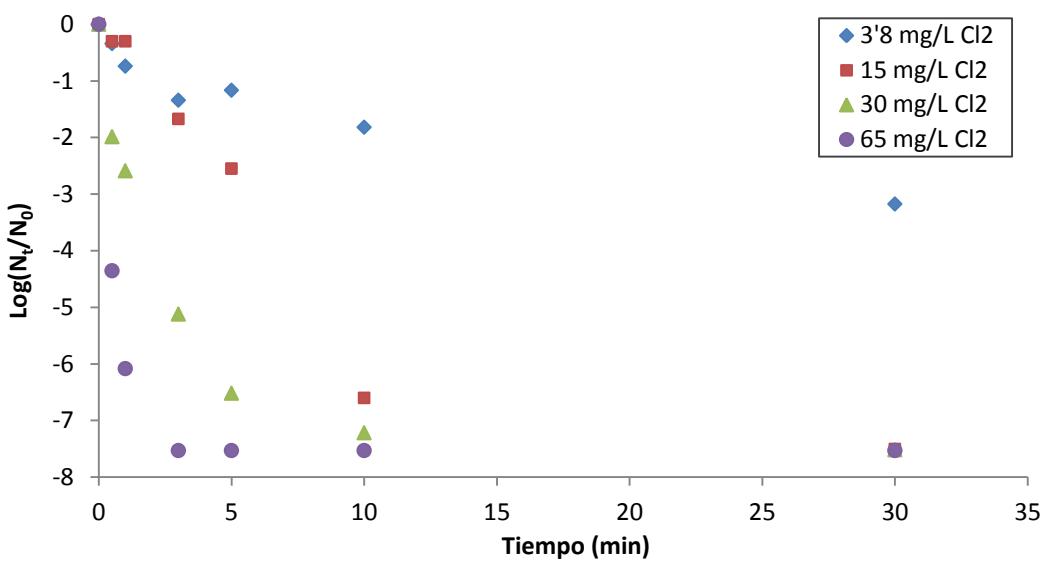


Figura 8. Inactivación de *Enterococcus* sp. durante los tratamientos de cloración. $N_0 = 3'2 - 6'6 \cdot 10^7$ UFC/100 mL.

En general, se observa que al aumentar la dosis de cloro la desinfección es más rápida, es decir, que para un tiempo dado se consigue mayor inactivación bacteriana cuanto más hipoclorito sódico se añade. Con la dosis de cloro más baja (3'8 mg/L Cl₂) no se llegan a inactivar por completo las bacterias estudiadas, consiguiéndose una inactivación de 3'2

unidades logarítmicas tras 30 minutos de tratamiento. Este valor es comparable con los niveles de desinfección de enterococos alcanzados en la cloración de efluentes secundarios de EDARs a escala real [Tyrrell et al., 1995; Srinivasan et al., 2011].

Sin embargo, al adicionar la demanda de cloro correspondiente a la muestra (65 mg/L Cl₂) se observa una rápida disminución de *Enterococcus* sp. durante los primeros instantes de estudio. A los 30 segundos de tratamiento se obtiene una reducción bacteriana de más de 4 ciclos logarítmicos, alcanzándose al tercer minuto de experimento, con un consumo de cloro de 40 mg/L Cl₂, la desinfección completa de la muestra (7'5 unidades logarítmicas).

Tras 30 minutos de tratamiento, se obtiene la misma inactivación bacteriana con dosis intermedias de 15 y 30 mg/L Cl₂ que aplicando la demanda de cloro de la muestra, siendo el consumo de cloro notablemente menor, 9 y 18 mg/L Cl₂, respectivamente. Esto indica que, para llevar a cabo la desinfección de la muestra estudiada bajo las condiciones de operación aplicadas, no es necesario satisfacer su demanda de cloro, y por tanto, se pueden aplicar dosis menores de cloro que, aumentando el tiempo de tratamiento, consigan el mismo resultado de desinfección. Este hecho se refleja en la Figura 9, donde se representa la inactivación de *Enterococcus* sp. frente al parámetro CT (concentración de cloro x tiempo de contacto).

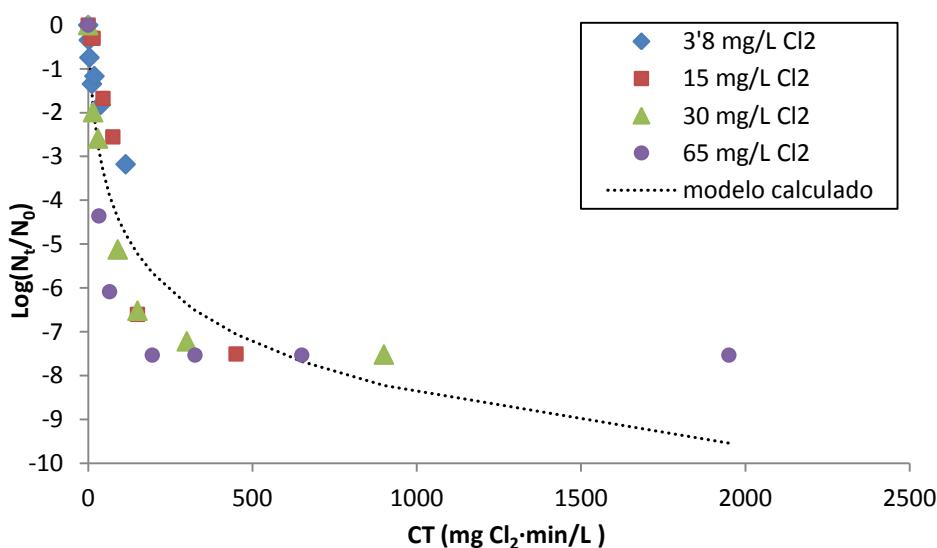


Figura 9. Inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos de cloración en función del parámetro CT. N₀= 3'2-6'6·10⁷ UFC/100 mL.

Se observa que todos los valores siguen la misma tendencia y que, aproximadamente para un valor CT de 350 mg Cl₂·min/L se alcanza la inactivación total. Esta inactivación se puede conseguir, por ejemplo, mediante aplicación de dosis de 35 mg/L Cl₂ durante 10 minutos o con dosis de 10 mg/L Cl₂ durante 35 minutos.

Existen algunos modelos que relacionan la inactivación bacteriana alcanzada en la cloración con el parámetro CT. Por ejemplo, el modelo Selleck-Collins, descrito según la ecuación: $\text{Log}(N_t/N_0) = -3 \cdot \text{Log}(1 + 0'23\text{CT})$ sirve para predecir la reducción de bacterias coliformes para una dosis de cloro determinada al final de un tiempo de contacto específico [Black & Veatch Corporation, 2010]. De manera similar, en este trabajo se modeliza la inactivación de *Enterococcus* sp. en función del parámetro CT, obteniéndose la siguiente ecuación: $\text{Log}(N_t/N_0) = -3'9 \cdot \text{Log}(0'89 + 0'14\text{CT})$, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0'85.

5.1.2. Tratamientos basados en ozono

En la Tabla 8 se recogen los resultados de supervivencia de enterococos durante los distintos tratamientos basados en ozono. La Figura 10 representa la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. a lo largo de los ensayos. En general, se observa que los resultados obtenidos en los tres tratamientos son muy similares, por lo que, en el rango estudiado, no se aprecia interacción entre el peróxido de hidrógeno y el ozono. En el ANEXO VII se muestran todos los resultados de los tratamientos basados en ozono.

Tabla 8. Recuento de *Enterococcus* sp. (N_t) y ozono consumido por la muestra durante los tratamientos basados en ozono

Tiempo (min)	Ozonización		Peroxona (1'4 mg/L H ₂ O ₂)		Peroxona (20 mg/L H ₂ O ₂)	
	O ₃ consumido (mg/L)	N _t (UFC/100 mL)	O ₃ consumido (mg/L)	N _t (UFC/100 mL)	O ₃ consumido (mg/L)	N _t (UFC/100 mL)
0	0	1'3·10 ⁸	0	1'4·10 ⁸	0'0	1'8·10 ⁸
0'5	7'2	1'2·10 ⁸	7'2	9'3·10 ⁷	7'2	1'6·10 ⁸
1	15'0	7'5·10 ⁷	14'9	9'5·10 ⁷	15'3	1'6·10 ⁷
3	34'3	2'7·10 ⁷	37'5	6'1·10 ⁷	39'2	9'0·10 ⁷
6	56'6	5'1·10 ⁶	51'5	1'6·10 ⁷	60'2	4'0·10 ⁶
9	72'8	6'5·10 ³	72'8	2'3·10 ³	71'7	9'8·10 ³
15	90'1	1'6·10 ²	90'1	5'6·10 ¹	107'4	2'7·10 ²

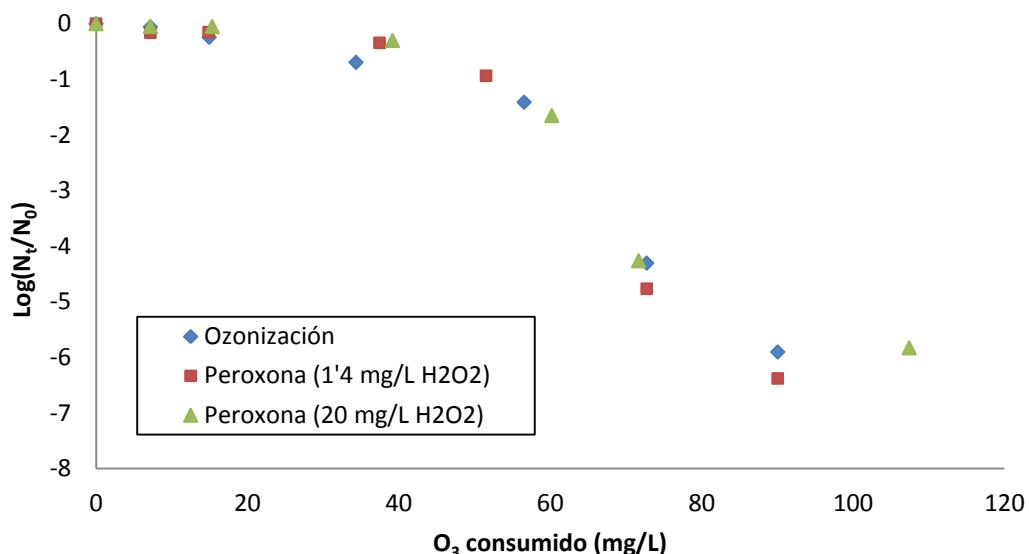


Figura 10. Inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos basados en ozono. $N_0 = 1'3\text{--}1'8 \cdot 10^8$ UFC/100 mL.

Las curvas de inactivación (Figura 10) de los tres ensayos muestran que durante los primeros minutos del tratamiento la disminución de la población bacteriana es lenta, alcanzándose una inactivación aproximada de 2 ciclos logarítmicos tras 6 minutos de ozonización, lo que equivale a un consumo de ozono de unos 50-60 mg/L O₃. A partir de esa dosis, la inactivación de *Enterococcus* sp. es más rápida y presenta un descenso lineal. Al final del tratamiento se consigue una reducción de unas 6 unidades logarítmicas, lo que supone un consumo de ozono de 90-110 mg/L O₃. El hombro inicial o fase “lag” que presentan estas

curvas de inactivación puede deberse a distintos factores, ya sea a una mezcla inadecuada del ozono en la muestra, a un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos de acción bacterianos, a una resistencia inicial de los microorganismos al ataque del ozono o a la presencia de materia oxidable en la muestra.

Mientras que las curvas de inactivación de los ensayos de cloración (Figura 8) presentan forma cóncava y una rápida desinfección inicial, en los tratamientos basados en ozono (Figura 10), se observa que las curvas de inactivación tienen forma convexa y que la disminución de la población de *Enterococcus* sp. al comienzo de los ensayos es lenta, haciendo necesario un gran consumo de ozono para obtener más de 2 unidades logarítmicas de inactivación. Este resultado es similar al obtenido por Gehr et al. (2003) en la inactivación de enterococos y coliformes fecales mediante ozonización en el efluente primario de una EDAR, cuyos estudios también reflejan la necesidad de grandes cantidades de ozono (30-50 mg/L O₃) para alcanzar una inactivación de 2 unidades logarítmicas. Otras investigaciones muestran una mayor resistencia de *Enterococcus* sp. al ozono en agua de salida de depuradora, consiguiendo tan solo la inactivación de 1 ciclo logarítmico decimal tras 10 min de tratamiento con un caudal de ozono alimentado de 8 g/h [Tyrrell et al., 1995].

5.1.3. Tratamientos basados en luz UV/visible

En primer lugar se aplicaron los siguientes tratamientos: irradiación, irradiación combinada con peróxido de hidrógeno (1'4 mg/L y 20 mg/L H₂O₂), irradiación catalizada con dióxido de titanio (fotocatálisis) y fotocatálisis combinada con H₂O₂ (20 mg/L y 200 mg/L). La duración de cada uno de estos tratamientos fue de 30 minutos. Puesto que durante la realización de estos ensayos se observó que las dosis de peróxido de 1'4 mg/L y 20 mg/L H₂O₂ eran insuficientes para obtener una inactivación bacteriana significativa, se decidió aumentar la concentración hasta 200 mg/L H₂O₂.

En la Tabla 9 se muestra la población de *Enterococcus* sp. superviviente, N_t, y la inactivación de estos, log(N_t/N₀), alcanzada al finalizar cada uno los ensayos. En el ANEXO VII se muestran todos los resultados obtenidos en los ensayos basados en luz UV/visible.

Tabla 9. Inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos basados en luz UV/visible

Muestra inicial	Tiempo (min)	N _t (UFC/100mL)	Log (N _t /N ₀)
	0	1'55·10 ⁸	0,00
UVA-vis	30	1'57·10 ⁸	0,01
UVA-vis + 1'4 mg/L H₂O₂	30	1'21·10 ⁸	-0,11
UVA-vis + 20 mg/L H₂O₂	30	1'19·10 ⁸	-0,11
UVA-vis + 1 g/L TiO₂	30	1'34·10 ⁸	-0,06
UVA-vis + 20 mg/L H₂O₂ + 1 g/L TiO₂	30	8'10·10 ⁷	-0,28
UVA-vis + 200 mg/L H₂O₂ + 1 g/L TiO₂	30	6'20·10 ⁷	-0,40

En las condiciones de trabajo estudiadas se observa que apenas disminuye la población bacteriana tras 30 minutos de tratamiento. En los ensayos de irradiación/H₂O₂ (20 mg/L H₂O₂) y de fotocatálisis se obtiene una disminución de la población bacteriana de 0'11 y 0'06 ciclos logarítmicos, respectivamente. Sin embargo, al combinar la fotocatálisis con 20 mg/L H₂O₂, la inactivación de enterococos es de 0'28 unidades logarítmicas, valor mayor que la suma de las inactivaciones por separado, lo que sugiere la existencia de un efecto sinergístico entre estos

factores. Además, el aumento de la dosis de peróxido hasta 200 mg/L H₂O₂ en combinación con la fotocatálisis, supone una disminución mayor de la población de *Enterococcus* sp., alcanzándose una inactivación de 0'4 unidades logarítmicas.

Otros autores han obtenido una desinfección ligeramente superior, 0'6-0'8 unidades logarítmicas de inactivación de enterococos, utilizando la misma dosis de TiO₂ y el mismo tiempo de tratamiento en fotocatálisis aplicada en agua residual depurada [Rincón y Pulgarín, 2003; Lydakis-Simantiris et al., 2010]. Las investigaciones de estos autores sugieren que se necesitan tiempos de tratamiento más prolongados y temperaturas mayores para mejorar la eficacia del proceso.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la bibliografía consultada, se decide realizar dos experimentos adicionales aumentando la dosis de peróxido de hidrógeno hasta 680 mg/L H₂O₂ (20mM), dosis máxima utilizada por Ibarz (2008) en la eliminación de *Enterococcus* sp. mediante fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno en aguas naturales. Se realiza un ensayo de radiación/H₂O₂ (680 mg/L H₂O₂) y un ensayo de fotocatálisis/H₂O₂ (680 mg/L H₂O₂). Además, se aumenta el tiempo de tratamiento hasta 60 minutos para poder obtener una curva de inactivación que permita la posterior aplicación de modelos cinéticos.

En la Tabla 10 se recogen los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. obtenidos en ambos ensayos adicionales y el H₂O₂ residual para cada tiempo. En el tratamiento de radiación/H₂O₂ se observa que el aumento de la dosis de H₂O₂ y del tiempo de aplicación supone un ligero aumento de la inactivación bacteriana, en comparación con los resultados obtenidos para dosis menores de H₂O₂ (Tabla 9). En la fotocatálisis combinada con 680 mg/L H₂O₂ se aprecia una disminución considerable de la población bacteriana de estudio. Tras 30 minutos de tratamiento se consigue una desinfección de 2'20 unidades logarítmicas, mientras que con radiación/680 mg/L H₂O₂ y fotocatálisis por separado, tan solo se obtiene una reducción de 0'30 y 0'06 unidades logarítmicas respectivamente. Además, el consumo de H₂O₂ es mucho mayor en presencia de TiO₂, indicando la formación de mayor número de radicales desinfectantes y confirmando así la existencia de un efecto sinergístico entre el peróxido de hidrógeno y el dióxido de titanio.

Tabla 10. Inactivación de *Enterococcus* sp. en los ensayos de radiación/H₂O₂ (680 mg/L H₂O₂) y fotocatálisis/H₂O₂ (680 mg/L H₂O₂)

Tiempo (min)	UVA-vis + 680 mg/L H ₂ O ₂			UVA-vis + 680 mg/L H ₂ O ₂ + 1 g/L TiO ₂		
	N _t (UFC/ 100 mL)	Log (N _t /N ₀)	[H ₂ O ₂] (mg/L)	N _t (UFC/ 100 mL)	Log (N _t /N ₀)	[H ₂ O ₂] (mg/L)
0	1'07·10 ⁸	0	680	1'05·10 ⁸	0,00	680
15	-	-		3'30·10 ⁷	-0,50	>200
30	5'40·10 ⁷	-0,30	200-400	6'60·10 ⁵	-2,20	30-100
45	-	-		1'90·10 ⁵	-2,74	3-10
60	2'60·10 ⁷	-0,61	200-400	1'00·10 ⁴	-4,02	0

La Figura 11 representa la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. durante el tratamiento de fotocatálisis combinada con 680 mg/L H₂O₂.

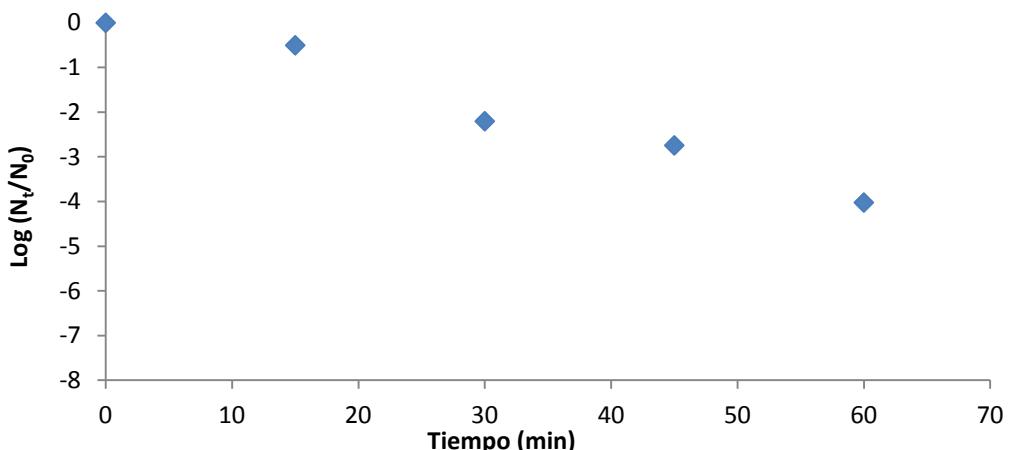


Figura 11. Inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno (680 mg/L H₂O₂). N₀= 1'05·10⁸ UFC/100 mL.

En comparación con los tratamientos de cloración (7'5 unidades logarítmicas de inactivación) y los basados en ozono (6 un. log.), los tratamientos basados en luz UV/visible aplicados en el presente trabajo de investigación presentan una menor eficacia de desinfección de *Enterococcus* sp., ya que se alcanzan 4 unidades logarítmicas de inactivación en el mejor de los casos. Es necesario aumentar considerablemente la dosis de peróxido de hidrógeno y el tiempo de tratamiento, para que, en combinación con dióxido de titanio e irradiación UVA/visible se consiga una inactivación de *Enterococcus* sp. importante. Además, en el tratamiento fotocatalítico se consume por completo el H₂O₂ añadido, por lo que cabe esperar que no haya una inactivación adicional prolongando el tiempo de tratamiento, mientras que en la cloración y la ozonización quedan dosis residuales, de cloro y ozono respectivamente, que pueden incrementar la inactivación o evitar el crecimiento bacteriano.

5.2. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. obtenidas en los tratamientos de cloración, ozonización, peroxona y fotocatálisis/680 mg/L H₂O₂, se analizan mediante diversos modelos matemáticos. En cada caso se aplican los modelos que mejor se ajustan a la curva de inactivación obtenida. En el ANEXO VII de la presente memoria se desarrollan con más detalle cada uno de estos modelos. Además, los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. obtenidos en este trabajo de investigación, en el que se utiliza un agua de salida de depuradora, se comparan con resultados previos del grupo de investigación en muestras de agua natural desinfectadas mediante los mismos tratamientos.

5.2.1. Cloración

Las curvas de inactivación cóncavas que describen la desaparición de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración se analizan mediante 3 modelos matemáticos: el modelo de Hom modificado, el modelo bifásico y el modelo de Mafart, modelos utilizados por Lanao (2012). El modelo de Hom modificado asume que la población bacteriana se inactiva a lo largo del tratamiento conforme el desinfectante se va descomponiendo. El modelo bifásico reconoce la existencia de dos poblaciones con distinta resistencia al tratamiento, respondiendo ambas a una cinética de primer orden. Finalmente, el modelo de Mafart también asume que existe una distribución de resistencias frente al tratamiento dentro de la población bacteriana, pero estas resistencias siguen la distribución de Weibull.

Las Tablas 11, 12 y 13 muestran los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos, mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático medio (ECM). Además, se incluyen los valores de los parámetros obtenidos por Lanao (2012) en aguas naturales al aplicar su demanda de cloro de 3'8 mg/L Cl₂.

Los índices ECM y R^2 , y la representación de los valores observados y de los valores estimados mediante los diferentes modelos (ANEXO VII) indican, en conjunto, una buena adecuación del modelo de Hom modificado y del modelo bifásico a los valores experimentales de inactivación obtenidos.

Tabla 11. Parámetros cinéticos del modelo de Hom modificado aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración.

Muestra	Dosis de cloro (mg/L Cl ₂)	k (min ⁻¹)	k'(min ⁻¹)	m	n	ECM	R ²
Agua salida depuradora	3'8	0'634	0'428	0'47	0'001	0'14	0'98
	15	1'450	0'806	0'50	0'002	1'02	0'89
	30	1'783	1'432	0'76	0'168	0'14	1'00
	65	1'949	3'295	0'89	0'417	0'02	1'00
Agua natural [Lanao, 2012]	3'8	2'077	0'45	0'50	1'01	0'12	0'99

En la Tabla 11 se observa que en el agua de salida de depuradora, tanto k como k', constantes de velocidad de inactivación y de descomposición del desinfectante, respectivamente, aumentan conforme se incrementa la dosis de cloro. Utilizando una dosis de 3'8 mg/L Cl₂ la desinfección es mucho más rápida en el agua natural que en el agua residual depurada, tal y como indican los valores de k. Además, cuando se satisface la demanda de cloro, la constante de velocidad de inactivación es muy similar en ambos tipos de agua.

Tabla 12. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración.

Muestra	Dosis de cloro (mg/L Cl ₂)	P	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	R ²
Agua de salida de depuradora	3'8	0'93265892	1'35	0'15	0'16	0'98
	15	0'99999952	1'52	0'11	0'36	0'99
	30	0'99999969	4'04	0'10	0'55	0'98
	65	0'99999996	15'10	0'02	0'44	0'98
Agua natural [Lanao, 2012]	3'8	0'99999997	23'79	0'25	0'57	0'96

Los valores de los parámetros del modelo bifásico de la Tabla 12 indican la existencia de una subpoblación 1 más sensible al tratamiento de cloración, cuya constante de inactivación es k₁, y otra subpoblación 2 más resistente que presenta una constante de inactivación menor, k₂. Al incrementar la dosis de cloro, la constante k₁ y P, la fracción de la población sensible al tratamiento, aumentan, mientras que k₂ disminuye. En el agua natural, los valores de ambas constantes de inactivación, k₁ y k₂, son mayores, lo que supone una inactivación más rápida, y la subpoblación resistente (1-P) es similar a la que presenta el agua de salida de depuradora al aplicarle su demanda de cloro (65 mg/L Cl₂).

Tabla 13. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración.

Muestra	Dosis de cloro (mg/L Cl ₂)	p	δ (min)	ECM	R ²
Agua salida depuradora	3'8	0'47	2'56	0'14	0'98
	15	0'56	0'72	0'99	0'89
	30	0'26	0'008	0'84	0'90
	65	0'13	0'000001	0'72	0'92
Agua natural [Lanao, 2012]	3'8	0,13	0,0000005	0,50	0,96

Según el modelo de Mafart (Tabla 13), el valor del parámetro de forma, p, es inferior a 1, indicando que las curvas de inactivación presentan una forma cóncava, lo que se traduce en la aparición de una cola. El parámetro de escala, δ, se corresponde con el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana. En el agua de salida de depuradora, se observa que al aumentar la dosis de cloro, δ disminuye hasta alcanzar valores muy pequeños. Mientras que con una dosis de 3'8 mg/l Cl₂ se necesitan más de 2 minutos para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de *Enterococcus* sp., al aplicar a la muestra su demanda de cloro (65 mg/l Cl₂), esta reducción es casi instantánea. En el agua natural también se aprecia una rápida inactivación del primer ciclo logarítmico decimal al aplicarle su demanda de cloro (3'8 mg/l Cl₂).

En general, se observa que, al satisfacer la demanda de cloro de una muestra, independientemente de su matriz, la velocidad de inactivación de *Enterococcus* sp. es similar.

5.2.2. Tratamientos basados en ozono

Las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. obtenidas durante los tratamientos de ozonización y peroxona (1'4 mg/L H₂O₂ y 20 mg/L H₂O₂), se analizan a través de 4 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico, el modelo de Mafart y el modelo de Geeraerd. Dos de los modelos matemáticos utilizados, el modelo bifásico y el de Mafart, coinciden con los modelos seleccionados para el tratamiento de cloración. El modelo de Hom asume que no hay disminución del desinfectante a lo largo del tratamiento y, puesto que el ozono se suministra de manera continua y constante al reactor que alberga la muestra, se considera que la concentración de ozono aplicada es constante, siendo esta suposición consistente con el modelo de Hom. Además, dado que las curvas de inactivación parecen presentar fenómenos de hombro, una fase de inactivación lineal y cola, se utiliza también el modelo de Geeraerd.

Las tablas 14, 15, 16 y 17 recogen los valores de los parámetros cinéticos obtenidos tras aplicar los modelos matemáticos seleccionados sobre las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. durante los tratamientos de ozonización y peroxona. Se incluyen también los resultados obtenidos por Lanao (2012) en aguas naturales mediante los mismos tratamientos.

Los valores de los parámetros cinéticos calculados para cada modelo son similares en los tres tratamientos basados en ozono aplicados en este trabajo de investigación, lo que confirma que la adición de peróxido de hidrógeno en las dosis estudiadas (1'4 mg/L y 20 mg/L H₂O₂) no influye sobre el resultado del tratamiento de ozonización.

Tabla 14. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos basados en ozono.

Muestra	Tratamiento	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m	ECM	R^2
Agua salida depuradora	Ozonización	0'249	1'18	0'46	0'96
	Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	0'178	1'34	0'68	0'92
	Peroxona 20 mg/L H ₂ O ₂	0'231	1'21	0'46	0'96
Agua natural (Lanao, 2010)	Ozonización	3,001	0,26	0,69	0,94
	Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	4,321	0,21	0,58	0,96

En el modelo de Hom (Tabla 14) se observa que el parámetro m, constante empírica del modelo, es mayor de 1, lo que significa que las curvas tienen forma convexa. Sin embargo, en el agua natural las curvas presentan valores de m menores de la unidad, siendo su forma cóncava, y las constantes de velocidad aparente, k_{ap} , son considerablemente mayores, lo que se traduce en una inactivación bacteriana más rápida en el agua natural que en el agua de salida de depuradora.

Tabla 15. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos basados en ozono.

Muestra	Tratamiento	P	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R^2
Agua salida depuradora	Ozonización	1'000000	0'903	0'903	0'50	0'95
	Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	1'000000	0'951	0951	0'79	0'91
	Peroxona 20 mg/L H ₂ O ₂	1'00000	0'894	0'894	0'53	0'96
Agua natural (Lanao, 2010)	Ozonización	0,999993	3,862	0,185	0,49	0,98
	Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	0,999998	5,98	0,24	0,94	0,95

En el modelo bifásico (Tabla 15) aplicado a los datos de inactivación de *Enterococcus* sp. en agua de salida de depuradora mediante tratamientos basados en ozono, se observa que en los 3 casos, las constantes k_1 y k_2 tienen el mismo valor. Esto indica que es improbable que existan dos subpoblaciones microbianas distintas que presenten una sensibilidad al tratamiento diferente. Sin embargo, en el agua natural, el modelo bifásico sí que explica el comportamiento de inactivación de las bacterias de estudio, observándose la existencia de dos subpoblaciones, una más sensible y otra más resistente. En cualquier caso, las constantes de inactivación de la población sensible, k_1 , indican que la reducción bacteriana mediante los tratamientos basados en ozono es mayor en el agua natural que en el agua de salida de depuradora.

Tabla 16. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos basados en ozono.

Muestra	Tratamiento	p	δ (min)	ECM	R^2
Agua salida depuradora	Ozonización	1'18	3'231	0'46	0'96
	Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	1'34	3'622	0'68	0'92
	Peroxona 20 mg/L H ₂ O ₂	1'21	3'354	0'46	0'96
Agua natural (Lanao, 2010)	Ozonización	0,23	0,002	0,74	0,93
	Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	0,21	0,001	0,58	0,96

Según indica el modelo de Mafart (Tabla 16), el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población de *Enterococcus* sp., δ , es algo mayor de 3 minutos en los tres casos en los que se utiliza agua de salida de depuradora. Este valor contrasta con el obtenido para aguas naturales, que es tan solo de décimas de segundo. El parámetro p indica que la forma de las curvas es convexa en el caso de agua de salida de depuradora, ya que su valor es mayor de 1, mientras que en agua natural p es menor de la unidad, siendo cóncava la forma de las curvas.

En general, los valores de los índices de ajuste, ECM y R^2 , en los modelos aplicados son buenos, pues tienen valores cercanos a 1 en el caso del coeficiente de correlación (R^2) y valores cercanos a 0 en el caso del error cuadrático medio (ECM). Sin embargo, la representación de los valores experimentales observados y de los valores estimados por los diferentes modelos (Figura 12) muestra que los modelos de Hom, bifásico y de Mafart no se ajustan a la forma real de la curva de inactivación. Por ello se aplica un cuarto modelo, el modelo de Geeraerd, que tiene en cuenta el hombro inicial y la cola que presentan las curvas de inactivación de los tres tratamientos basados en ozono. Los parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd se muestran en la Tabla 17. En el ANEXO VII se recogen las gráficas correspondientes a los tratamientos peroxona.

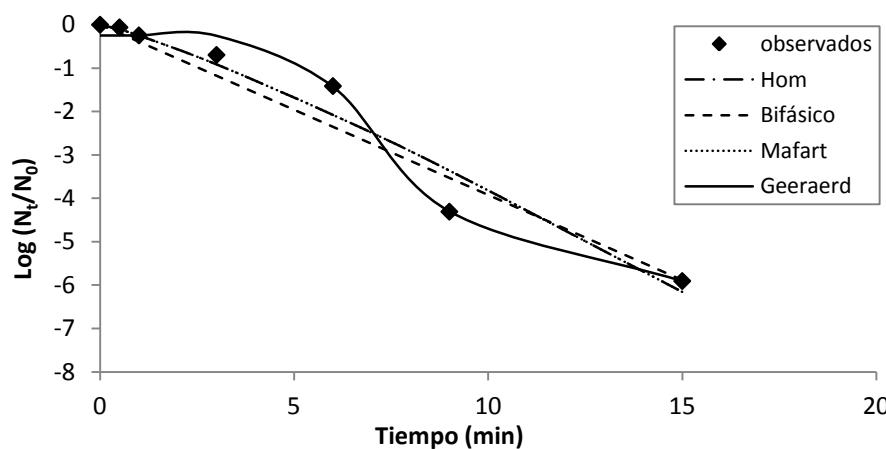


Figura 12. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de ozonización

Tabla 17. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos basados en ozono.

Muestra	Tratamiento	SI	k_{\max} (min ⁻¹)	ECM	R^2
Agua salida depuradora	Ozonización	4'81	2'23	0'31	0'991
	Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	5'47	3'01	0'14	0'999
	Peroxona 20 mg/L H ₂ O ₂	4'16	1'98	0'12	0'999

La Figura 12 y la Tabla 17 muestran que los datos obtenidos se ajustan perfectamente al modelo de Geeraerd, siendo SI la duración del hombro, es decir el tiempo inicial durante el que la población de bacterias disminuye más lentamente. Este parámetro es algo mayor en el tratamiento peroxona 1'4 mg/L H₂O₂, sin embargo, la velocidad específica de inactivación, k_{\max} , también es mayor en este caso.

5.2.3. Tratamientos basados en luz UV/vis

La curva de inactivación de *Enterococcus* sp. obtenida durante el tratamiento de fotocatálisis/H₂O₂ (680 mg/L H₂O₂) se analiza a través de 3 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart. En este caso se utiliza el modelo de Hom ya que la irradiación de luz solar se aplica de manera constante a la muestra a lo largo del experimento, por lo que no se produce una disminución de la concentración del agente desinfectante, tal y como establece el modelo de Hom.

Las tablas 18, 19 y 20 recogen los valores de los parámetros cinéticos calculados para la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de fotocatálisis combinado con 680 mg/L H₂O₂. Se incluyen también los resultados obtenidos por Lanao (2012) en aguas naturales mediante fotocatálisis/H₂O₂ (1'4 mg/L H₂O₂). En la gráfica de la Figura 13 se representa el ajuste de los tres modelos a los datos experimentales observados en el presente trabajo de investigación. Tanto la gráfica como los valores de los parámetros ECM y R² muestran un ajuste similar de los tres modelos a los datos experimentales observados.

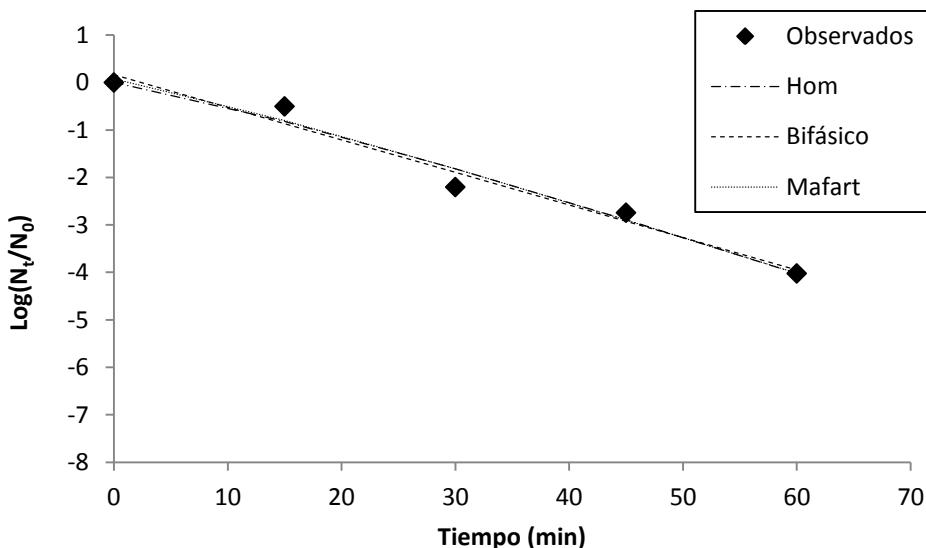


Figura 13. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de fotocatálisis combinada con 680 mg/L H₂O₂.

Tabla 18. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en la fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno.

Muestra	Tratamiento	k _{ap} (min ⁻¹ · W · m ⁻²)	m	ECM	R ²
Agua salida depuradora	Fotocatálisis/680 mg/L H ₂ O ₂	0'037	1'15	0'23	0'98
Agua natural [Lanao, 2012]	Fotocatálisis/1'4 mg/L H ₂ O ₂	0'087	0'90	0'14	0'95

Según el modelo de Hom (Tabla 18), la constante de velocidad aparente de inactivación bacteriana es mayor en el caso del agua natural. Sin embargo, el parámetro m en el agua de salida de depuradora es mayor de 1, indicando que la forma de la curva es convexa, mientras que en el agua natural, donde m es menor de 1, la curva es cóncava, por lo que puede presentar un efecto de cola.

Tabla 19. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en la fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno.

Muestra	Tratamiento	P	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	R ²
Agua salida depuradora	Fotocatálisis/680 mg/L H ₂ O ₂	1	0'16	0'16	0'54	0'97

El modelo bifásico no describe bien las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. ni en el agua de salida de depuradora (Tabla 19) ni en el agua natural [Lanao, 2012]. Aunque el ajuste es bueno, las curvas obtenidas muestran una tendencia de inactivación prácticamente lineal, por lo que no se diferencian poblaciones con diferentes resistencias al tratamiento.

Tabla 20. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en la fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno.

Muestra	Tratamiento	p	δ (min)	ECM	R ²
Agua salida depuradora	Fotocatálisis/680 mg/L H ₂ O ₂	1'11	16'87	0'36	0'98
Agua natural [Lanao, 2012]	Fotocatálisis/1'4 mg/L H ₂ O ₂	0'86	13'77	0'19	0'95

El parámetro p del modelo de Mafart (Tabla 20) indica la forma de las curvas de inactivación, convexa en el agua de salida de depuradora ($p>1$) y cóncava en el agua natural ($p<1$). Hay que destacar que la dosis de peróxido de hidrógeno utilizada en este trabajo (680 mg/L H₂O₂) es muy superior a la utilizada en el agua natural (1'4 mg/L H₂O₂), y, sin embargo, la inactivación del primer ciclo logarítmico decimal ocurre antes en el agua natural (14 min) que en el agua de salida de depuradora (17 min).

En comparación con los tratamientos anteriores de cloración y ozonización, la fotocatálisis combinada con H₂O₂ presenta constantes de velocidad de inactivación mucho menores, siendo necesarios tiempos de tratamiento más prolongados para alcanzar el mismo grado de desinfección.

5.3. Estudio económico

El coste económico es un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de decidir qué tratamiento utilizar a escala real. Para evaluar de forma precisa el coste de una instalación a escala real hay que considerar multitud de factores como la inversión en equipos, el consumo eléctrico y de reactivos, el coste de operación y mantenimiento... [Parsons, 2004].

En el presente trabajo de investigación se estima el coste de cada tratamiento considerando exclusivamente los costes relativos a los agentes desinfectantes utilizados. Para poder comparar los resultados de cada uno de los tratamientos estudiados, se calcula el coste necesario para alcanzar una inactivación de una unidad o ciclo logarítmico (90 % de inactivación).

5.3.1. Cloración

El cálculo de la dosis de cloro necesaria para inactivar una unidad logarítmica de *Enterococcus* sp. se realiza teniendo en cuenta el parámetro CT, mostrado en la Figura 9. Según el modelo calculado, para inactivar una unidad logarítmica bacteriana se necesitan

aproximadamente 6'5 mg Cl₂·min/L. Fijando el tiempo de tratamiento en 5 minutos se obtiene una dosis de cloro de 1'3 mg/L Cl₂. El reactivo utilizado en la cloración es hipoclorito sódico (NaClO), cuyo coste es de 97 €/Tm con una riqueza del 15% p/v, según la empresa suministradora Ercros [Lanao, 2012]. El precio del tratamiento se estima para un volumen de muestra de 1 m³. La expresión utilizada para realizar el cálculo es la siguiente:

$$\text{Coste NaClO} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Dosis Cl}_2 \left(\frac{\text{mg Cl}_2}{\text{L}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L NaClO}}{150000 \text{ mg Cl}_2} \cdot \frac{1'15 \text{ kg NaClO}}{1 \text{ L NaClO}} \cdot \frac{97 \text{ €}}{1000 \text{ kg NaClO}}$$

La Tabla 21 muestra el coste asociado al tratamiento de cloración para inactivar una unidad logarítmica de *Enterococcus* sp. en agua de salida de depuradora. Se observa que el coste del NaClO necesario para alcanzar una unidad logarítmica de desinfección es muy bajo.

Tabla 21. Coste del tratamiento de cloración para la inactivación de un 1 unidad logarítmica de *Enterococcus* sp.

Tratamiento	Coste estimado
Cloración: 1'3 mg /L Cl ₂ , 5 minutos	0,00097 € / m ³

5.3.2. Tratamientos basados en ozono

Los tratamientos basados en ozono estudiados en este trabajo incluyen la ozonización y el tratamiento peroxona con 1'4 mg/L H₂O₂ y 20 mg/L H₂O₂. En el tratamiento de ozonización se considera únicamente el coste del ozono generado. En el tratamiento peroxona se incluye el coste del peróxido de hidrógeno, con un precio de 0'21 €/kg H₂O₂ al 30% p/v, según la empresa suministradora FCM Foret Zaragoza [Lanao, 2012]. Para calcular el coste del ozono generado se tiene en cuenta el coste de la electricidad (0'1509 €/KWh [www.iberdrola.es]) y el consumo de oxígeno, siendo el caudal de oxígeno en el ozonizador de 50 L/h O₂, con un coste de 0'025 €/kg O₂ [Lucas et al., 2010]. Además, se asume que el ozonizador consume 12 Wh/g O₃ producido [Lucas et al., 2010] y se tiene en cuenta el caudal de ozono generado, 888 mg/h O₃. Se estima el precio del tratamiento para un volumen de muestra de 1 m³. Las expresiones utilizadas para el cálculo del coste del ozono generado y del peróxido de hidrógeno en cada tratamiento son las siguientes:

- Coste del ozono generado:

$$\text{Coste O}_3 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Coste O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) + \text{Coste electricidad} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right)$$

$$\text{Coste O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\text{Tiempo (min)}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{50 \text{ L O}_2}{60 \text{ min}} \cdot \frac{0'0013 \text{ kg O}_2}{1 \text{ L O}_2} \cdot \frac{0'025 \text{ €}}{1 \text{ kg O}_2}$$

$$\text{Coste electricidad} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\text{Tiempo (min)}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{0'888 \text{ g O}_3}{60 \text{ min}} \cdot \frac{12 \text{ Wh}}{1 \text{ g O}_3} \cdot \frac{0'1509 \text{ €}}{1000 \text{ Wh}}$$

- Coste peróxido de hidrógeno:

$$\text{Coste H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Dosis} \left(\frac{\text{mg H}_2\text{O}_2}{1 \text{ L}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L H}_2\text{O}_2}{300000 \text{ mg H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{1'1 \text{ kg H}_2\text{O}_2}{1 \text{ L H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{0'21 \text{ € H}_2\text{O}_2}{1 \text{ kg H}_2\text{O}_2}$$

El tiempo necesario para inactivar una unidad logarítmica bacteriana en los tratamientos basados en ozono se calcula a partir del modelo de Geeraerd, ya que es el modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales observados. La Tabla 22 muestra los tiempos de tratamiento calculados para inactivar un ciclo logarítmico decimal de *Enterococcus* sp. y el coste asociado a cada tratamiento.

Tabla 22. Coste de los tratamientos basados en ozono para la inactivación de un 1 unidad logarítmica de *Enterococcus* sp.

Tratamiento	Tiempo inactivación 1 unidad log. (min)	Coste O ₃ (€/ m ³)	Coste H ₂ O ₂ (€/ m ³)	Coste total (€/ m ³)
Ozonización	5'5	0'29636	-	0'29636
Peroxona 1'4 mg/L H ₂ O ₂	6'1	0'32869	0'00108	0'32977
Peroxona 20 mg/L H ₂ O ₂	5'2	0'28019	0'01540	0'29559

Se observa que el coste de los tres tratamientos basados en ozono es similar y que el coste principal se debe a la generación de ozono, ya que se necesitan tiempos de tratamiento prolongados. Sin embargo, ya sólo el coste del peróxido de hidrógeno es mayor que el del hipoclorito sódico utilizado en la cloración, tratamiento con un coste notablemente inferior que los basados en ozono.

5.3.3. Tratamientos basados en luz UV/visible

De los distintos tratamientos basados en irradiación UV/visible aplicados en el presente trabajo de investigación, el único que consigue alcanzar una inactivación de 1 unidad logarítmica decimal es la fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno, siendo las dosis de 1 g/L TiO₂ y 680 mg/L H₂O₂. Para estimar el coste de este tratamiento se tienen en cuenta los costes relativos a los agentes empleados, TiO₂ y H₂O₂, y los costes asociados a la lámpara y su consumo eléctrico. El precio del dióxido de titanio es de 1'55 €/kg, según la empresa Degussa Ibérica S.A. [Lanao, 2012]. El precio del peróxido de hidrógeno es de 0'21€/kg H₂O₂ al 30% p/v, según la empresa suministradora FCM Foret Zaragoza [Lanao, 2012]. Puesto que a escala real el proceso se realizaría en presencia de luz solar natural, no se tiene en cuenta el coste asociado a la lámpara de xenón empleada ni su consumo eléctrico.

Las expresiones utilizadas para el cálculo del coste del dióxido de titanio y del peróxido de hidrógeno son las siguientes:

- Coste dióxido de titanio:

$$\text{Coste } \text{TiO}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{1 \text{ g } \text{TiO}_2}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1'55 \text{ €}}{1000 \text{ g } \text{TiO}_2}$$

- Coste peróxido de hidrógeno:

$$\text{Coste } \text{H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{680 \text{ mg } \text{H}_2\text{O}_2}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L } \text{H}_2\text{O}_2}{300000 \text{ mg } \text{H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{1'1 \text{ kg } \text{H}_2\text{O}_2}{1 \text{ L } \text{H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{0'21 \text{ € } \text{H}_2\text{O}_2}{1 \text{ kg } \text{H}_2\text{O}_2}$$

El tiempo necesario para inactivar una unidad logarítmica bacteriana en la fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno se calcula a partir del modelo de Mafart, ya que su ajuste a los datos experimentales es bueno y el dato buscado se corresponde con el parámetro δ del modelo. La Tabla 23 muestra el tiempo de tratamiento calculado para inactivar un ciclo logarítmico decimal de *Enterococcus* sp. y el coste asociado al tratamiento.

Tabla 23. Coste del tratamiento de fotocatálisis combinada con H₂O₂ para la inactivación de un 1 unidad logarítmica de *Enterococcus* sp.

Tratamiento	Tiempo inactivación 1 unidad log. (min)	Coste TiO ₂ (€/ m ³)	Coste H ₂ O ₂ (€/ m ³)	Coste total (€/ m ³)
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	16'9	1'5500	0'5236	2'0736

El coste del tratamiento de fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno es notablemente superior al de los tratamientos basados en ozono y al de la cloración, principalmente debido al uso de dióxido de titanio, que tiene un precio elevado. El coste del peróxido de hidrógeno utilizado es también considerable y supera el coste de cualquiera de los tratamientos basados en ozono. Aunque el TiO₂ puede recuperarse [Malato et al., 2009], el coste del tratamiento seguiría siendo elevado y el tiempo de tratamiento mucho más prolongado que en los otros procesos estudiados.

Desde el punto de vista económico, el proceso de cloración resulta el más rentable con diferencia. Sin embargo, presenta el problema de la formación de trihalometanos y otros compuestos organoclorados. En estudios previos del grupo de investigación, la cloración con una dosis equivalente a la demanda de cloro (50 mg/L Cl₂) de un agua residual depurada similar a la del presente trabajo, generó 661 µg/L de THMs, de los cuales 340 µg/L eran de cloroformo [Valero, 2008]. Aunque el RD 1620/2007 sobre la reutilización del agua no regula directamente este parámetro, indica que debe asegurarse el respeto de las normas de calidad ambiental (NCAs) correspondientes. En las aguas superficiales se fija un valor medio anual de 2'5 µg/L para el cloroformo, según el Real Decreto 60/2011, que establece las NCAs para las sustancias prioritarias. Por ello, es muy importante controlar la formación de THMs durante la cloración, reduciendo en lo posible las dosis de cloro y el tiempo de contacto sin perder poder de desinfección. Para conseguir el mismo grado de inactivación bacteriana con un tiempo de tratamiento similar, la ozonización evita el problema de generación de THMs, aunque su coste es notablemente más elevado.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

De los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. en agua de salida de depuradora mediante los distintos tratamientos de desinfección aplicados se concluye que:

- En general, la cloración es el tratamiento más eficaz, ya que permite alcanzar la inactivación completa de los enterococos presentes la muestra. Los tratamientos basados en ozono consiguen también una inactivación elevada con tiempos de tratamiento cortos, mientras que la fotocatálisis/ H_2O_2 no alcanza una desinfección tan eficaz como en los otros procesos, pese a consumir gran cantidad de peróxido de hidrógeno y necesitar tiempos de tratamiento prolongados.
- La cloración, tratamiento de desinfección convencional, resulta un tratamiento muy eficaz. Al aumentar la dosis de cloro en el rango estudiado (3'8-65 mg/L Cl_2) la desinfección es más rápida. Además, para llevar a cabo la desinfección total no es necesario satisfacer la demanda de cloro, pudiéndose aplicar dosis menores de cloro que, prolongando el tiempo de tratamiento, consigan el mismo resultado de desinfección.
- Los tratamientos basados en ozono consiguen un buen grado de inactivación bacteriana, en torno a las 6 unidades logarítmicas, aunque menor que la cloración. Los resultados de los tratamientos peroxona, con dosis de 1'4 mg/L y 20 mg/L H_2O_2 , son similares a los de ozonización, por lo que no se aprecia una clara interacción entre el ozono y el peróxido de hidrógeno con las dosis aplicadas. Las curvas de inactivación de los tres tratamientos basados en ozono presentan una fase inicial de resistencia bacteriana en la cual la desinfección es más lenta, haciendo necesario un elevado consumo de ozono (50-60 mg/L O_3) para conseguir una reducción de la población de enterococos de más de 2 unidades logarítmicas decimales
- Los tratamientos basados en luz UV/visible (320-800 nm) resultan mucho menos eficaces que la cloración o la ozonización. La irradiación, la irradiación combinada con peróxido de hidrógeno y la fotocatálisis no llegan a alcanzar ni una unidad logarítmica de inactivación de *Enterococcus* sp. La fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno permite lograr una inactivación mayor, de hasta 4 unidades logarítmicas, aunque requiere utilizar dosis de H_2O_2 elevadas (680 mg/L) y tiempos de tratamiento prolongados (60 minutos). Por tanto, el aumento de la dosis de peróxido en la fotocatálisis mejora la eficacia del proceso. Además, el consumo de H_2O_2 es mucho mayor en presencia de TiO_2 , indicando la formación de mayor número de radicales desinfectantes y confirmando así la existencia de un efecto sinergístico entre el peróxido de hidrógeno y el dióxido de titanio.

De la modelización cinética de los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. en aguas de salida de depuradora y su comparación con los parámetros de los modelos cinéticos en aguas naturales se concluye que:

- El modelo de Hom modificado y el modelo bifásico describen adecuadamente las curvas de inactivación bacterianas obtenidas en los tratamientos de cloración. Las constantes de velocidad de inactivación aumentan conforme aumenta la dosis de cloro aplicada. Al satisfacer la demanda de cloro de una muestra, independientemente de su matriz, la velocidad de inactivación de *Enterococcus* sp. es similar. Utilizando una dosis de 3'8 mg/L

Cl_2 , demanda de cloro de un agua natural, la desinfección es mucho más rápida en el agua natural que en el agua residual depurada.

- Los valores de los parámetros cinéticos de cada modelo son similares para los tres tratamientos basados en ozono estudiados. Las constantes de velocidad de inactivación son mayores para el agua natural que para el agua de salida de depuradora. En el agua natural las curvas de inactivación presentan forma cóncava, con una rápida inactivación inicial y cola, mientras que en el agua de salida de depuradora las curvas son convexas, con una fase inicial en la que la inactivación transcurre de forma lenta, seguida de un periodo de inactivación lineal y cola, por lo que el modelo de Geeraerd es el que mejor se ajusta a su forma.
- El modelo de Hom y el modelo de Mafart describen adecuadamente la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. del tratamiento de fotocatálisis/ H_2O_2 en agua de salida de depuradora. En general, los valores de los parámetros cinéticos indican que en el agua natural la velocidad de inactivación es algo mayor que en el agua de salida de depuradora; sin embargo, hay que tener en cuenta que la dosis de peróxido empleada en este trabajo ($680 \text{ mg/L H}_2\text{O}_2$) es muy superior que la aplicada en el agua natural ($1'4 \text{ mg/L H}_2\text{O}_2$).
- La fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno presenta constantes de velocidad de inactivación mucho menores que la cloración o la ozonización, haciendo necesario el uso de tiempos de tratamiento más prolongados para alcanzar el mismo nivel de desinfección.
- En general, los parámetros cinéticos de todos los modelos en cada uno de los tratamientos estudiados indican que la velocidad de inactivación de *Enterococcus* sp. es menor en el agua de salida de depuradora que en el agua natural, comprobándose así la influencia de la matriz de agua sobre la inactivación de la población bacteriana de estudio.

Del estudio económico se concluye que, para la inactivación de una unidad logarítmica de *Enterococcus* sp. en agua de salida de depuradora:

- El tratamiento de cloración es el más rentable desde el punto de vista económico, con un coste muy bajo por m^3 de muestra tratada.
- Los tres tratamientos basados en ozono estudiados tienen un coste similar, que es superior al de la cloración, debido principalmente al coste que supone la producción de ozono.
- La fotocatálisis combinada con peróxido de hidrógeno resulta excesivamente cara en comparación con la cloración o la ozonización, ya que el dióxido de titanio y el consumo eléctrico de la lámpara tienen un coste elevado.

Como conclusión final, la cloración es el tratamiento más eficaz y económico para la inactivación de *Enterococcus* sp. en agua de salida de depuradora, aunque la posible generación de compuestos organoclorados podría suponer un problema para su reutilización. La ozonización resulta también muy eficaz y aunque su coste es notablemente superior, evita el problema de la formación de trihalometanos. Para reducir el coste del tratamiento de fotocatálisis/ H_2O_2 sería necesario estudiar la recuperación del TiO_2 y el uso de luz solar natural como fuente de luz. Sin embargo, el elevado consumo de H_2O_2 hace que el coste de este proceso siga siendo mayor que el de la cloración o la ozonización, y no se consigue un grado de inactivación de enterococos tan elevado.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- ❑ Bellamy W.D., Hickman G.T., Mueller P.A., Ziembra N. "Treatment of VOC-contaminated groundwater by hydrogen peroxide and ozone oxidation". Research Journal Water Pollution Control Federation 63, 120-128, 1991.
- ❑ Black & Veatch Corporation. "White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants". Ed. Wiley, Nueva Jersey, 5^a edición, 2010.
- ❑ Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. "Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection". Water Research 38, 1069-1077, 2004.
- ❑ Chong M.N., Jin B., Chow C.W.K., Saint C. "Recent Developments in Photocatalytic Water Treatment Technology: A Review". Water research 44, 2997-3027, 2010.
- ❑ Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W., Greenberg A.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21^a edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.
- ❑ Diao H.F., Li X.Y., Gu J.D., Shi H.C., Xie Z.M. "Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction". Process Biochemistry 39, 1421-1426, 2004.
- ❑ Directiva 82/243/CEE del Consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensoactivos aniónicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L109, de 22 de abril de 1982.
- ❑ Directiva 91/271/CEE de 21 de mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 135, 40-52, 1991.
- ❑ EPA (Environmental Protection Agency). "Guidelines for Water Reuse". Estados Unidos, 2012.
- ❑ Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. "Manual práctico de microbiología". Ed. Masson. Barcelona, 2005.
- ❑ Geeraerd A.H., Herremans C.H., Van Impe J.F. "Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment". International Journal of Food Microbiology 59, 185-209, 2000.
- ❑ Geeraerd A.H., Valdramidis V.P., Van Impe J.F. "GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves". International Journal of Food Microbiology 102, 95-105, 2005.
- ❑ Gehr R., Wagner M., Veerasubramanian P., Payment P. "Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater". Water Research 37, 4573-4586, 2003.
- ❑ Gyurek L.L., Finch G.R. "Modelling water treatment chemical disinfection kinetics". Journal of Environmental Engineering 124, 783-793, 1998.

- Haas C.N., Joffe J. "Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom's model for decay". *Environmental Science and Technology* 28, 1367-1369, 1994.
- Heaselgrave W., Kilvington S. "The efficacy of simulated solar disinfection (SODIS) against *Ascaris*, *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Entamoeba* y *Cryptosporidium*". *Acta Tropica* 119, 138-143, 2011.
- Hom L.W. "Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem". *Journal of Sanitary Engineering Division* 98, 183-193, 1972.
- Huang J.J., Hu H.Y., Tang F., Li Y., Lu S.Q., Lu Y. "Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant". *Water Research* 45, 2775-2781, 2011.
- Ibarz C. "Desactivación de Enterococos en Agua Natural mediante Fotocatálisis con Dióxido de Titanio y Radiación Solar". Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2008.
- Kosaka K., Yamada H., Shishida K., Shinya E., Minear R.A., Tsuno H., Matsui S. "Evaluation of the treatment performance of a multistage ozone/hydrogen peroxide process by decomposition by-products". *Water Research* 35, 3587-3594, 2001.
- Lanao M. "Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación". Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2012.
- Lanao M., Ormad M.P., Mosteo R., Ovellerio J.L. "Inactivation of *Enterococcus* sp. by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂ in natural water". *Solar Energy* 86, 619-625, 2012.
- Lee Y., Nam S. "Reflection on kinetic models to the chlorine disinfection for drinking water production". *The Journal of Microbiology* 40, 119-124, 2002.
- Lucas M.S., Peres J.A., Puma G.L. "Treatment of winery wastewater by ozone-based oxidation processes (O₃, O₃/UV and O₃/UV/H₂O₂) in a pilot-scale bubble column reactor and process economics". *Separation and Purification Technology* 72, 235-241, 2010.
- Lydakis-Simantiris N., Riga D., Katsivela E., Mantzavinos D., Xekoukoulotakis N.P. "Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO₂ photocatalysis". *Desalination* 250, 351-355, 2010.
- Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. "On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model". *International Journal of Food Microbiology* 72, 107-113, 2002.
- Malato S., Fernández P., Maldonado M.I., Blanco J., Gernjak W. "Decontamination and Disinfection of Water by Solar Photocatalysis: Recent Overview and Trends". *Catalysis Today* 147, 1-59, 2009.
- Matilainen A., Sillanpää M. "Removal of Natural Organic Matter from Drinking Water by Advanced Oxidation Processes". *Chemosphere* 80, 351-365, 2010.

- McGuigan K.G., Conroy R.M., Mosler H.J., Preez M., Ubomba-Jaswa E., Fernández-Ibáñez P. "Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top". *Journal of Hazardous Materials* 235-236, 29-46, 2012.
- Medema G.J., Bahar M., Schetss F.M. "Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, *faecal enterococci* and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms". *Water Science and Technology* 35, 249-252, 1997.
- Miguel, N. "Estudio de la eliminación de plaguicidas presentes habitualmente en aguas de la cuenca del Ebro mediante procesos de oxidación avanzada". Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, 2010.
- Mosteo R., Ormad M.P., Goñi P., Rodríguez-Chueca J., García A., Clavel A. "Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): Water reuse possibilities". *Water Science and Technology*. Aceptado a 18 de febrero de 2013.
- Norma UNE-EN ISO 7899-2:2001. Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: método de filtración de membrana.
- Ormad P., Cortés S., Puig A., Ovelleiro J.L. "Degradation of organochloride compounds by O₃ and O₃/H₂O₂". *Water Research* 31, 2387-2391, 1997.
- Parsons S. "Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment". IWA Publishing, Londres, Reino Unido, 2004.
- Pruitt K.M., Kamau D.N. "Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions". *Journal of Industrial Microbiology* 12, 221-231, 1993.
- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *Boletín Oficial del Estado* 294, 50639-50661, 2007.
- Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. *Boletín Oficial del Estado* 19, 6854-6870, 2011.
- Rincón A.G., Pulgarín C. "Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration". *Applied Catalysis B: Environmental* 44, 263-284, 2003.
- Robertson J.M.C., Robertson P.K.J., Lawton L.A. "A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 175, 51-56, 2005.
- Sommer R., Pribil W., Pfleger S., Haider T., Werderitsch M., Gehringer P. "Microbicidal efficacy of an advanced oxidation process using ozone/hydrogen peroxide in water treatment". *Water Science and Technology* 50, 159-164, 2004.
- Spuhler D., Rengifo-Herrera J.A., Pulgarín C. "The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ 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, 126-141, 2010.

-
- ❑ Srinivasan S., Aslan A., Xagorarakis I., Alocilja E., Rose J.B. "Escherichia coli, enterococci, and *Bacteroides thetaiotaomicron* qPCR signals through wastewater and septage treatment". Water Research 45, 2561-2572, 2011.
 - ❑ Tyrrell S.A., Rippey S.R., Watkins W.D. "Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone". Water Research 29, 2483-2490, 1995.
 - ❑ Valero P. "Regeneración de aguas depuradas mediante procesos físico-químicos y desinfección convencional". Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Zaragoza, 2008.
 - ❑ WHO. "WHO Guidelines for the Safe use of wastewater, excreta and greywater". World Health Organization, 2006.
 - ❑ Willey J.M., Serwood L.M., Woolverton C.J. "Microbiología de Prescott, Harley y Klein" McGraw-Hill, Madrid, 2009.
 - ❑ Yuranova T., Enea O., Mielczarski E., Mielczarski J., Albers P., Kiwi J. "Fenton immobilized photo-assisted catalysis through a Fe/C structured fabric". Applied Catalysis B: Environmental 49, 39-50, 2004.

Páginas web consultadas:

- ❑ EPA (Environmental Protection Agency). Water: Monitoring and Assessment, Fecal Bacteria: <http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms511.cfm>
- ❑ Iberdrola. Tarifas y precios electricidad:
https://www.iberdrola.es/webibd/corporativa/iberdrola?IDPAG=ESWEBCLIHOGASEINFLEG_ELE

ANEXOS

ANEXO I. Criterios de calidad del agua reutilizada según sus usos

En las tablas I-VI se recogen los criterios de calidad que ha de cumplir el agua para poder reutilizarse según los usos a los que se destina. Estos requisitos figuran en el Anexo 1.A del Real Decreto 1620/2007.

Tabla I. Criterios de calidad de reutilización de las aguas para usos urbanos

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES ¹	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
1.- USOS URBANOS					
CALIDAD 1.1: RESIDENCIAL ²					
a) Riego de jardines privados. ³	1 huevo/10 L	0 (UFC ⁴ /100 mL)	10 mg/L	2 UNT ⁵	OTROS CONTAMINANTES ⁶ contenidos en la autorización de vertido aguas residuales, se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas ⁸ , deberá asegurarse el respeto de las NCAs. ⁸ <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización)
b) Descarga de aparatos sanitarios. ³					
CALIDAD 1.2: SERVICIOS					
a) Riego de zonas verdes urbanas (parques, campos deportivos y similares). ⁹	1 huevo/10 L	200 UFC/100 mL	20 mg/L	10 UNT	
b) Baldeo de calles. ⁹					
c) Sistemas contra incendios. ⁹					
d) Lavado industrial de vehículos. ⁹					

¹ Considerar en todos los grupos de calidad al menos los géneros: *Ancylostoma*, *Trichuris* y *Ascaris*.

² Deben someterse a controles que aseguren el correcto mantenimiento de las instalaciones.

³ Su autorización estará condicionada a la obligatoriedad de la presencia doble circuito señalizado en todos sus tramos hasta el punto de uso

⁴ Unidades Formadoras de Colonias.

⁵ Unidades Nefelométricas de Turbiedad.

⁶ ver el Anexo II del RD 849/1986, de 11 de abril.

⁷ ver Anexo IV del RD 907/2007, de 6 de julio.

⁸ Norma de calidad ambiental ver el artículo 245.5.a del RD 849/1986, de 11 de abril, modificado por el RD 606/2003 de 23 de mayo.

⁹ Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados

Tabla II. Criterios de calidad de reutilización de las aguas para usos agrícolas (I)

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
2.- USOS AGRÍCOLAS¹					
CALIDAD 2. ²		100 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases ³ con los siguientes valores: n = 10 m = 100 UFC/100 mL M = 1.000 UFC/100 mL c = 3	20 mg/L	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> 1.000 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización) Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/Ausencia (Salmonella, etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=1.000

¹ Características del agua regenerada que requieren información adicional: Conductividad: 3,0 dS/m ; Relación de Adsorción de Sodio (RAS): 6 meq/L; Boro: 0,5 mg/L; Arsénico: 0,1 mg/L; Berilio: 0,1 mg/L; Cadmio: 0,01 mg/L; Cobalto: 0,05 mg/L; Cromo: 0,1 mg/L; Cobre: 0,2 mg/L; Molibdeno: 0,2 mg/L; Manganeso: 0,2 mg/L; Niquel: 0,2 mg/L; Selenio : 0,02 mg/L; Vanadio: 0,1 mg/L.. Para el cálculo de RAS se utilizará la fórmula:

$$RAS(\text{meq/L}) = \frac{[\text{Na}]}{\sqrt{\frac{[\text{Ca} + \text{Mg}]}{2}}}$$

² Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados

³ Siendo n: n° de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra o/o número de bacterias se sitúa entre m y M.

Tabla III. Criterios de calidad de reutilización de las aguas para usos agrícolas (II)

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
CALIDAD 2.2 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.		1.000 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases con los siguientes valores: n = 10 m = 1.000 UFC/100 mL M = 10.000 UFC/100 mL c = 3	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i> : 1 huevo/L (si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne) Es obligatorio llevar a cabo detección de patógenos Presencia/Ausencia (<i>Salmonella</i> , etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10.000
CALIDAD 2.3 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 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	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L

¹ Siendo n: nº de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

Tabla IV. Criterios de calidad de reutilización de las aguas para usos industriales

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
3.- USOS INDUSTRIALES					
CALIDAD 3.1 ¹					
a) Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria.	No se fija límite	10.000 UFC/100 mL	35 mg/L	15 UNT	Otros contaminantes contenidos en la autorización de vertido aguas residuales; se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs <i>Legionella</i> spp.: 100 UFC/L
b) Otros usos industriales.		1.000 UFC/100 mL			Otros contaminantes contenidos en la autorización de vertido aguas residuales; se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella</i> spp.: 100 UFC/L Es obligatorio llevar a cabo detección de patógenos Presencia/Ausencia (<i>Salmonella</i> , etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=10.000
c) Aguas de proceso y limpieza para uso en la industria alimentaria	1 huevo/10 L	Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases con los siguientes valores: n = 10 m = 1.000 UFC/100 mL M = 10.000 UFC/100 mL c = 3	35 mg/L	No se fija límite	
CALIDAD 3.2					Para su autorización se requerirá:
a) Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.	1 huevo/10 L	Ausencia UFC/100 mL	5 mg/L	1 UNT	- La aprobación, por la autoridad sanitaria, del Programa específico de control de las instalaciones contemplado en el Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénicosanitarios para la prevención y control de la legionelosis. - Uso exclusivamente industrial y en localizaciones que no estén ubicadas en zonas urbanas ni cerca de lugares con actividad pública o comercial.

¹ Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados

² Siendo n: nº de unidades de la muestra; m: valor límite admisible para el recuento de bacterias; M: valor máximo permitido para el recuento de bacterias; c: número máximo de unidades de muestra cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

Tabla V. Criterios de calidad de reutilización de las aguas para usos recreativos

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
4.- USOS RECREATIVOS					
CALIDAD 4.1 ¹					OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs.
a) Riego de campos de golf.	1 huevo/10 L	200 UFC/100 mL	20 ng/L	10 UNT	Si el riego se aplica directamente a la zona del suelo (goteo, microaspersión) se fijan los criterios del grupo de Calidad 2.3 <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización)
CALIDAD 4.2					OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. P_T : 2 mg P/L (en agua estancada)
a) Estanques, masas de agua y caudales circulantes ornamentales, en los que está impedido el acceso del público al agua.	No se fija límite	10.000 UFC/100 mL	35 ng/L	No se fija límite	

¹ Cuando exista un uso con posibilidad de aerosolización del agua, es imprescindible seguir las condiciones de uso que señale, para cada caso, la autoridad sanitaria, sin las cuales, esos usos no serán autorizados

Tabla VI. Criterios de calidad de reutilización de las aguas para usos ambientales

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				
	NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
5.- USOS AMBIENTALES					
CALIDAD 5.1 a) Recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno.	No se fija límite	1.000 UFC/100 mL	35 mg/L	No se fija límite	N_T^1 : 10 mg N/L NO_3^- : 25 mg NO ₃ /L
CALIDAD 5.2 a) Recarga de acuíferos por inyección directa.	1 huevo/10 L	0 UFC/100 mL	10 mg/L	2 UNT	Art. 257 a 259 del RD 849/1986
CALIDAD 5.3 a) Riego de bosques, zonas verdes y de otro tipo no accesibles al público. b) Silvicultura.	No se fija límite	No se fija límite	35 mg/L	No se fija límite	OTROS CONTAMINANTES contenidos en la autorización de vertido aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs.
CALIDAD 5.4 a) Otros usos ambientales (mantenimiento de humedales, caudales mínimos y similares).					La calidad mínima requerida se estudiará caso por caso

¹ Nitrógeno total, suma del nitrógeno inorgánico y orgánico presente en la muestra

ANEXO II. Terminología microbiológica

- **Bacteria:** organismo unicelular procariota con membranas formadas principalmente por diésteres de diacilglicerol y con rRNA bacteriano. Las bacterias pueden presentarse principalmente en forma de cocos o de bacilos. Los cocos son células más o menos esféricas que aparecen como células individuales o asociados en agrupaciones. Los bacilos son células con forma de bastón que suelen presentarse individualmente, aunque algunos permanecen juntos tras su división formando parejas o cadenas. Además, la mayoría de las bacterias se pueden dividir en dos grupos principales de acuerdo con su respuesta a la tinción de Gram: bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas. La pared grampositiva consiste en una única capa homogénea, de 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglicano situada externamente a la membrana plasmática. En cambio, la pared gramnegativa contiene una capa de peptidoglicano de 2 a 7 nm cubierta por una membrana externa de 7 a 8 nm de grosor. Puesto que su pared de peptidoglicano es más gruesa, las paredes de las células grampositivas son más resistentes a la presión osmótica que las gramnegativas.
- ***Clostridium perfringens:*** bacilo grampositivo, anaerobio, inmóvil y formador de esporas. Es la especie más habitual en aguas dentro del grupo de las bacterias anaerobias sulfito-reductoras. Su origen no es exclusivamente fecal, ya que pueden encontrarse en múltiples lugares como suelo, polvo, sedimento marino, etc. Sus esporos sobreviven en el agua mucho más tiempo que los coliformes y pueden ser resistentes a los tratamientos de desinfección si no se realizan de manera adecuada. Es patógeno para los animales y para el hombre.
- ***Enterococcus sp.:*** denominados también como enterococos intestinales, este género presenta células esféricas u ovoides (cocos) en parejas o cadenas cortas, no esporuladas, a veces inmóviles, con un tamaño de 0'6 a 2'5 µm. Son bacterias anaerobias facultativas, grampositivas, quimioheterótrofas, y mesófilas, que fermentan los hidratos de carbono a lactato sin producción de gas. Algunos enterococos, como *Enterococcus faecalis*, son patógenos para el hombre.
- ***Escherichia coli:*** bacteria aerobia gramnegativa con forma de bacilo con un tamaño de 1'1 a 6 µm. Reside en el colon de los seres humanos y de otros animales de sangre caliente. Suele utilizarse en el análisis de aguas para determinar si existe contaminación fecal. Algunas cepas producen gastroenteritis o infecciones de las vías urinarias.
- **Espora o esporo:** forma diferenciada y especializada que puede utilizarse para la diseminación, la supervivencia en condiciones adversas (gracias a su resistencia al calor y a la deshidratación) y/o la reproducción. Las esporas suelen ser unicelulares y pueden desarrollarse en organismos vegetativos o gametos. Pueden reproducirse sexual o asexualmente y pueden ser de varios tipos.
- **Esporulación:** proceso de formación de esporas.
- **Helminto:** los helmintos o gusanos son animales multicelulares, en los cuales se distinguen células diversas formando órganos con funciones especiales.
- **Lisis:** rotura o desintegración física de una célula.

- **Mesófilo:** Organismo que tiene una temperatura óptima de crecimiento de entre 20 y 42°C.
- **Protozoo:** organismo eucariota unicelular o acelular cuyos orgánulos presentan un papel funcional de órganos y tejidos de forma compleja. Los protozoos varían mucho en tamaño, morfología, nutrición y ciclo vital.
- **Pseudomonas aeruginosa:** bacteria con forma de bacilos rectos o ligeramente curvados, con medidas de 0'5 a 5 µm, que se desplazan mediante uno o varios flagelos polares. Son bacterias quimioheterótrofas, gramnegativas, que generalmente realizan una respiración aerobia. Algunas pseudomonas como *P. aeruginosa*, son patógenos muy importantes de animales y plantas, infectando a personas bajas de defensas, invadiendo zonas de quemaduras o produciendo infecciones de las vías urinarias.
- **Quimioheterótrofo:** microorganismo que utiliza compuestos orgánicos como fuente de energía, electrones, y carbono para la biosíntesis.
- **Staphylococcus aureus:** bacteria anaerobia facultativa, grampositiva , que presenta células esféricas u ovoides en parejas o cadenas, inmóviles y no esporuladas, con un tamaño de 0'5 a 2 µm. *S. aureus* es el estafilococo patógeno más importante en el ser humano y causa furúnculos, abscesos, infecciones de heridas, neumonía y otras enfermedades.
- **Virus:** agente infeccioso que tiene una organización acelular simple con una envoltura proteica y un genoma de ácidos nucleicos. No posee metabolismo independiente y se reproduce únicamente en el interior de células vivas.

Bibliografía

-  Willey J.M., Serwood L.M., Woolverton C.J. "Microbiología de Prescott, Harley y Klein" McGraw-Hill, Madrid, 2009.

ANEXO III. Desarrollo de la metodología analítica físico-química

III.I. pH

El pH es la medida del grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa y se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones H^+ . Para determinar el pH de las muestras acuosas se utiliza un pH-metro marca CRISON, modelo GLP 21, previamente calibrado con disoluciones tampón de pH 7'00 y 4'01. El método utilizado es el 4500-HB del Standard Methods [Clesceri et al., 2005].

III.II. Turbidez

La turbidez se define como la reducción de la transparencia de un líquido originada por la presencia de materias sin disolver. Para medir la turbidez se utiliza un turbidímetro marca *HANNA Instruments* modelo *LP 2000*, de acuerdo a la norma ISO 7027:1999. Los turbidímetros constan de una fuente de luz para iluminar la muestra y detectores fotoeléctricos que miden la intensidad de la luz dispersada a 90° respecto a la fuente. El procedimiento consiste en medir la intensidad de la radiación dispersada por la muestra a una determinada longitud de onda y compararla con la de la disolución patrón. Los resultados se expresan en unidades nefelométricas de turbidez: UNT.

III.III. Conductividad

La conductividad es la expresión numérica de la capacidad de un agua para transportar la corriente eléctrica. Indica la concentración total de iones en el agua. Su determinación se realiza utilizando un conductímetro *CRISON* modelo *Basic 30*, provisto de una célula de dos electrodos (constante de la célula 1 cm^{-1}) y de acuerdo a la norma UNE-EN ISO 27888:1994. Para conocer la conductividad de una muestra se introduce la célula en ella, se agita y se espera unos minutos antes de tomar el valor. Los resultados se expresan en mS/cm o en $\mu\text{S}/\text{cm}$, según el rango de trabajo.

III.IV. Sólidos en suspensión totales (SST)

Los sólidos en suspensión totales se analizan mediante un espectrofotómetro de marca *Hach Lange*, modelo *DR 2800*. Se emplea el método 2540D de Standard Methods [Clesceri et al., 2005]. Los sólidos en suspensión totales se miden a 810nm.

III.V. Carbono orgánico total (COT)

La medida del Carbono Orgánico Total (COT) sirve para cuantificar la materia orgánica presente en el agua. Se mide de acuerdo al método 5310B del Standard Methods [Clesceri et al., 2005]. Para ello se utiliza un equipo SHIMADZU, modelo TOC-V_{CSH} (Figura I).



Figura I. Analizador de Carbono Orgánico Total SHIMADZU, modelo TOC-VCSH

Fundamento del equipo

En el agua están presentes dos tipos de carbono: carbono orgánico y carbono inorgánico. El carbono orgánico (COT) corresponde a los compuestos orgánicos, mientras que el carbono inorgánico (CI) se encuentra disuelto en el agua como CO_2 , o bien en forma de compuestos inorgánicos tales como los carbonatos y bicarbonatos. Conjuntamente, ambos tipos de carbonos constituyen el carbono total, CT, y por lo tanto cumplen la relación: $\text{COT}=\text{CT}-\text{CI}$. El equipo utilizado se basa en esta relación para medir el COT.

Material y reactivos

- Equipo SHIMADZU, modelo TOC-VCSH.
- Viales de 50 ml
- Unidad de filtración de plástico de 250 ml.
- Filtros de 0'45 μm de diámetro de poro.
- Ácido fosfórico.
- Ácido clorhídrico.
- Agua milli-Q.

Procedimiento y cálculo

Se filtra el agua a analizar utilizando un filtro de 0'45 μm para no obstruir la aguja de inyección de la muestra en el equipo. Una vez filtrada la muestra se introduce en los viales y se programa el equipo con las rectas de calibrado que mejor se ajusten, según los valores esperados de COT.

Validación del método

La validación del método para la medición de carbono orgánico total (COT) y las rectas de calibrado utilizadas se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII. Validación de la metodología para la medición de COT.

	Límite de detección	Límite de cuantificación	Rango de medida	Rectas de calibrado
Carbono total	1 mg/L	3 mg/L	0-25000 mg/L	0-100 mg/L
Carbono inorgánico	1 mg/L	2 mg/L	0-30000 mg/L	0-100 mg/L

III.VI. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO es la cantidad de oxígeno consumido por las especies reductoras presentes en el agua. Este parámetro se determina mediante una adaptación del Método 410.4 EPA, en un fotómetro multiparámetro marca *Hanna Instruments*, modelo *HI 83099*.

Este método se basa en que los compuestos orgánicos oxidables reducen el ión dicromato (naranja) a ión cromo (III) (verde). Se determina la cantidad de cromo formada, utilizando para ello una lámpara de tungsteno con filtro de interferencia de banda estrecha a 420 nm.

III.VII. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La concentración de peróxidos se determina semicuantitativamente por comparación colorimétrica mediante un test indicador de peróxidos marca Merckoquant®. La peroxidasa transfiere el oxígeno del peróxido a un indicador redox orgánico, formándose un producto de oxidación azul (0-100mg/l) o amarillo (100-1000mg/l). La zona de reacción de la tira de ensayo se compara visualmente con una escala colorimétrica.

III.VIII. Nitrógeno amoniacial (N-NH_3)

La determinación del nitrógeno amoniacial se lleva a cabo mediante un fotómetro multiparamétrico de sobremesa, marca Hanna Instruments, modelo HI 83099. El método empleado es una adaptación del Método Nessler de *ASTM Manual of Water and Environmental Technology*, D1426-92.

La reacción entre el amoniaco y los reactivos origina una coloración amarilla en la muestra. Para su medición se utiliza una lámpara de Tungsteno con filtro de interferencia de banda estrecha a 420 nm.

III.IX. Cloro libre

La determinación del cloro libre se realiza mediante un fotómetro multiparamétrico de sobremesa, marca Hanna Instruments, modelo HI 83099. El método empleado es una adaptación del método DPD 330.5 de la EPA.

La reacción entre el cloro libre y el reactivo DPD origina una coloración rosa en la muestra que se mide utilizando una lámpara de Tungsteno con filtro de interferencia de banda estrecha a 525 nm.

III.X. Demanda de cloro

La demanda de cloro (CD) se define como la cantidad mínima de cloro que se necesita añadir a la muestra para satisfacer el consumo de desinfección y oxidación de los compuestos presentes. Para determinar este parámetro se utiliza el método estándar 5710 B [Clesceri et al., 2005].

El método consiste en adicionar un exceso de cloro (D_0) a la muestra y analizar el cloro residual (R) no consumido después de un mínimo de 4 horas, siendo la demanda de cloro (CD) la diferencia de ambos valores en mg/L, como indica la ecuación I:

$$CD = D_0 - R \quad [I]$$

Para determinar D_0 se añaden 5 mL de hipoclorito sódico comercial de 50.000 mg/L Cl_2 diluido al 10%, en un frasco de 350 mL con tapón de vidrio y se completa hasta rebose con agua destilada. Del contenido de este frasco se valoran 100 mL en un erlenmeyer con tiosulfato sódico 0,025 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99%, Panreac), incluyendo en el contenido 5 mL de ácido acético (99'8%, Panreac), 1 g de yoduro potásico (99%, Panreac) y 2 mL de almidón (Scharlau) como indicador hasta la desaparición del color. La dosis de cloro exacta suministrada a la muestra se calcula según la ecuación II, donde V_v es el volumen del agente valorante (tiosulfato sódico) consumido en la valoración, N es la normalidad del mismo (0,025 N) y V_m es el volumen de muestra valorado (100 mL).

$$D_0(\text{mg/L } \text{Cl}_2) = V_v \cdot N \cdot 35'5 \cdot 1000/V_m \quad [II]$$

De manera similar, para calcular R, en un frasco de las mismas características se añaden 5 mL de hipoclorito sódico comercial diluido al 10% y 5 mL de tampón fosfato (68,1 g KH_2PO_4 y 11,7 g NaOH en 1L de agua destilada), completando el volumen con la muestra objeto de análisis. Se almacena durante mínimo 4 horas a temperatura ambiente en oscuridad con el tapón sellado herméticamente para evitar pérdidas de cloro por volatilidad. Trascurrido ese tiempo, en el cual el cloro reacciona con la materia orgánica y los microorganismos presentes en la muestra, se mide el cloro residual, R, (ecuación III).

$$R(\text{mg/L } \text{Cl}_2) = V_v \cdot N \cdot 35'5 \cdot 1000/V_m \quad [III]$$

La concentración del reactivo de cloración utilizado (R_c) se calcula según la ecuación IV:

$$R_c(\text{mg/L } \text{Cl}_2) = D_0 \cdot 350/5 \quad [IV]$$

Bibliografía

-  Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W., Greenberg A.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21^a edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.

ANEXO IV. Metodología microbiológica

IV.I. Procedimiento experimental de fortificación de muestras con *Enterococcus sp.*

La cepa de *Enterococcus sp.* utilizada proviene del stock del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas. Al estar ya identificada y haber sido utilizada en otros estudios previos [Ibarz, 2008], no se considera necesario realizar ninguna prueba bioquímica de confirmación, salvo la tinción de Gram, que se explica en el apartado IV.II del presente anexo.

La fortificación de las muestras de agua de salida de depuradora se realiza a partir de un vial congelado a -20 °C. Tras descongelarse, se toma un inóculo con el asa de siembra y se realiza un aislamiento en superficie por agotamiento (Figura II) en agar nutritivo (Tabla VIII), incubándose las placas a 37 °C durante 48 horas en aerobiosis con el fin de disponer de un cultivo bacteriano joven y abundante.

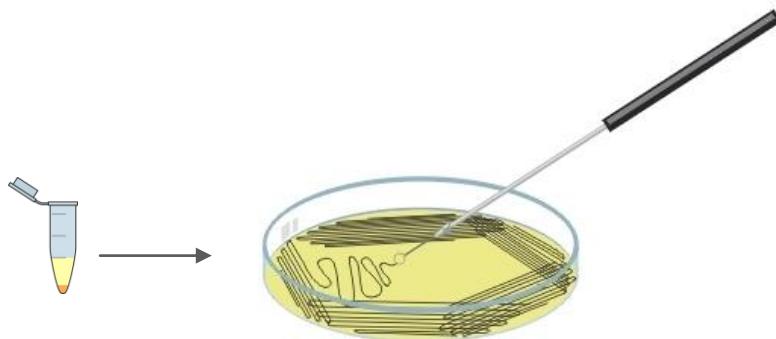


Figura II. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento

Tabla VIII. Composición del agar nutritivo

Ingredientes	Concentración (g/L)
Peptona (proteína parcialmente digerida)	5'0
Extracto de carne	1'0
Extracto de levadura	2'0
Cloruro de sodio	8'0
Agar	15'0

El agar nutritivo no es un tipo de agar selectivo, por lo que en él puede crecer cualquier tipo de bacterias. Es importante observar las colonias crecidas tras la incubación para ver si el cultivo es homogéneo. Las colonias de *Enterococcus sp.* en este agar son de color crema, redondas, con límite definido (Figura III).

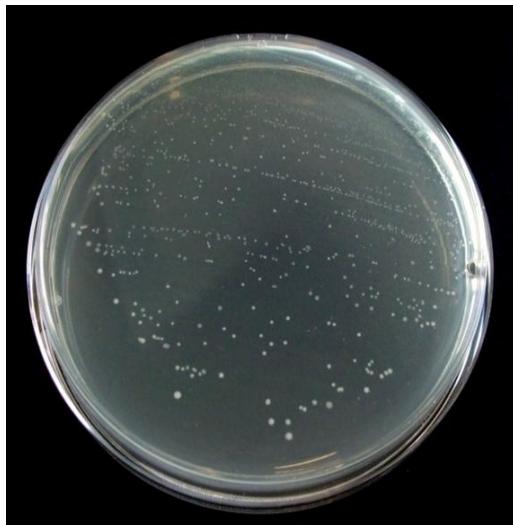


Figura III. Colonias de *Enterococcus* sp. en agar nutritivo

Tras el periodo de incubación, se prepara una suspensión bacteriana concentrada transfiriendo las colonias a un tubo con suero fisiológico esterilizado (NaCl 0'9%). El número de colonias presentes en el inóculo se calcula en relación a la turbidez que presenta esta suspensión. Una vez alcanzada la turbidez deseada, se adiciona la suspensión de *Enterococcus* sp. a la muestra esterilizada, consigiéndose una concentración bacteriana en torno a 10^7 - 10^8 UFC/100 mL. Hay que tener en cuenta que las poblaciones bacterianas iniciales para cada uno de los experimentos realizados no van a ser exactamente las mismas debido a la propia dificultad de preparación y calibración de la suspensión celular concentrada.

IV.II. Tinción de Gram

Desarrollada en 1884 por el médico danés Christian Gram, es el método de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología. Es un ejemplo de tinción diferencial, procedimiento que se utiliza para diferenciar organismos en base a sus características de tinción. La tinción de Gram divide las bacterias en dos clases: gramnegativas y grampositivas.

La pared grampositiva consiste en una única capa homogénea, de 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglicano (mureína), un enorme polímero formado por muchas subunidades idénticas, que se sitúa externamente a la membrana plasmática. En cambio, la pared gramnegativa es bastante compleja, contiene una capa de peptidoglicano de 2 a 7 nm cubierta por una membrana externa de 7 a 8 nm de grosor. Puesto que su pared de peptidoglicano es más gruesa, las paredes de las células grampositivas son más resistentes a la presión osmótica que las bacterias gramnegativas [Willey et al., 2009].

El procedimiento de la tinción de Gram se muestra en la Figura IV. Previamente, se realiza un frotis de la colonia que se quiere estudiar en un portaobjetos. Cuando la muestra está seca, se procede a la tinción. En el primer paso, el frotis se tiñe con el colorante básico cristal de violeta, el colorante primario. Tras un minuto de contacto, se lava el porta con agua destilada y se añade el segundo colorante, el lugol. Éste intensifica la interacción entre la célula y el colorante de manera que la célula se tiñe más intensamente. Tras otro minuto de contacto se decolora el frotis lavándolo con acetona o etanol. Este paso produce el aspecto diferencial de la tinción de Gram; las bacterias grampositivas retienen el cristal violeta, mientras que las

bacterias gramnegativas lo pierden y aparecen incoloras. Finalmente, el frotis se tiñe de nuevo (tinción de contraste) con un colorante básico, simple, de un color diferente al del cristal violeta. La safranina, el colorante de contraste más común, tiñe las bacterias gramnegativas de rosa a rojo, dejando a las bacterias grampositivas de color morado oscuro.

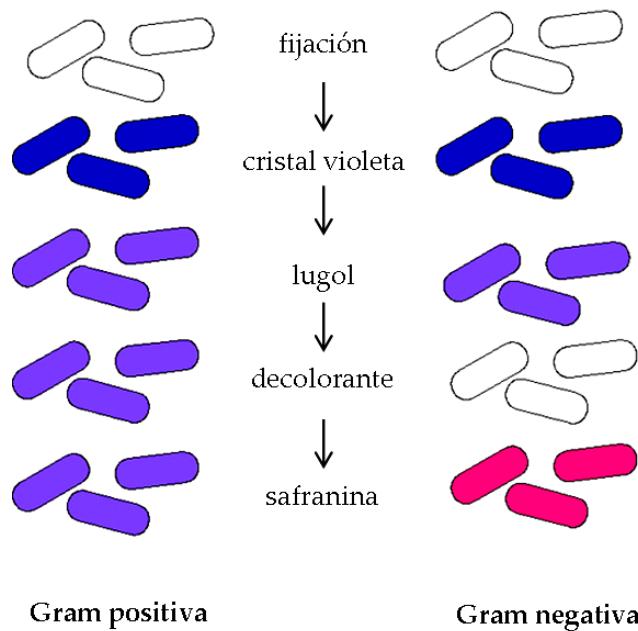


Figura IV. Método de la tinción de Gram

Los enterococos son bacterias grampositivas, por lo que al realizar la tinción de Gram, se tiñen de color morado oscuro. La Figura V muestra la imagen de los enterococos utilizados en el presente trabajo de investigación, observados al microscopio óptico tras la tinción de Gram.

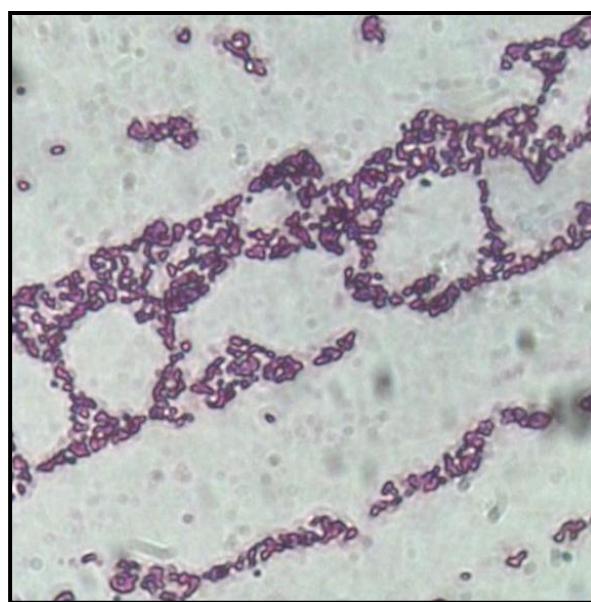


Figura V. Tinción de Gram de *Enterococcus* (grampositivo: color morado oscuro) observados al microscopio óptico

IV.III. Análisis de *Enterococcus* sp.

IV.III.i. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son ambientes artificiales diseñados por el hombre para proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano en el laboratorio. En esta investigación se han utilizado medios sólidos, que se encuentran en forma de polvo fino o granular. Para su reconstitución, se suspende la cantidad precisa de polvo en agua destilada y se lleva a ebullición. Posteriormente, se esteriliza durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C en el autoclave.

Para el análisis de *Enterococcus* sp. se utiliza el agar selectivo Slanetz & Bartley (Scharlau), cuya composición se muestra en la Tabla IX. La preparación de este agar conlleva, después de su esterilización y enfriamiento a 50 °C, la adición de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% (Scharlau) en una proporción de 10 mL por cada litro de medio base. La solución TTC se utiliza como indicador de color. Esta solución indica la actividad biológica de los enterococos, ya que el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (incoloro) se reduce a trifenilformazán (rojo), de manera que las colonias adquieren un color granate característico.

Tabla IX. Composición del agar Slanetz & Barley

Ingredientes	Concentración (g/L)
Triptosa	20'0
Extracto de levadura	5'0
Dextrosa	2'0
Hidrogenofosfato de potasio	4'0
Azida de sodio (NaN_3)	0'4
Agar	10

IV.III.ii. Diluciones decimales seriadas

El volumen de agua a analizar depende de la concentración bacteriana de la muestra. Puesto que no se conoce de antemano la concentración microbiológica presente en la muestra de agua a analizar, se realizan diluciones de la muestra inicial.

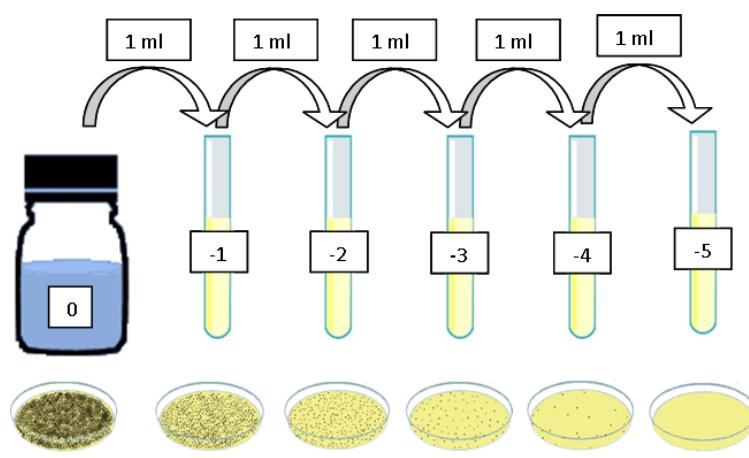


Figura VI. Esquema del método de diluciones seriadas.

A partir del agua de salida de depuradora (dilución 0), se toma 1 mL de la muestra con micropipeta y se transfiere a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0'9 % NaCl, estéril. A continuación, se homogeneiza en un vortex, obteniéndose de esta forma la dilución 1:10 (o dilución -1). Para hacer las diluciones sucesivas, se toma 1 mL de la dilución precedente bien homogeneizada y se lleva a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9% NaCl, todo ello en ambiente de trabajo estéril, proporcionado con un mechero Bunsen. La Figura VI refleja el procedimiento de diluciones decimales seriadas de manera gráfica y la Figura VII el aspecto de las placas de Petri después de la siembra de dichas diluciones.

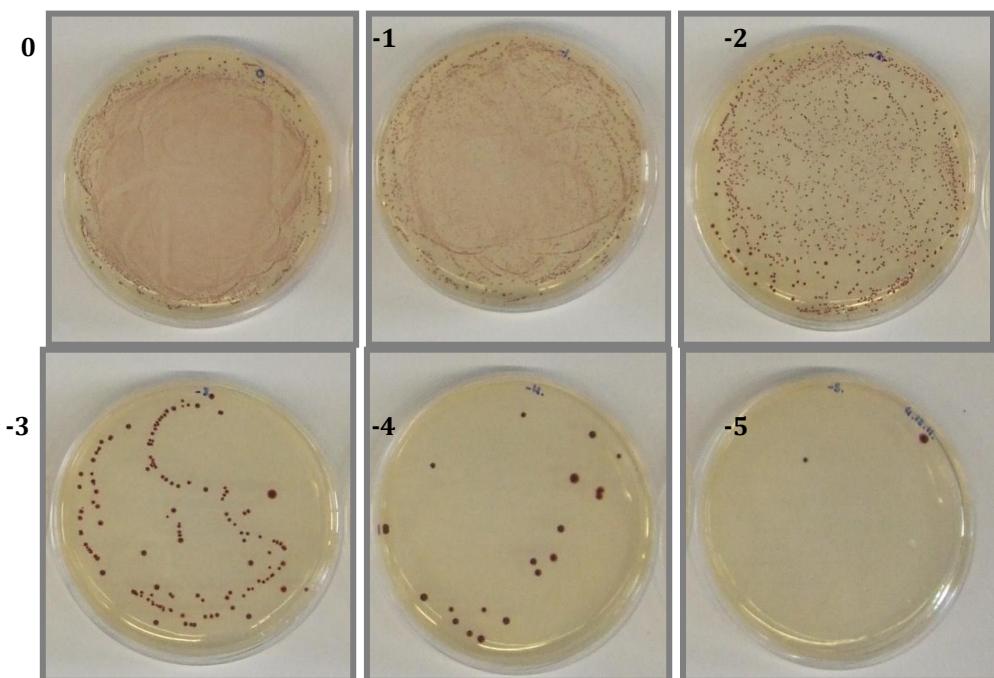


Figura VII. Aspecto de las placas de Petri después de la siembra en superficie de las diluciones decimales de una muestra de agua (de la más concentrada 0 a la más diluida -5).

IV.III.iii. Métodos de siembra

Método de siembra en superficie

Mediante una pipeta automática se coloca un pequeño volumen conocido de muestra (100 µL) en el centro de una placa de medio sólido. Con ayuda de una varilla de vidrio estéril se extiende la muestra uniformemente por la superficie del agar. Este método se utiliza cuando la concentración bacteriana es elevada.

Método de filtración de membrana

En presencia de una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, mediante pinzas previamente flameadas, se coloca un filtro de membrana estéril (Millipore) de 0'45 µm de poro sobre el soporte de filtración (Figura VIII.a). Tras adaptar el embudo (Figura VIII.b), se humedece el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada al 0,9% NaCl estéril y se vierte la muestra, previamente homogeneizada (Figura VIII.c). Las muestras comprendidas entre 30 y 100 mL se añaden directamente al embudo de filtración, pero para las muestras entre 1 y 30 mL, se añaden primero al embudo entre 20-30 mL de agua destilada al 0,9% NaCl estéril y a continuación, la muestra a filtrar.

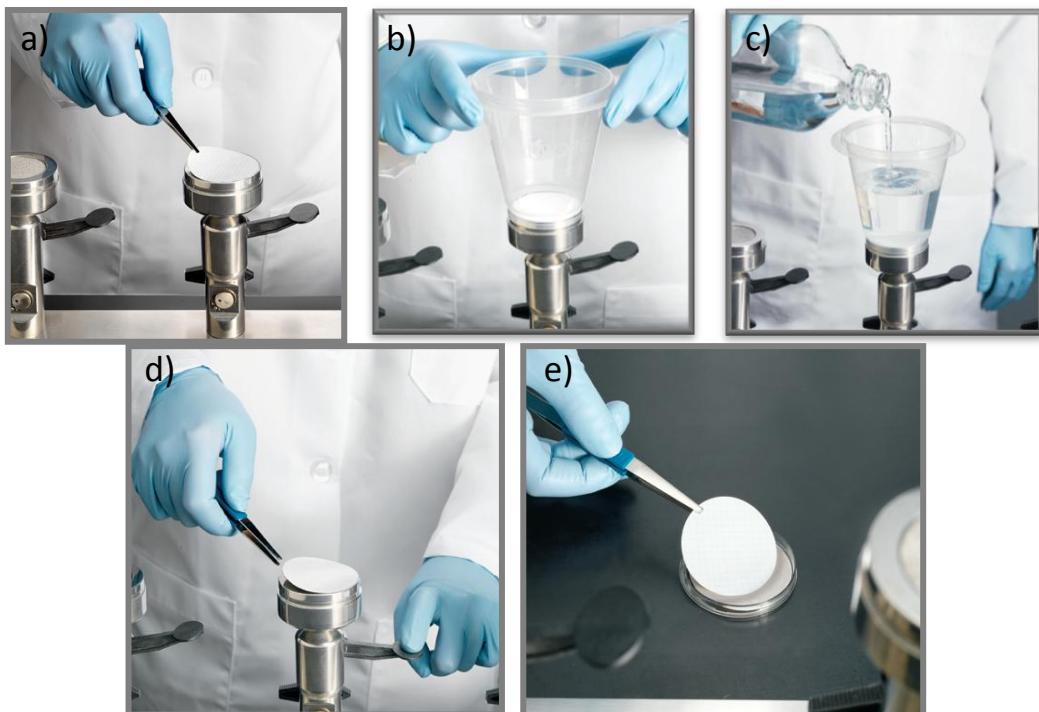


Figura VIII. Método de filtración por membrana (*Millipore*).

Finalmente, se retira el embudo y la membrana se coloca sobre el agar solidificado en una placa de Petri pequeña (45 cm Ø) (Figura VIII.d y VIII.e), cuidando que no quede ninguna burbuja debajo del filtro. Este método se utiliza cuando la concentración de bacterias en la muestra no es muy elevada.

IV.III.iv. Repetibilidad del método de análisis de *Enterococcus sp.*

Para validar el método de análisis de siembra en superficie utilizado para determinar la supervivencia de las poblaciones de *Enterococcus* sp. en los tratamientos estudiados, se determina el coeficiente de variación.

El coeficiente de variación (CV) representa la reproducibilidad del método, es decir, el grado de concordancia entre diferentes medidas realizadas en las mismas condiciones. Se expresa en porcentaje mediante la ecuación V, siendo \bar{X} el recuento medio de las colonias en las placas contadas, calculado por la ecuación VI, y S la desviación estándar de las muestras, una medida de la dispersión de los datos, expresada según la ecuación VII, donde N es el número de réplicas de un ensayo y X_i el valor de una réplica determinada [D'Ocon, 2002; Ibarz, 2008].

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad [V]$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N} \quad [VI]$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N-1}} \quad [VII]$$

El coeficiente de variación del método de filtración de membrana sobre *Enterococcus* sp. fue calculado por Ibarz (2008), estableciendo un CV entre el 3-10 %. En el presente trabajo de investigación se ha calculado el CV para el método de siembra en superficie.

Para obtener la desviación estándar de las muestras y el valor medio del recuento de las placas, se analizan ocho réplicas mediante siembra en superficie de una muestra fortificada diluida (1/1000), previamente conocida la concentración de bacterias. Para poder contar las placas el intervalo de colonias ha de estar entre 30 y 300 UFC/placa. Por debajo de ese límite inferior, el error es elevado y hay peligro de dar resultados que no se ajusten a la realidad. Por encima del límite superior, las colonias presentan problemas de fusión.

La concentración de enterococos en la muestra se calcula mediante la ecuación 4.1 y el resultado se transforma en unidades logarítmicas. Los valores en UFC/mL se distribuyen dando curvas asimétricas [Clesceri et al., 2005]. Sin embargo, si esos valores se transforman en logaritmos, los nuevos valores se aproximan a una distribución simétrica, normal. Como los resultados de inactivación se expresan en unidades logarítmicas, tal y como se explica en el apartado 4.1.2 de la memoria, el CV también se calcula en esas mismas unidades.

La Tabla X refleja los resultados obtenidos. El CV calculado en el presente trabajo de investigación para el método de siembra en superficie de *Enterococcus* sp. de 1'6%.

Tabla X. Coeficiente de variación del método de siembra en superficie para Enterococcus sp.

Muestra	Dilución 1/1000	
	100 µL	Log
1	$2'1 \cdot 10^8$	8,3
2	$2'4 \cdot 10^8$	8,4
3	$2'1 \cdot 10^8$	8,3
4	$1'0 \cdot 10^8$	8,0
5	$1'3 \cdot 10^8$	8,1
6	$1'4 \cdot 10^8$	8,1
7	$1'3 \cdot 10^8$	8,1
8	$1'6 \cdot 10^8$	8,2
\bar{X}		8,2
S		0,1
CV (%)		1,6

Bibliografía

- BOOK Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W., Greenberg A.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21^a edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.
- BOOK D'Ocon M.C., García M.J., Vicente-García V. "Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico: análisis de muestras biológicas". Ed. Paraninfo. Madrid, 2002.
- BOOK Ibarz C. "Desactivación de Enterococos en Agua Natural mediante Fotocatálisis con Dióxido de Titanio y Radiación Solar". Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2008.
- BOOK Willey J.M., Serwood L.M., Woolverton C.J. "Microbiología de Prescott, Harley y Klein" McGraw-Hill, Madrid, 2009.

ANEXO V. Tratamientos basados en ozono

V.I. Descripción detallada de la instalación de ozonización

El oxígeno se aporta desde una botella de gas comprimido conectada directamente al ozonizador. La generación de ozono aumenta con el caudal de oxígeno introducido, por lo que se regula el flujo mediante una válvula situada en el frontal del equipo. Entre la botella de gas y el ozonizador, se coloca un lecho de sílica gel que debido a sus propiedades higroscópicas elimina la humedad de la corriente de O₂ antes de entrar en el ozonizador, ya que el gas de entrada siempre debe estar seco. El ozonizador se conecta a un reactor cerrado de vidrio que funciona en régimen semicontinuo, continuo respecto al gas y discontinuo respecto al líquido. Este reactor es de vidrio Pyrex con forma esférica y una capacidad de 2 L. El ozono gas se trasfiere a la muestra por la parte superior del reactor a través de un difusor poroso (O₃ introducido). La transferencia del ozono al agua produce un burbujeo que proporciona agitación a la muestra, favoreciendo el contacto ozono-agua.

V.II. Calibración del ozonizador

Para conocer la cantidad de ozono que se introduce en la muestra, se realizan una serie de ensayos a diferentes tiempos, determinándose en cada caso la cantidad de ozono que se genera. Para ello se conectan dos borboteadores en serie directamente a la salida del ozonizador contenido cada uno 250 mL de KI (Panreac) al 2%. Durante un tiempo fijado, se hace pasar por el ozonizador un caudal de oxígeno de 50 L/h, utilizando una potencia de ozonización de 1'5 W y aplicando una presión de oxígeno de 1 bar.

V.II.i. Método yodométrico

La cantidad de ozono presente en los borboteadores se calcula por el método yodométrico [Kolthoff y Belcher, 1957]. Este método se utiliza en la calibración del equipo para conocer el ozono generado, mientras que en la realización de experimentos sirve para determinar el ozono no consumido.

El método yodométrico consiste en tomar muestras de la disolución de KI de los borboteadores para cada tiempo y proceder a su valoración con tiosulfato sódico. Cuando el ozono reacciona con el yoduro, el ozono se reduce a oxígeno y el yoduro se oxida a yodo (I₂); la cantidad de ozono producida corresponde estequiométricamente con la cantidad de yodo generada en la disolución de KI.

El procedimiento analítico consiste en la valoración del iodo formado con una disolución de tiosulfato sódico (Na₂S₂O₃·5H₂O, 99'5%, Panreac). Se añaden entre 5 y 10 mL de ácido sulfúrico 1N, ya que se requiere medio ácido para la valoración. Se comienza a valorar hasta que el color pardo rojizo que aparece como consecuencia del I₂ formado se torna amarillo pálido. En este momento se añade el indicador de almidón, puesto que si se añadiera a la muestra inicial, en la que la cantidad de yodo es muy superior, se formaría un complejo que impediría valorar el yodo correctamente. Al añadir el almidón, aparece un color morado que vira a incoloro al alcanzarse el punto de equivalencia.

La cantidad de ozono, en mg, se calcula según la ecuación I, donde V es el volumen del agente valorante (tiosulfato sódico) consumido, N es la normalidad del tiosulfato ($0'025N$), V' es el volumen de yoduro potásico utilizado en la valoración, y 24, el peso equivalente del ozono.

$$mg\ O_3 = V \cdot N \cdot (250/V') \cdot 24 \quad [I]$$

Como se trabaja con dos borboteadores en serie, los mg O_3 totales son la suma de los mg O_3 retenidos por cada borboteador.

El agente valorante, tiosulfato sódico, al no ser patrón primario, se debe estandarizar con dicromato potásico para determinar exactamente su concentración [Clesceri et al., 2005]. Para ello, se toman 80 ml de agua destilada a la que se añade 1 mL de H_2SO_4 96%, 1 g de KI y 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0'1 N. Esta mezcla debe permanecer 6 minutos en oscuridad antes de ser valorada con la disolución de tiosulfato que se va a estandarizar. Igualmente, se valora hasta que el color pardo rojizo pasa a amarillo y tras la adición del almidón, se valora hasta la desaparición del color morado. La normalidad real del tiosulfato sódico se calcula según la ecuación II.

$$N\ Na_2S_2O_3 = 1/mL\ Na_2S_2O_3 \quad [II]$$

V.II.ii. Recta de calibrado

En la Figura IX se representa la recta de calibrado del ozonizador, que representa el ozono generado (mg O_3) en función del tiempo de tratamiento. Permite calcular el ozono introducido en la muestra.

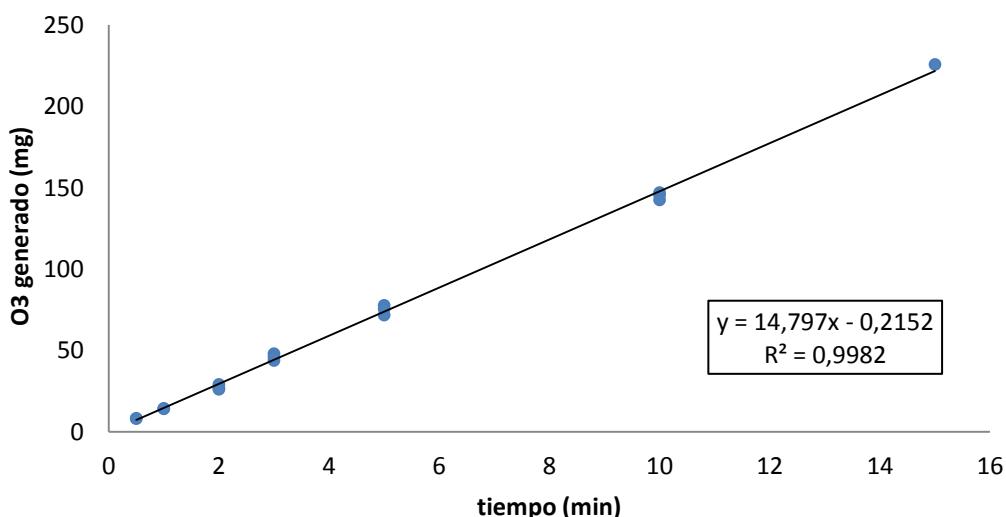


Figura IX. Recta de calibrado del ozonizador

Bibliografía

- 📖 Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W., Greenberg A.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21^a edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.
- 📖 Kolthoff I.M., Belcher R. Volumetric Analysis III. Ed. New York: Interscience, 1957.

ANEXO VI. Modelos cinéticos de inactivación microbiana

VI.I. Descripción de modelos

La microbiología predictiva es una parte esencial de la microbiología que pretende conocer la respuesta de las poblaciones microbianas frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos. Su objetivo es desarrollar modelos matemáticos que describan y permitan predecir el ritmo de inactivación de los microorganismos de una determinada población, sometidos a condiciones tecnológicas o medioambientales determinadas. Este estudio de investigación se centra en los modelos de inactivación, modelos que estudian el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso. La inactivación bacteriana en aguas ha sido bastante estudiada en la última década aplicando una gran variedad de modelos cinéticos de desinfección [Lee y Nam, 2002]. Mediante la modelización cinética se consigue obtener una expresión matemática que facilite el diseño adecuado de un sistema de desinfección.

Durante la mayor parte del siglo XX, en los sistemas de desinfección, solía emplearse un exceso de desinfectante para cumplir así con los requisitos de calidad del agua exigidos. Sin embargo, en la actualidad, se considera que el diseño óptimo y el funcionamiento correcto de un sistema de desinfección exigen el desarrollo previo de modelos cinéticos que puedan ser fácilmente incorporados a las distintas configuraciones de los reactores que se emplean en el campo del tratamiento de aguas.

Los modelos cinéticos desarrollados en la literatura tratan de representar la acción de un desinfectante y su particular modo de actuación sobre los microorganismos presentes en el agua, bajo las condiciones específicas del sistema que se estudia.

En 1908 Chick formula la primera cinética de inactivación de primer orden para la modelización de las gráficas de inactivación lineales. Con ella intenta explicar el proceso de desinfección como si de una reacción química se tratara. Considera que este proceso es análogo a una reacción química de primer orden en la que la velocidad de la reacción depende de las concentraciones relativas del desinfectante y los microorganismos, estando el desinfectante en exceso. Este modelo se expresa mediante la ecuación III donde N_t es el número de bacterias supervivientes en el instante t , N_0 es el número de bacterias inicial ($t=0$) y k es la constante de velocidad de la reacción.

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad \rightarrow \quad \ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot t \quad [\text{III}]$$

En el mismo año Watson (1908) incluye una modificación al modelo de Chick, incorporando el efecto de la concentración del desinfectante en el proceso de desinfección. El modelo de Chick-Watson se representa por la ecuación IV, donde C es la concentración del desinfectante y n es el número de moléculas de desinfectante necesarias para la inactivación microbiana, también descrito como coeficiente de dilución, un factor empírico que suele considerarse la unidad [Pernitsky et al., 1995].

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot C \cdot N \quad \rightarrow \quad \ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t \quad [IV]$$

Estas cinéticas sencillas asumen que todos los microorganismos de la población presentan la misma sensibilidad al agente letal por lo que, cuando se representa su inactivación frente al tiempo de tratamiento, bajo una intensidad constante, se obtiene una línea recta.

Sin embargo, estos modelos lineales no permiten explicar desviaciones observadas en muchos procesos de inactivación microbiana, como se refleja en la Figura X. La curva de inactivación A representa la cinética de primer orden o muerte exponencial, en la que la velocidad de inactivación es constante e independiente del tiempo de tratamiento. La curva B muestra un hombro inicial (shoulder) o fase "lag" en la que una fracción de microorganismos supervivientes se mantiene constante en los primeros instantes del tratamiento, produciéndose seguidamente un descenso lineal de los mismos. Se atribuye a una mezcla inadecuada del desinfectante en la muestra, un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos de acción bacterianos o a una resistencia inicial de los microorganismos al ataque del desinfectante. Las curvas C se caracterizan por una fase de inactivación lineal inicial rápida seguida de una disminución de las poblaciones lenta, lo que se traduce en la formación de una cola o tailing-off [Gyürék y Finch, 1998]. Del mismo modo que en el fenómeno de los hombros, existen varias teorías acerca de la aparición de colas. Puede ser debido a agrupaciones de microorganismos, a la presencia de subpoblaciones con una resistencia variable al desinfectante, bien de carácter innato o como respuesta a una adaptación al medio, o también, a que se produzca una disminución en la concentración del desinfectante durante el tratamiento. Finalmente, las curvas D presentan ambas desviaciones lineales, mostrando una fase inicial de hombro seguida de una fase lineal de inactivación y finalizando con un fenómeno de cola (curvas sigmoides).

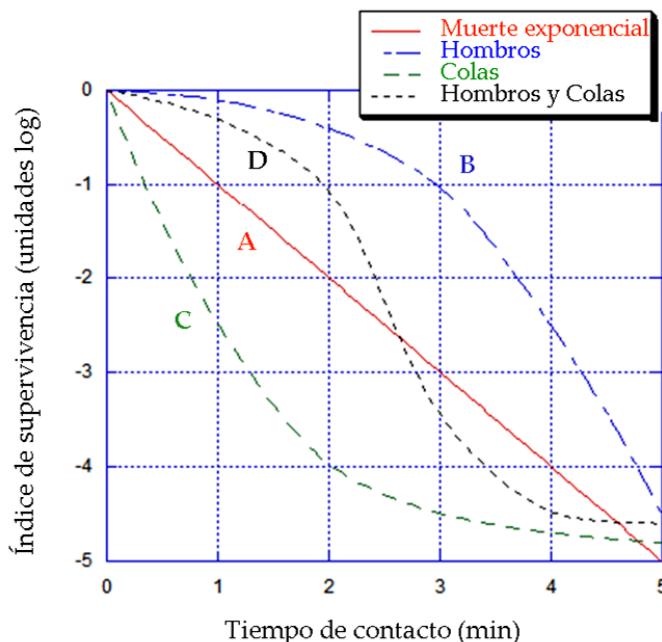


Figura X. Curvas de inactivación microbiana posibles [Gyürék y Finch, 1998].

A partir de estas teorías se desarrollan cinéticas alternativas que permiten describir curvas de supervivencia no lineales y que han sido aplicados por numerosos autores para describir el comportamiento de diversos microorganismos en el campo de la desinfección.

La Tabla 6 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. La selección de estos modelos se realiza en base al principio de parsimonia según el cual los modelos han de ser tan simples como sea posible, es decir, con el menor número de parámetros posible [Lanao, 2012]. La bondad del ajuste puede mejorar en gran medida añadiendo más parámetros al modelo; sin embargo, en ocasiones, aumentar mucho el número de parámetros puede llevar a que las predicciones no tengan sentido.

A continuación se desarrollan con más detalle cada uno de los modelos matemáticos seleccionados.

VI.I.i. Modelo de Hom (1972)

Hom, tras analizar los resultados de diversos experimentos de cloración sobre sistemas algales-bacterianos y observar que respondían a cinéticas curvilíneas más que a lineales, generalizó de manera empírica la ley de Chick-Watson mediante la ecuación V, donde k es la constante de velocidad de inactivación de primer orden, C es la concentración del desinfectante, n el coeficiente de dilución y m una constante empírica del modelo [Pernitsky et al., 1995]. En el caso de que la concentración sea constante, el modelo se simplifica integrándose esta concentración en una constante de velocidad aparente ($k_{ap} = k \cdot C^n$) dando lugar a la ecuación VI, siendo esta k_{ap} una constante de pseudo-primer orden (min^{-1}) [Malato et al., 2009]. Este modelo no considera que el agua tenga una demanda de desinfectante y por tanto, que la concentración del mismo disminuya a lo largo del tratamiento.

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot m \cdot C^n \cdot N \cdot t^{m-1} \rightarrow \log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m \quad [\text{V}]$$

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -k_{ap} \cdot t^m \quad [\text{VI}]$$

El nivel de inactivación predicho por el modelo de Hom es una función no lineal de C y t , que dependen de los parámetros del modelo n y m , respectivamente. Este modelo puede describir las curvas A-D de la Figura X y se simplifica al modelo Chick-Watson para $m=1$. Cuando m es menor que la unidad, se visualiza un efecto de cola o tailing-off.

VI.I.ii. Modelo de Hom modificado (1994)

Años más tarde, Haas y Joffe en 1994 modifican el modelo de Hom estableciendo que la concentración del desinfectante puede cambiar con el tiempo, debido a la demanda de los microorganismos o de otros componentes presentes en el agua. Si la descomposición del desinfectante residual es de primer orden, como frecuentemente se observa para la descomposición del cloro y ozono, se establece una relación entre la concentración residual y el tiempo según la ecuación VII donde C_0 es la concentración inicial y k' la constante de velocidad de descomposición del desinfectante (min^{-1}).

$$C = C_0 \cdot e^{-k't} \quad [VII]$$

A partir de las ecuaciones V y VII, se obtiene el modelo de Hom modificado, ecuación VIII. Este modelo añade una constante al modelo de Hom, k', considerando la demanda del desinfectante por parte de la muestra.

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nk'} \right)^m k \cdot C_0^n \left[1 - e^{\left(\frac{-nk't}{m} \right)} \right]^m \quad [VIII]$$

VI.I.iii. Modelo bifásico de Pruitt y Kamau (1993)

En 1993, Pruitt y Kamau establecen un modelo bifásico basado en la existencia de dos poblaciones microbianas que presentan una sensibilidad al tratamiento diferente, siguiendo en ambos casos una cinética de inactivación de primer orden. La expresión matemática del modelo se define por la ecuación IX, donde P significa la fracción de microorganismos supervivientes correspondientes a la subpoblación 1, (1-P) es la fracción de supervivientes de la subpoblación 2, k_1 representa la constante de inactivación de la población sensible y k_2 es la constante de inactivación de la población resistente.

$$\log \frac{N_t}{N_0} = \log [P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - P) e^{-k_2 \cdot t}] \quad [IX]$$

VI.I.iv. Modelo de Mafart (2002)

Este modelo asume que la inactivación microbiana se debe a la incapacidad de la célula para resistir las duras condiciones impuestas por algún tipo de estrés, después de cierto tiempo; también asume que la población es heterogénea, es decir, que cada célula tarda un tiempo diferente en morirse. En definitiva, es un modelo que implica la existencia de una distribución de resistencias dentro de la población microbiana. La resistencia sigue una distribución de probabilidad de Weibull, definida por la ecuación X. La distribución de Weibull es una distribución de probabilidades diseñada para describir el comportamiento de sistemas que tienen cierto grado de variabilidad.

$$f(t) = \frac{n}{b} \left(\frac{t}{b} \right)^{n-1} e^{-\left(\frac{t}{b} \right)^n} \quad [X]$$

Mafart (2002) modifica la ecuación de Weibull según la ecuación XI, donde δ es el parámetro de escala y se corresponde con el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana y p es el parámetro de forma e indica la forma de la curva de la ecuación, ya que ésta toma formas convexas cuando n es mayor que 1 y cóncavas cuando es menor que 1.

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad [XI]$$

VI.I.v. Modelo de Geeraerd (2000)

Este modelo matemático se basa en diversos argumentos que describen el comportamiento de los microorganismos cuando se presentan fenómenos de hombro, una fase de inactivación lineal y cola, es decir, cuando describen curvas sigmoides [Geeraerd et al., 2000]. La incorporación de cada fenómeno se engloba en la ecuación XII, donde N_{res} es la concentración de bacterias supervivientes, k_{max} es la velocidad específica de inactivación y SI es el parámetro que representa la duración del hombro.

$$N_t = (N_0 - N_{res}) e^{-k_{max}t} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot SI}}{1 + (e^{k_{max} \cdot SI} - 1) e^{-k_{max}t}} \right) + N_{res} \quad [\text{XII}]$$

VI.II. Ajuste de datos experimentales e índices de error

Para obtener los coeficientes cinéticos de cada modelo descritos anteriormente, es necesario ajustar los valores experimentales a las correspondientes ecuaciones mediante técnicas de regresión no lineal. Los parámetros de los modelos se ajustan a ecuaciones mediante algoritmos interactivos basados en el método de mínimos cuadrados [Pernistky et al., 1995]. En la actualidad, muchos programas informáticos estadísticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utiliza la herramienta Solver y el complemento GlnaFiT (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) del programa Microsoft Excel.

Para evaluar la calidad de los ajustes de los modelos a los datos experimentales obtenidos se utilizan dos índices: el coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático medio (ECM). También se utiliza con este propósito la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente. El cálculo de R^2 y ECM se realiza con el programa Excel (Microsoft).

El coeficiente de determinación, R^2 , se utiliza como una medida global de la calidad del ajuste. Este coeficiente informa sobre la proporción de variabilidad total de la variable dependiente que es explicable por el modelo. Cuanto más cercano sea el valor R^2 a 1, mejor es la precisión predictiva del modelo, y por tanto, más concuerdan los valores predichos con los valores observados. La ecuación del coeficiente de determinación viene descrita por la ecuación XIII, donde \tilde{y}_i son los valores estimados \bar{y} es la media de los valores reales.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad [\text{XIII}]$$

El error cuadrático medio, ECM, se define como la raíz cuadrada de la media del cuadrado de los residuos (diferencia entre los valores observados y los valores estimados) y viene determinado por la ecuación XIV, donde n es el tamaño de la muestra. Un valor de ECM igual a 0 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los valores reales.

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y)^2}{n}} \quad [XIV]$$

Para comparar modelos diferentes se representan gráficamente los valores observados frente a los valores estimados. Si el modelo se ajusta perfectamente a los datos, los puntos se encuentran distribuidos a lo largo de la línea de equivalencia. La bondad del modelo es mayor cuanto más próximos están los puntos a dicha línea.

Bibliografía

- 📖 Chick H. "An investigation of the laws of disinfection". *Journal of Hygiene* 8, 92-158, 1908.
- 📖 Geeraerd A.H., Herremans C.H., Van Impe J.F. "Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment". *International Journal of Food Microbiology* 59, 185-209, 2000.
- 📖 Gyurek L.L., Finch G.R. "Modelling water treatment chemical disinfection kinetics". *Journal of Environmental Engineering* 124, 783-793, 1998.
- 📖 Haas C.N., Joffe J. "Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom's model for decay". *Environmental Science and Technology* 28, 1367-1369, 1994.
- 📖 Hom L.W. "Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem". *Journal of Sanitary Engineering Division* 98, 183-193, 1972.
- 📖 Lanao M. "Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación". Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2012.
- 📖 Lee Y., Nam S. "Reflection on kinetic models to the chlorine disinfection for drinking water production". *The Journal of Microbiology* 40, 119-124, 2002.
- 📖 Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. "On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model". *International Journal of Food Microbiology* 72, 107-113, 2002.
- 📖 Malato S., Fernández P., Maldonado M.I., Blanco J., Gernjak W. "Decontamination and Disinfection of Water by Solar Photocatalysis: Recent Overview and Trends". *Catalysis Today* 147, 1-59, 2009.
- 📖 Pernitsky D.J., Finch G.R., Huck P.M. "Disinfection kinetics of heterotrophic plate-count bacteria in biologically treated potable water". *Water Research* 29, 1235-1241, 1995.
- 📖 Pruitt K.M., Kamau D.N. "Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions". *Journal of Industrial Microbiology* 12, 221-231, 1993.
- 📖 Watson H.E. "A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant". *Jounal of Hygiene* 8, 536-542, 1908.

ANEXO VII. Resultados

VII.I. Resultados de inactivación

VII.I.i. Cloración

Las tablas XI-XIV muestran los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. (en UFC/100 mL), así como el cloro residual (en mg/L Cl₂), durante los ensayos de cloración.

Tabla XI. Inactivación de enterococos y cloro residual

Tiempo	Dosis de cloro 3'8 mg/L Cl ₂			
	N _t	Log(N _t)	Log(N _t /N ₀)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)
0	6,6E+07	7,82	0	3,8
0,5	3,0E+07	7,48	-0,34	2,6
1	1,2E+07	7,08	-0,74	2,4
3	3,0E+06	6,48	-1,34	2,1
5	4,5E+06	6,65	-1,17	1,9
10	1,0E+06	6,00	-1,82	1,8
30	4,4E+04	4,64	-3,18	1,5

Tabla XII. Inactivación de enterococos y cloro residual

Tiempo	Dosis de cloro 15 mg/L Cl ₂			
	N _t	Log(N _t)	Log(N _t /N ₀)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)
0	3,2E+07	7,51	0,00	15,0
0,5	1,6E+07	7,20	-0,30	10,2
1	1,6E+07	7,20	-0,30	10,1
3	6,8E+05	5,83	-1,67	8,2
5	9,0E+04	4,95	-2,55	7,5
10	8,0E+00	0,90	-6,60	6,2
30	1,0E+00	0,00	-7,51	6,2

Tabla XIII. Inactivación de enterococos y cloro residual

Tiempo	Dosis de cloro 30 mg/L Cl ₂			
	N _t	Log(N _t)	Log(N _t /N ₀)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)
0	6,6E+07	7,82	0,00	30,0
0,5	6,8E+05	5,83	-1,99	19,0
1	1,7E+05	5,23	-2,59	15,8
3	5,0E+02	2,70	-5,12	13,8
5	2,0E+01	1,30	-6,52	12,3
10	4,0E+00	0,60	-7,22	11,8
30	2,0E+00	0,30	-7,52	11,7

Tabla XIV. Inactivación de enterococos y cloro residual

Tiempo	Dosis de cloro 65 mg/L Cl ₂			
	N _t	Log(N _t)	Log(N _t /N ₀)	Cloro residual (mg/L Cl ₂)
0	3,4E+07	7,53	0,00	65,0
0,5	1,5E+03	3,18	-4,36	40,1
1	2,8E+01	1,45	-6,08	33,3
3	0,0E+00	0,00	-7,53	25,2
5	0,0E+00	0,00	-7,53	19,2
10	0,0E+00	0,00	-7,53	15,9
30	0,0E+00	0,00	-7,53	15,7

La Figura XI representa el cloro residual a lo largo de los distintos tratamientos de cloración. En todos los casos se observa un rápido consumo de cloro durante los primeros instantes del tratamiento. Posteriormente la desaparición de cloro es cada vez más lenta, quedando cloro residual tras 30 minutos de tratamiento en todos los ensayos.

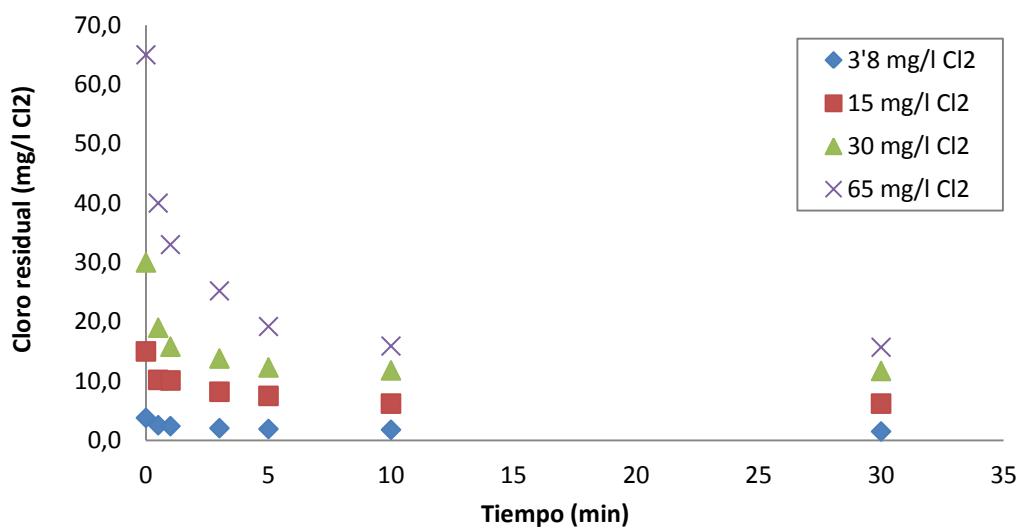


Figura XI. Cloro residual durante los tratamientos de cloración.

VII.I.ii. Tratamientos basados en ozono

Las tablas XV-XVII muestran los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. durante los tratamientos basados en ozono, así como el control de ozono durante el proceso.

Tabla XV. Inactivación de enterococos en el tratamiento de ozonización

Tiempo (min)	O ₃ generado (mg)	O ₃ no consumido (mg)	O ₃ consumido (mg/L)	N _t	log(N _t)	log(N _t /N ₀)
0	0,0	0,0	0,0	1,32E+08	8,12	0,00
0,5	7,2	0,0	7,2	1,15E+08	8,06	-0,06
1	14,6	0,0	15,0	7,50E+07	7,88	-0,25
3	44,2	12,8	34,3	2,66E+07	7,42	-0,70
6	88,6	32,0	56,6	5,10E+06	6,71	-1,41
9	133,0	60,2	72,8	6,50E+03	3,81	-4,31
15	221,7	131,7	90,1	1,64E+02	2,21	-5,91

Tabla XVI. Inactivación de enterococos en el tratamiento peroxona (1'4 mg/L H₂O₂)

Tiempo (min)	O ₃ generado (mg)	O ₃ no consumido (mg)	O ₃ consumido (mg/L)	N _t	log(N _t)	log(N _t /N ₀)
0	0,0	0,0	0,0	1,35E+08	8,13	0,00
0,5	7,2	0,0	7,2	9,30E+07	7,97	-0,16
1	14,6	0,0	14,9	9,50E+07	7,98	-0,15
3	44,2	8,8	37,5	6,10E+07	7,79	-0,35
6	88,6	37,0	51,5	1,56E+07	7,19	-0,94
9	133,0	60,2	72,8	2,30E+03	3,36	-4,77
15	221,7	131,7	90,1	5,60E+01	1,75	-6,38

Tabla XVII. Inactivación de enterococos en el tratamiento peroxona (20 mg/L H₂O₂)

Tiempo (min)	O ₃ generado (mg)	O ₃ no consumido (mg)	O ₃ consumido (mg/L)	N _t	log(N _t)	log(N _t /N ₀)
0	0,0	0,0	0,0	1,80E+08	8,26	0,00
0,5	7,2	0,0	7,2	1,60E+08	8,20	-0,05
1	14,6	0,0	15,3	1,60E+08	8,20	-0,05
3	44,2	8,9	39,2	9,00E+07	7,95	-0,30
6	88,6	28,3	60,2	4,00E+06	6,60	-1,65
9	133,0	61,3	71,7	9,80E+03	3,99	-4,26
15	221,7	114,3	107,4	2,66E+02	2,42	-5,83

VII.I.iii. Tratamientos basados en luz UV/visible

La Tabla XVIII muestra los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. durante los tratamientos basados en luz UV/visible.

Tabla XVIII. Inactivación de enterococos en los tratamientos basados en irradiación

Tiempo (min)	UV/vis + 20 mg/L H ₂ O ₂		UV/vis + 1 g/L TiO ₂		UV/vis + 680 mg/L H ₂ O ₂	
	N _t (UFC/100 mL)	Log (N _t /N ₀)	N _t (UFC/100 mL)	Log (N _t /N ₀)	N _t (UFC/100 mL)	Log (N _t /N ₀)
0	1,55E+08	0	1,55E+08	0	1,07E+08	0
5	1,55E+08	0	—	—	—	—
10	—	—	1,40E+08	-0,04	—	—
15	1,47E+08	-0,02	—	—	—	—
20	1,41E+08	-0,04	1,37E+08	-0,05	—	—
30	1,19E+08	-0,11	1,34E+08	-0,06	5,40E+07	-0,30
60	—	—	—	—	2,60E+07	-0,61

VII.II. Cinéticas de inactivación

VII.II.i. Cloración

En las figuras XII-XV se representa el ajuste de los distintos modelos matemáticos a los datos experimentales observados durante los tratamientos de cloración.

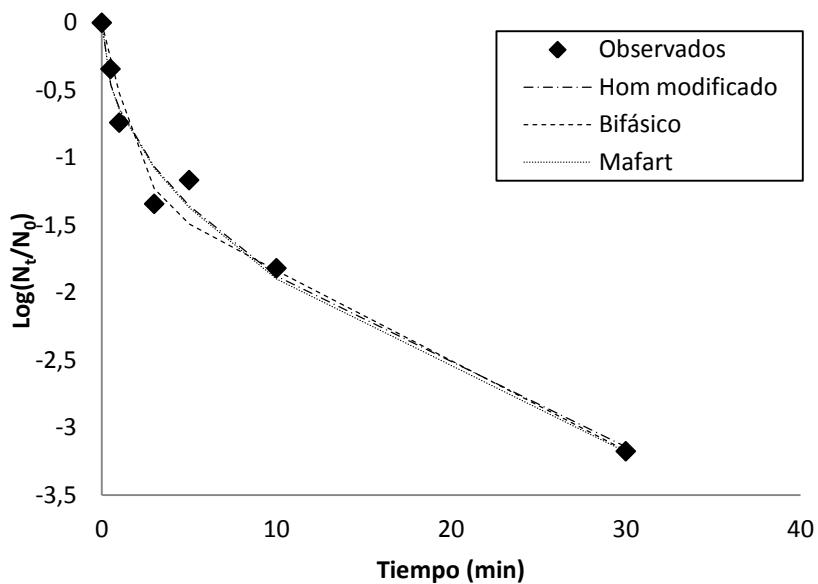


Figura XII. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración con 3'8 mg/L Cl₂

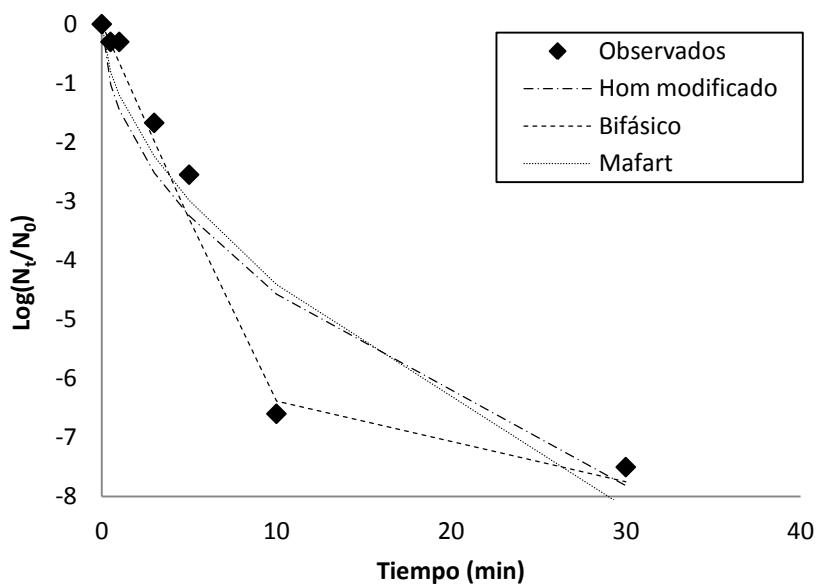


Figura XIII. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración con 15 mg/L Cl₂

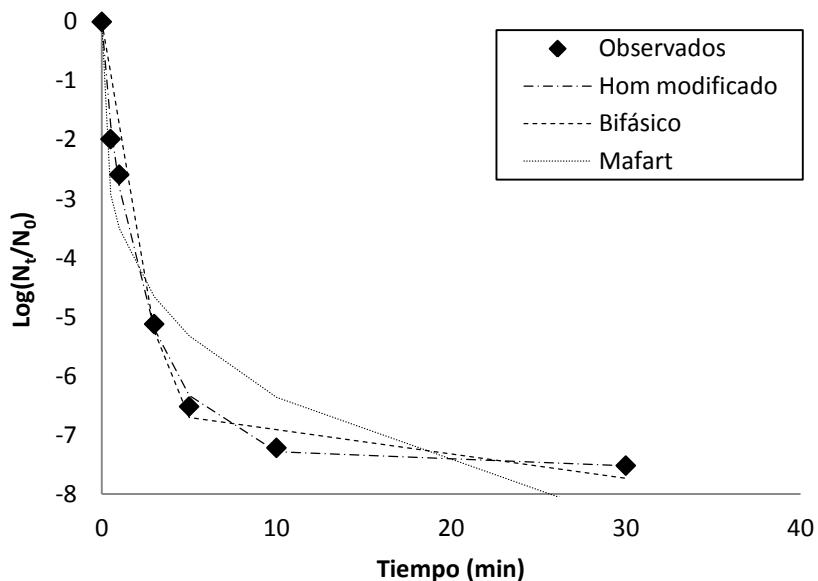


Figura XIV. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración con 30 mg/L Cl₂

Figura 14.

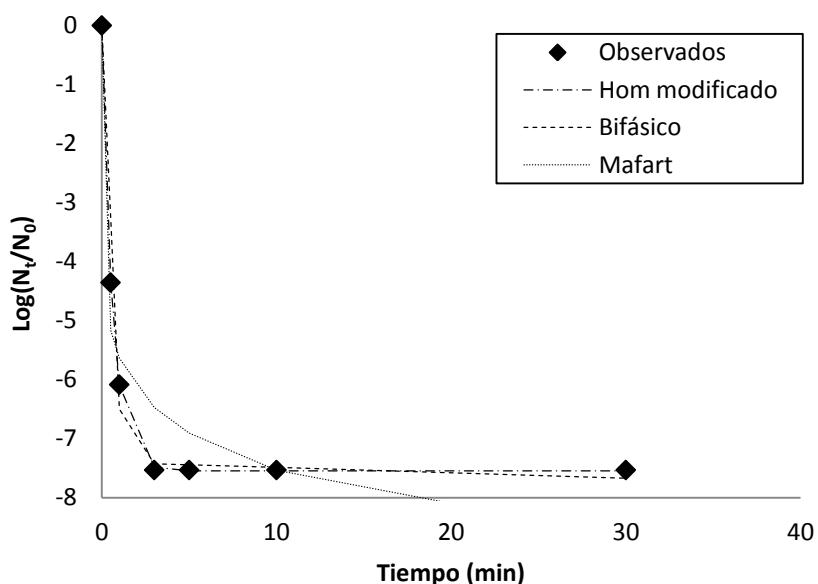


Figura XV. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración con 65 mg/L Cl₂

En las figuras XVI-XIX se representan los valores experimentales observados de inactivación de *Enterococcus* sp. frente a los valores estimados por los distintos modelos. Cuanto más se acerquen estos datos a una línea recta, mejor es el ajuste.

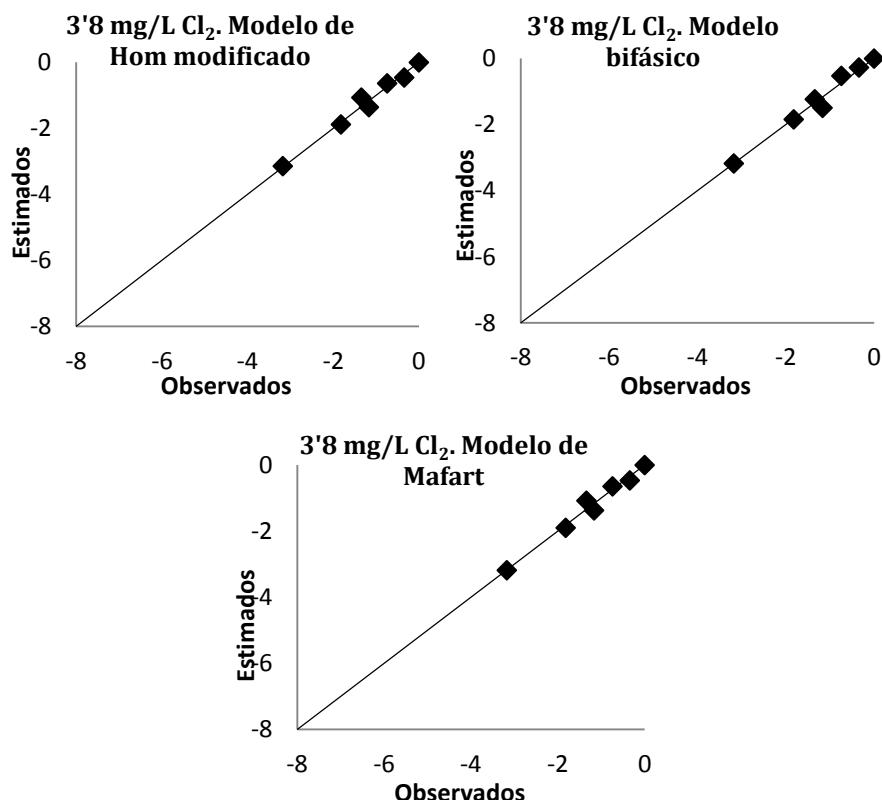


Figura XVI. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento de cloración con 3'8 mg/L Cl₂.

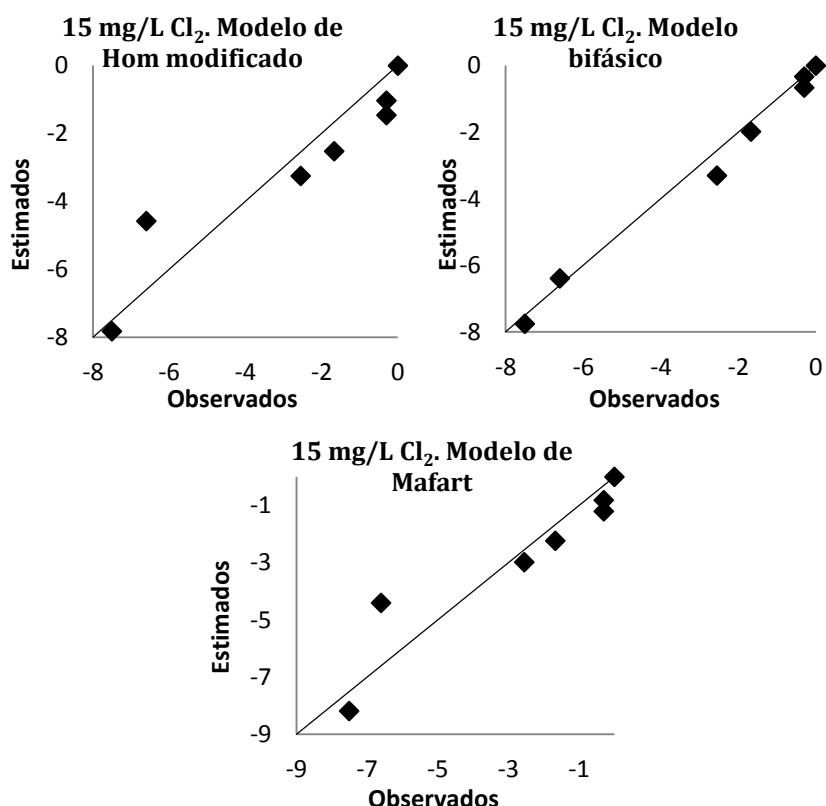


Figura XVII. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento de cloración con 15 mg/L Cl₂.

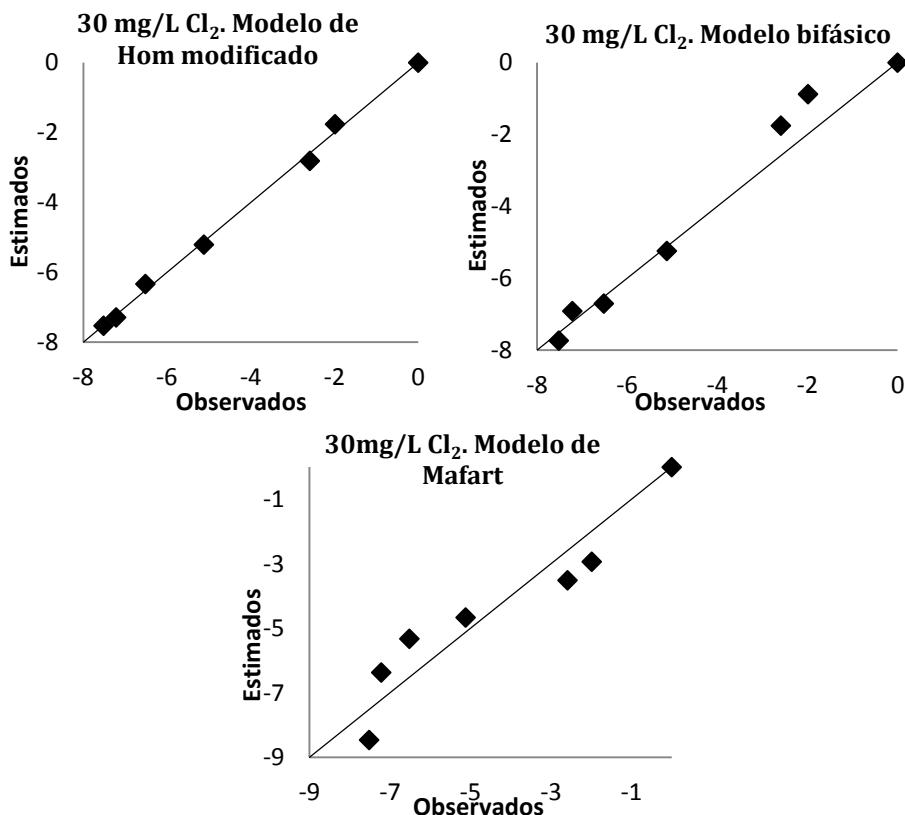


Figura XVIII. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento de cloración con 30 mg/L Cl₂.

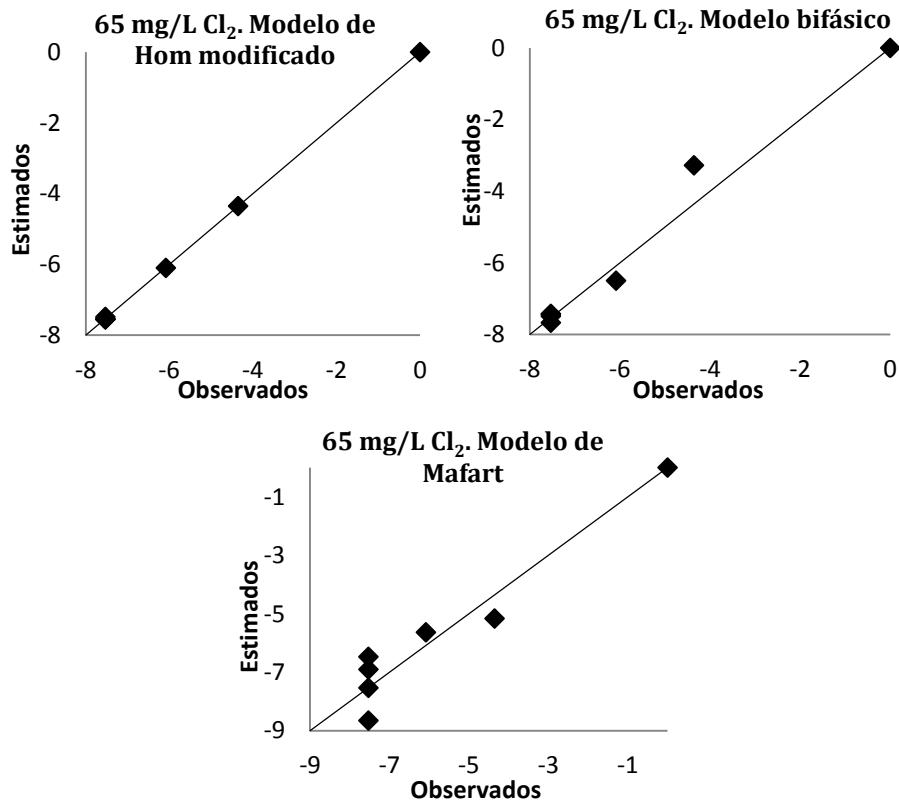


Figura XIX. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento de cloración con 65 mg/L Cl₂.

VII.II.ii. Tratamientos basados en ozono

En las figuras XX-XXII se representa el ajuste de los distintos modelos matemáticos a los datos experimentales observados durante los tratamientos basados en ozono.

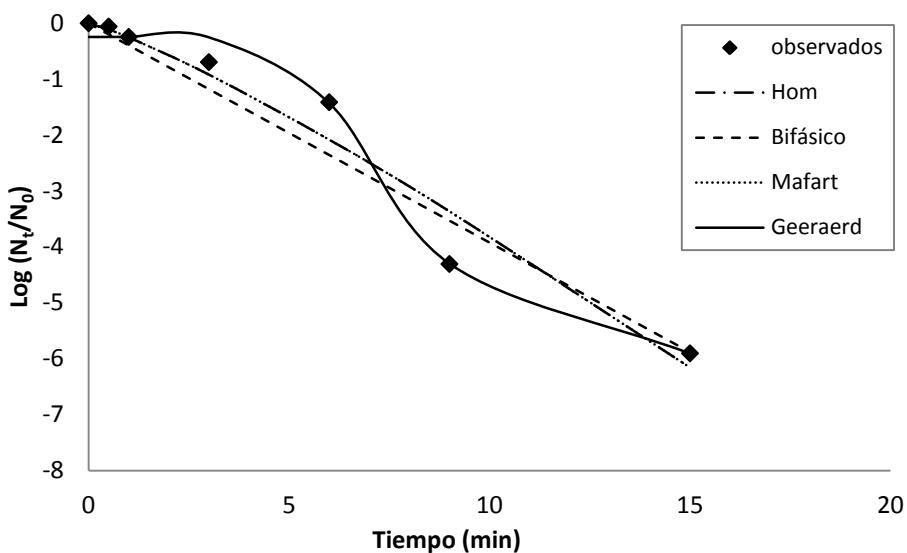


Figura XX. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de ozonización

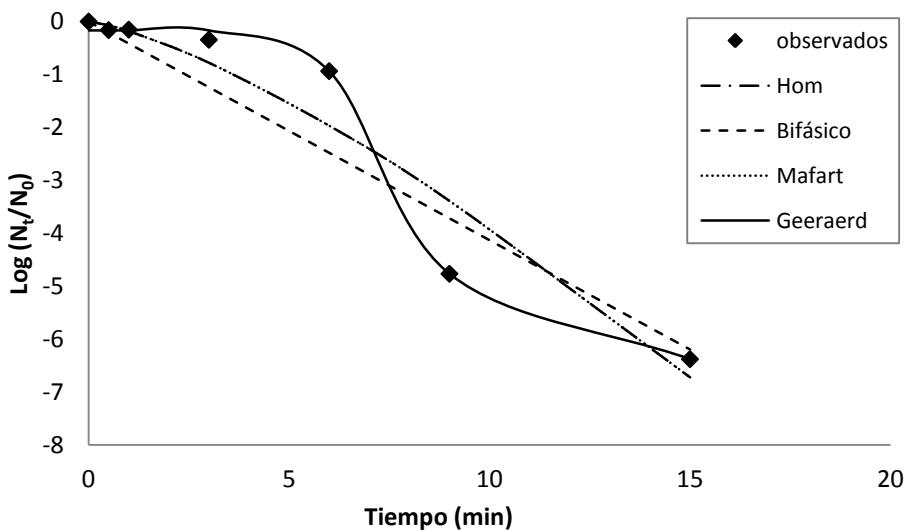


Figura XXI. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento peroxona 1'4 mg/L H_2O_2

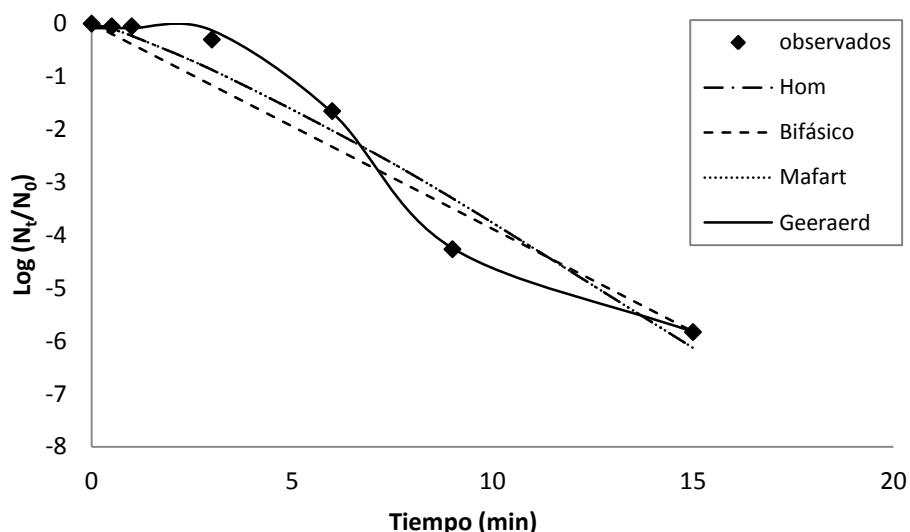


Figura XXII. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento peroxona 20 mg/L H₂O₂

En las figuras XXIII-XXV se representan los valores experimentales observados de inactivación de *Enterococcus* sp. frente a los valores estimados por los distintos modelos. Cuanto más se aproximen estos datos a una línea recta, mejor es el ajuste.

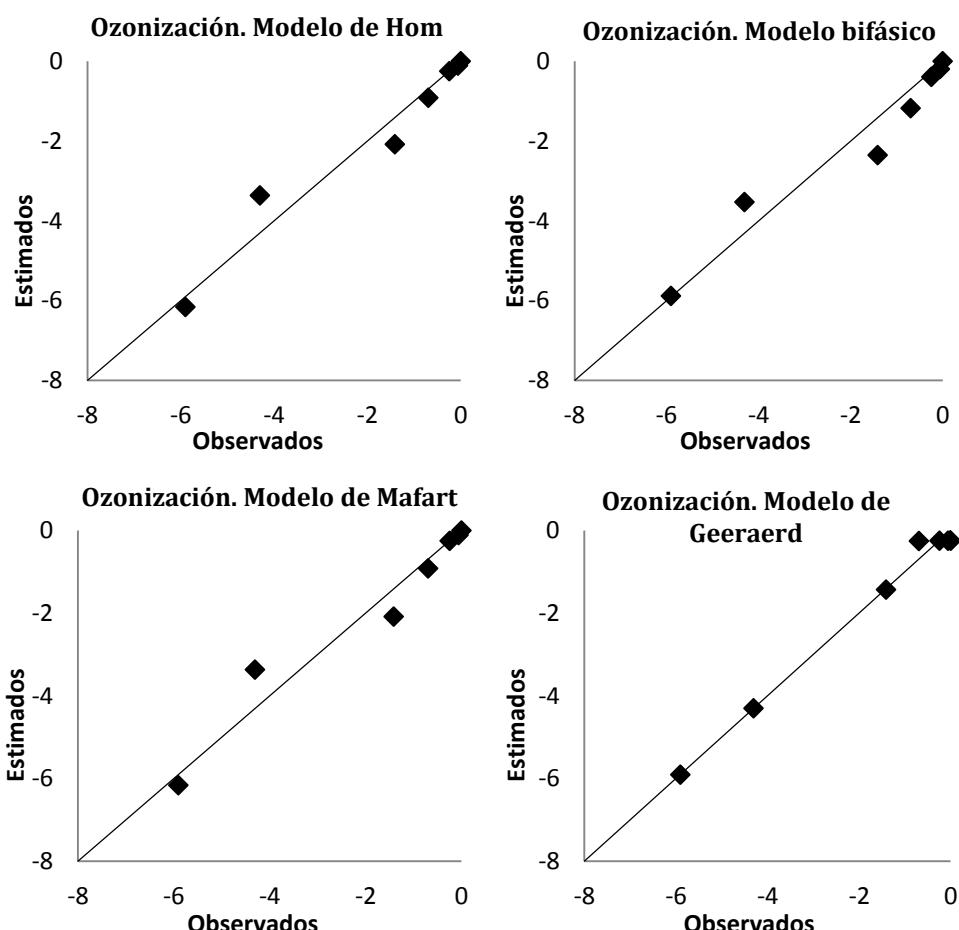


Figura XXIII. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento de ozonización

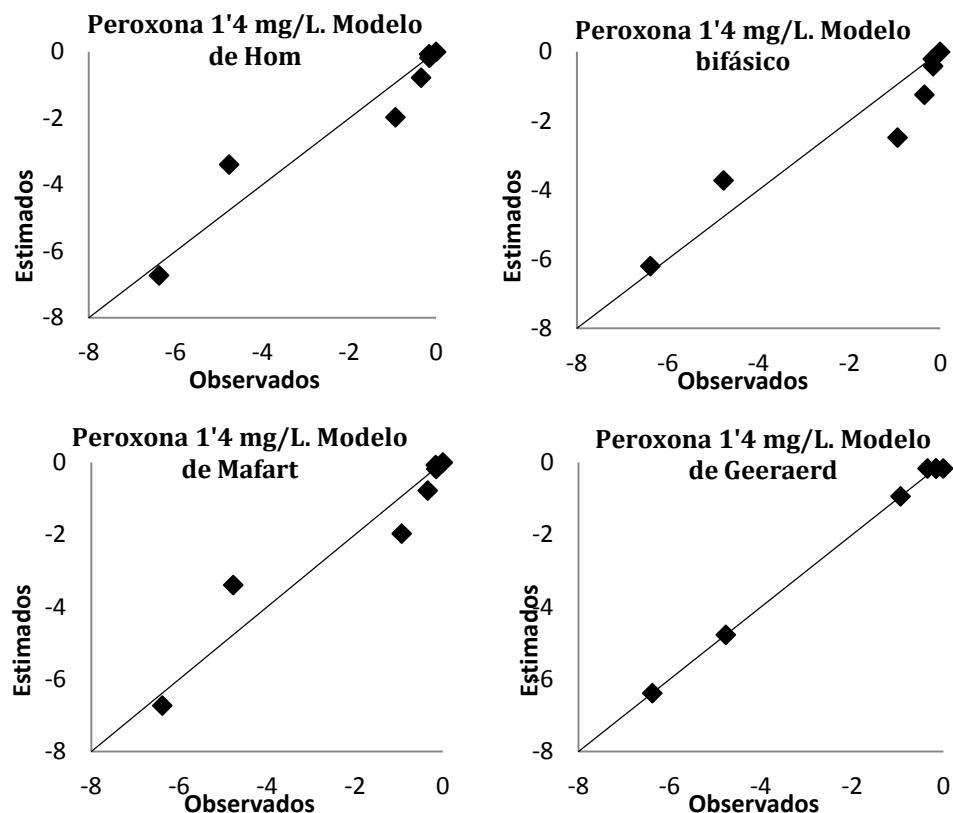


Figura XXIV. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento peroxona 1'4 mg/L H₂O₂.

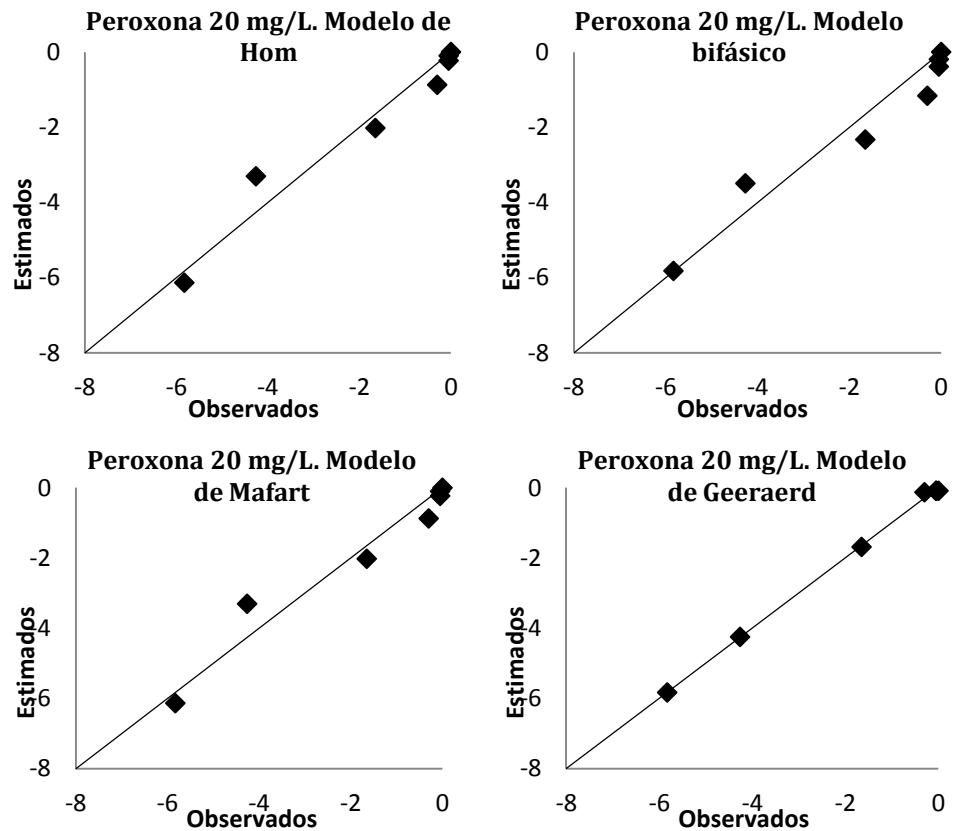


Figura XXV. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento peroxona 20 mg/L H₂O₂.

VII.II.iii. Tratamientos basados en luz UV/vis

En la Figura XXVI se representa el ajuste de los distintos modelos matemáticos a los datos experimentales observados durante el tratamiento de fotocatálisis combinada con 680 mg/L H₂O₂.

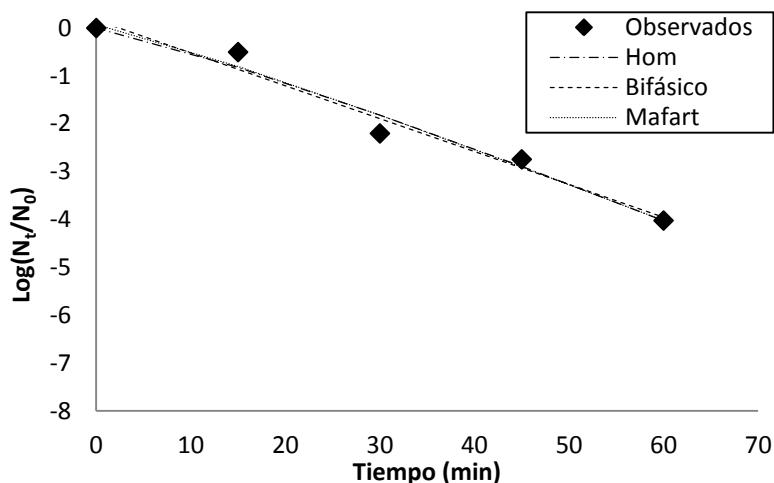


Figura XXVI. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento fotocatálisis/ 680 mg/L H₂O₂

En la Figura XXVII se representan los valores experimentales observados de inactivación de *Enterococcus* sp. frente a los valores estimados por los distintos modelos. Cuanto más se aproximen estos datos a una línea recta, mejor es el ajuste.

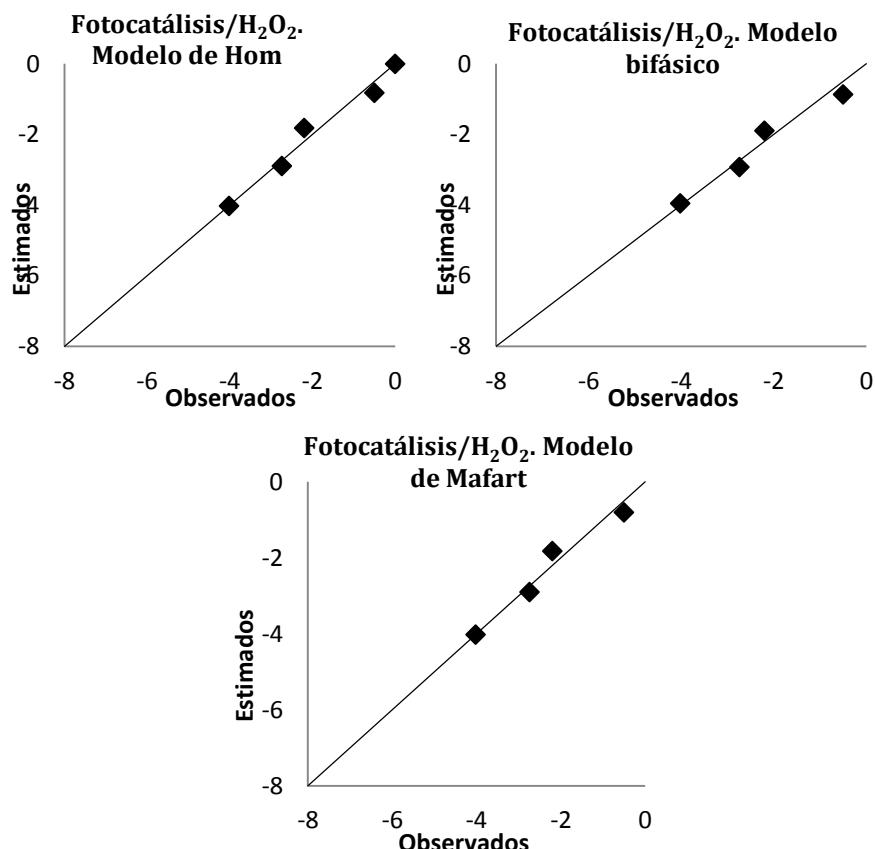


Figura XXVII. Representación de los valores estimados frente a los valores observados en el tratamiento fotocatálisis/H₂O₂ (680 mg/L H₂O₂).

