



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Inactivación de *Escherichia coli* presente en aguas
de salida de depuradora mediante cloración y
procesos de oxidación avanzada

Autor/es

Sarah Mendiara Co

Director/es

Rosa Mosteo Abad

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2013

Agradecimientos

Agradezco a Rosa la ayuda prestada desde el comienzo y las dudas que me ha resuelto en todo el desarrollo de este proyecto.

Gracias a todos los compañeros con los que he convivido este tiempo, Noelia, Silvia, José, Jorge, Cistina, Elena, Diego, Soazig... por sus consejos y los buenos ratos pasados en el laboratorio y en los numerosos cafés; también a Carlos, por estar siempre animando el laboratorio de microbiología y por los pequeños descansos entre experimentos, y sobre todo a Pilar, por estar dispuesta en cualquier momento a despejar dudas, enseñar y compartir conocimientos.

Quiero agradecer a J. el tiempo y esfuerzo invertido, y especialmente su apoyo, ha sido de gran ayuda.

Finalmente, a mi Madre, a mi Padre, a José y a mis Yayos, que me han acompañado y motivado durante todo el transcurso del máster, muchas gracias *por todo*.

Inactivación de *Escherichia coli* presente en aguas de salida de depuradora mediante cloración y procesos de oxidación avanzada.

Resumen

El agua es un recurso escaso y debe ser gestionado de una manera eficiente con el objetivo de cubrir la creciente demanda que existe sobre ella. Por ello, para optimizar su uso se está extendiendo la técnica de reutilización de aguas de salida de depuradora con diversos fines. Las aguas residuales después de ser tratadas aún presentan carga microbiológica que puede suponer un riesgo de transmisión de enfermedades, por lo que la legislación ha establecido, entre otros, criterios de calidad microbiológicos que deben ser cumplidos para poder reutilizar el agua.

El objetivo del presente trabajo es determinar el poder bactericida de diferentes técnicas aplicables en la regeneración de aguas de salida de depuradora y la influencia del tiempo y dosis del tratamiento sobre el indicador bacteriano *Escherichia coli*. Las técnicas aplicadas se basan en tratamientos convencionales, como la cloración, y en procesos de oxidación avanzada tales como la ozonización, el sistema peroxona (O_3/H_2O_2), la fotólisis (H_2O_2 /radiación UV/visible), la fotocatalisis (TiO_2 / radiación UV/visible) y la fotocatalisis combinada con peróxido de hidrógeno. Además, mediante el estudio de cinéticas de inactivación bacteriana se comparan los resultados de desinfección de *Escherichia coli* con los obtenidos mediante la aplicación de los mismos tratamientos sobre *Enterococcus sp.*, en el grupo de Investigación, Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza. Finalmente, se realiza un estudio económico para evaluar los costes de los procesos de desinfección aplicados en este trabajo.

El proceso de cloración fue el más eficaz y rentable económicamente de los tratamientos aplicados, logrando una inactivación de *Escherichia coli* completa tras 20 minutos de tratamiento con $3,8 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. El aumento de la dosis de cloro a $15 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ aumentó la velocidad de inactivación logrando a los 5 minutos la desinfección de 8,35 unidades logarítmicas.

Entre los tratamientos basados en ozono, en 15 minutos se lograron inactivar más de 6 unidades logarítmicas mediante la ozonización y el sistema peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2O_2 \cdot \text{L}^{-1}$, con consumos de 71,0 y $84,4 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente. La eficacia del sistema peroxona con $20 \text{ mg H}_2O_2 \cdot \text{L}^{-1}$ fue menor, inactivando 3 unidades logarítmicas de *Escherichia coli* con un consumo de $78,5 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Los modelos de inactivación mostraron una mayor cinética en el sistema peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2O_2 \cdot \text{L}^{-1}$, siendo su coste económico el menor entre los procesos con ozono estudiados.

En los tratamientos basados en radiación UV/visible la adición de H_2O_2 supuso un aumento en la velocidad de inactivación de *Escherichia coli*. En los ensayos TiO_2 /radiación UV/visible se observó un efecto sinérgico mediante la adición de dosis de peróxido de hidrógeno $20 \text{ mg H}_2O_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Los estudios con radiación UV/visible y $680 \text{ mg H}_2O_2 \cdot \text{L}^{-1}$ presentaron valores de inactivación mayores, si bien, la combinación del tratamiento con TiO_2 no mostró una mejora significativa en la desinfección. En tratamientos H_2O_2 /radiación UV/visible es la dosis de H_2O_2 el principal gasto, que puede disminuirse aumentando el tiempo de tratamiento. La utilización de TiO_2 no es rentable.

En las mismas condiciones de operación, *Escherichia coli* presentó una mayor sensibilidad que *Enterococcus sp.*, a excepción del sistema peroxona con $20 \text{ mg H}_2O_2 \cdot \text{L}^{-1}$ en los que los parámetros cinéticos fueron similares, debido posiblemente a la interacción entre el H_2O_2 y el O_3 observada solo en el caso de los tratamientos con *Escherichia coli*.

INDICE GENERAL

Índice de Anexos.....	ii
Índice de Tablas.....	iii
Índice de Figuras.....	iv
 1. INTRODUCCIÓN.....	 1
1.1. Contexto: la necesidad de nuevos métodos que garanticen la salubridad para la reutilización del agua.....	1
1.2. Objetivos	2
2. AGUAS RESIDUALES Y CONTROL MICROBIOLÓGICO	3
3. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	5
3.1. Cloración	5
3.2. Procesos de oxidación avanzada	6
3.2.1. Tratamientos basados en ozono.....	6
3.2.2. Tratamientos basados en radiación UV/visible	7
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	10
4.1. Metodología analítica.....	10
4.1.1. Análisis de parámetros físico-químicos	10
4.1.2. Análisis microbiológicos.....	11
4.2. Muestras de agua.....	12
4.3. Tratamientos de desinfección aplicados.....	14
4.3.1. Cloración	14
4.3.2. Tratamientos basados en ozono.....	15
4.3.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible	16
4.4. Tratamientos de datos: modelos cinéticos de inactivación bacteriana.....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
5.1. Inactivación de <i>Escherichia coli</i>	19
5.1.1. Cloración	19
5.1.2. Tratamientos basados en ozono.....	21
5.1.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible	23
5.2. Modelización cinética.....	25
5.2.1. Cloración	25
5.2.2. Tratamientos basados en ozono.....	26
5.2.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible	29
5.3. Estudio económico	30
5.3.1. Cloración	30

5.3.2. Tratamientos basados en ozono	31
5.3.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible	32
6. CONCLUSIONES.....	34
7. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ANEXOS

Anexo I. Criterios de calidad del agua reutilizada según sus usos	40
Anexo II. Principales agentes etiológicos potencialmente presentes en aguas residuales	46
Anexo III. Metodología de los análisis físico-químicos.....	47
III.I. pH	47
III.II. Turbidez.....	47
III.III. Conductividad.....	47
III.IV. Sólidos en suspensión totales.....	47
III.V. Carbono orgánico total	47
III.VI. Demanda química de oxígeno	49
III.VII. Peróxido de hidrógeno	49
III.VIII. Cloro residual.....	49
III.IX. Demanda de cloro	49
Anexo IV. Metodología microbiológica	51
IV.I. Medios de cultivo	51
IV.II. Fortificación de muestras	52
IV.III. Tinción gram.....	52
IV.IV. Diluciones decimales seriadas	54
IV.V. Métodos de siembra	54
Anexo V. Ozonización.....	56
V.I. Descripción de la instalación de ozonización.....	56
V.II. Calibración del ozonizador	56
V.III. Método yodométrico	56
V.IV. Recta de calibrado.....	57
Anexo VI. Modelos cinéticos de inactivación bacteriana.....	58
VI.I. Descripción de modelos	58
VI.II. Ajuste de datos experimentales e índice de error	61
Anexo VII. Resultados.....	64
VII.I. Resultados de inactivación de los tratamientos basados en ozono	64
VII.II. Modelización cinética	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características físico-químicas y microbiológicas del efluente de una EDAR	3
Tabla 2. Composición del agua de alimentación de la planta piloto	10
Tabla 3. Equipos utilizados para los análisis microbiológicos y función	11
Tabla 4. Composición del agua de alimentación de la planta piloto.....	13
Tabla 5. Valores medios de las características físico-químicas del agua de salida de la planta piloto	13
Tabla 6. Modelos cinéticos de inactivación bacteriana aplicados	18
Tabla 7. Valores de recuento e inactivación de <i>E. coli</i> a diferentes dosis de Cl_2 y tiempos de tratamiento.....	19
Tabla 8. Valores de recuento de <i>E. coli</i> y consumo de ozono a diferentes tiempos de tratamiento	21
Tabla 9. Valores de recuento e inactivación de <i>E. coli</i> en tratamientos de 30 minutos con radiación UV/visible	23
Tabla 10. Valores de recuento e inactivación de <i>E. coli</i> en tratamientos con radiación UV/visible, H_2O_2 y TiO_2 a diferentes tiempos.....	24
Tabla 11. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de cloración $3,8 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	25
Tabla 12. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de cloración $15 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	26
Tabla 13. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de ozonización.....	27
Tabla 14. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	28
Tabla 15. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento peroxona con $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	28
Tabla 16. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de <i>E. coli</i> en el tratamiento de UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	29
Tabla 17. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento TiO_2 /radiación UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	30
Tabla 18. Coste del tratamiento de cloración para inactivar 1 unidad logarítmica de <i>Escherichia coli</i>	31
Tabla 19. Coste de los tratamientos basados en ozono para inactivar 1 unidad logarítmica de <i>Escherichia coli</i>	32
Tabla 20. Coste de los tratamientos con radiación UV/visible y valor de inactivación de <i>E. coli</i> tras 30 minutos de tratamiento.....	32
Tabla 21. Coste de los tratamientos con radiación UV/visible, H_2O_2 y TiO_2 para inactivar 1 unidad logarítmica de <i>Escherichia coli</i>	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de <i>E. coli</i>	4
Figura 2. Mecanismo general de la fotocatalisis	9
Figura 3. Colonias de <i>E. coli</i> en agar MacConkey	11
Figura 4. Planta piloto de lodos activos	13
Figura 5. Esquema de la instalación de ozonización	15
Figura 6. Cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS	16
Figura 7. Espectro solar natural y espectro simulado	16
Figura 8. Curvas de supervivencia microbiana	17
Figura 9. Inactivación de <i>E. coli</i> durante tratamientos de cloración con distintas dosis.....	20
Figura 10. Inactivación de <i>E. coli</i> en los tratamientos de cloración en función al parámetro CT	20
Figura 11. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> en función del ozono consumido	22
Figura 12. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> a diferentes tiempos en tratamientos basados en ozono	23
Figura 13. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> a diferentes tiempos en tratamiento UV/visible y TiO_2 /UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	24

MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto: la necesidad de nuevos métodos que garanticen la salubridad para la reutilización del agua.

El agua es un recurso natural imprescindible para la vida pero escaso, la cantidad total de agua dulce accesible es menor al 1% (Shiklomanov y Rodda, 2003). En las últimas décadas existe un incremento en su demanda debido al rápido crecimiento de la población mundial, del nivel de vida y de las distintas actividades humanas que a su vez contribuyen a la contaminación de dicho recurso. Por ello existe la necesidad de optimizar los recursos existentes, gestionando el agua de una manera eficiente, siendo la reutilización de aguas de salida de depuradora una alternativa cada vez más extendida. Dicha técnica permite aumentar los recursos hídricos, mejorar la calidad del agua para usos agrícolas, urbanos, industriales, medioambientales y recreativos y, además, asegura una continuidad en la reutilización.

La principal preocupación asociada a la reutilización de las aguas residuales tratadas es el potencial de transmisión de enfermedades infecciosas por bacterias patógenas. Este hecho consiste en uno de los principales obstáculos para la recuperación y reutilización del agua (Schaefer *et al.*, 2004) y es por esto que el control microbiológico del agua y su desinfección adquiere una importancia máxima.

En España, el Real Decreto 1620/2007 del 7 de diciembre establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas y diferencia distintas calidades de agua en función de su destino (agrícola, recreativo, urbano, industrial y ambiental). Dependiendo de su uso final, el agua puede ser sometida a diferentes tratamientos de regeneración (tratamientos terciarios) con el objetivo de cumplir la legislación vigente. Entre los parámetros microbiológicos para determinar dicha calidad se encuentra la bacteria *Escherichia coli*, que actúa como indicadora de la contaminación fecal.

Para garantizar la salubridad del agua existen diferentes métodos. Entre estos, la cloración se puede considerar como el método tradicional y más común en la desinfección de aguas (Koivunen y Heinonen-Tanski, 2005). El cloro posee un poder oxidante muy elevado que favorece la destrucción de la materia orgánica y un alto poder germicida con bajo coste. Sin embargo, cada vez es mayor la preocupación por los compuestos organoclorados, como los trihalometanos, formados por la reacción del cloro con la materia orgánica presente en el agua (Rook, 1974) y que resultan dañinos para la salud (Nikolaou *et al.*, 2004).

Es por todo esto que se están investigando y desarrollando nuevos métodos que garanticen la salubridad del agua, tales como los procesos de oxidación avanzada. El objetivo de estos procesos es generar especies reactivas del oxígeno, como el radical hidróxilo, con gran capacidad oxidante y germicida, capaces de mineralizar la materia orgánica y eliminar la carga biológica presente en el agua (Glaze *et al.*, 1987). Entre los más utilizados se encuentran la ozonización, el sistema peroxona, la irradiación ultravioleta, la fotocátalisis heterogénea y el proceso Fenton.

Para que las técnicas de oxidación avanzada puedan aplicarse como alternativa o tratamiento complementario a la desinfección convencional su eficacia debe ser estudiada permitiendo asegurar que el posterior uso del agua no tenga asociado ningún riesgo patológico.

1.2. Objetivos

El presente Trabajo de Fin de Máster tiene como principal objetivo determinar el poder de desinfección de diferentes técnicas aplicables en la regeneración de aguas de salida de depuradora sobre el indicador bacteriano *Escherichia coli*. Las técnicas utilizadas serán la cloración, la ozonización, el sistema peroxona (O_3/H_2O_2), la fotólisis (H_2O_2 /radiación UV/visible), la fotocatalisis (TiO_2 / radiación UV/visible) y la fotocatalisis combinada con peróxido de hidrógeno. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos a cumplir:

- Determinar la influencia de las principales variables que pueden afectar a la desinfección: tipo de tratamiento, tiempo y dosis de los agentes empleados, en la inactivación de *Escherichia coli*.
- Elaborar un análisis comparativo de los diferentes tratamientos aplicados mediante cinéticas de inactivación bacteriana.
- Comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de un estudio previo realizado sobre un indicador bacteriano diferente: *Enterococcus sp.* presente en aguas residuales depuradas.
- Realizar un estudio económico de los distintos tratamientos de desinfección empleados.

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.

2. AGUAS RESIDUALES Y CONTROL MICROBIOLÓGICO

Las aguas residuales urbanas deben ser tratadas antes de ser devueltas al cauce natural para minimizar el impacto que los contaminantes presentes pueden causar en el medio ambiente. La línea de tratamiento de una EDAR consta generalmente de un pretratamiento en el que se realizan operaciones de desbaste, desarenado y desengrasado, eliminando los gruesos, arenas y aceites presentes; un tratamiento primario que tiene como objetivo eliminar los sólidos en suspensión y materiales flotantes mediante coagulación-floculación; y seguidamente el tratamiento secundario o biológico en el que una serie de microorganismos contribuyen a reducir la alta carga de materia orgánica presente en las aguas residuales urbanas (Ramalho, 1996).

Mediante el proceso de depuración se consigue eliminar gran parte de los contaminantes presentes en el agua residual, pero para conseguir una calidad de efluente superior se puede implementar un tratamiento terciario. Dicho tratamiento dependerá del posterior uso que se le dé al agua, y permite mejorar distintas características tales como la materia orgánica, nutrientes, sólidos en suspensión, sustancias inorgánicas y/o la carga microbiana todavía presente, ya que tras el proceso de depuración el agua puede contener gran variedad de organismos patógenos (virus, bacterias y protozoos) (Mosteo *et al.*, 2013). En la Tabla 1 se muestran los valores de algunos parámetros físico-químicos y biológicos que presenta el agua a la salida de una EDAR.

Tabla 1. Características físico-químicas y microbiológicas del efluente de una EDAR (Mosteo *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2011).

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
pH	7,22-8,81	Carbono orgánico total	9- 27,4 mg/L
Conductividad	832-3220 $\mu\text{S}/\text{cm}$	Demanda de cloro	31-59 mg/L Cl_2
Turbidez	1,7-34,7 UNT	<i>Escherichia coli</i>	$6 \cdot 10^2 - 7,3 \cdot 10^8$ UFC/100 mL
DQO	50-112 mg/L O_2	<i>Enterococcus faecalis</i>	$1,2 \cdot 10^2 - 3,2 \cdot 10^5$ UFC/100 mL
DBO ₅	12,5-17,5 mg/L O_2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,6 \cdot 10^4 - 3,9 \cdot 10^5$ UFC/100 mL
SS	4-56 mg/L	<i>Staphylococcus aureus</i>	$2 \cdot 10^4 - 3,2 \cdot 10^5$ UFC/100 mL
NH_4^+	1,8-37,7 mg/L NH_4^+	<i>Clostridium perfringens</i>	$<1 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^3$ UFC/100 mL

La directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas, transpuesta a la legislación española mediante el R. D. 11/1995, establece los requisitos de los vertidos procedentes de EDARs, contemplando la demanda biológica de oxígeno ($\text{DBO}_5 \leq 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ O}_2$, % reducción 70-90), la demanda química de oxígeno ($\text{DQO} \leq 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ O}_2$, % reducción 75) y los sólidos en suspensión ($\text{SS} \leq 35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) en todos los casos; en el caso de vertidos en zonas sensibles a la eutrofización establece además límites para el fósforo total ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ P}$) y el nitrógeno total ($15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ N}$).

Para poder reutilizar el agua, se debe cumplir en España el R.D. 1620/2007 que establece los criterios de calidad en función del uso posterior al que sea destinada (Anexo I). Para ello, fija diferentes límites máximos de sólidos en suspensión, turbidez, nemátodos intestinales y *Escherichia coli*. Además, puede contemplar otros criterios como *Legionella* sp. si existe riesgo de aerolización o nitratos si se va a proceder a la recarga de acuíferos.

Debido a la complejidad y al coste de analizar determinados patógenos se han utilizado ampliamente los indicadores fecales como criterio de calidad del agua para predecir su

potencial peligrosidad microbiana (Anexo II). Las bacterias que se encuentran frecuentemente en el efluente de una EDAR son las bacterias entéricas eliminadas a través de la materia fecal. Entre ellas, el grupo de los coliformes es un indicador eficaz debido a que éstas habitan en el tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente e indican la posible presencia de agentes patógenos que pueden encontrarse en las heces (Salgot *et al.*, 2006). Además de suponer un riesgo para la salud, la contaminación microbiológica tiene otros impactos sobre el agua: aumenta la turbidez, la demanda química de oxígeno, produce malos olores, y puede afectar negativamente a la biota natural.

La especie *Escherichia coli*, comúnmente llamada *E. coli*, es el indicador de la contaminación fecal más utilizado, ya que se trata del organismo más abundante del colón (entre 10^7 - 10^8 por gramo de heces), los análisis son menos complejos y presentan un bajo precio de cuantificación (Salgot *et al.*, 2006). Esta bacteria pertenece al género *Escherichia* de la familia *Enterobacteriaceae*, es anaerobia facultativa pudiendo desarrollarse por fermentación o respiración, gramnegativa y no formadora de esporas. Se trata de bacilos cortos que se presentan por separado o en parejas, móviles con flagelos peritricos y a menudo presentan fimbrias (Figura 1). Son catalasa positiva, oxidasa negativa, la mayoría fermentadores de lactosa y glucosa y capaces de reducir nitratos a nitritos. Ciertas cepas son residentes inocuos habituales del intestino, mientras que otras pueden causar infecciones del sistema digestivo, urinario, sanguíneo y del sistema nervioso central (Schaechter, 2009a).

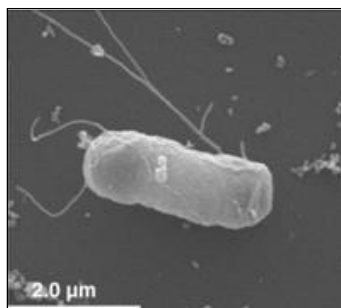


Figura 1. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de *E. coli* (Yuk *et al.*, 2010)

Dado que la legislación sobre reutilización de aguas establece a *E. coli* como criterio de calidad, es importante conocer cómo las diferentes técnicas de desinfección afectan en su inactivación. También hay que tener presente que no todas las bacterias responden igual a un mismo agente desinfectante, ya que su resistencia puede variar entre géneros y especies (Malato *et al.*, 2009). Por tanto, es interesante comparar la inactivación con otro tipo de microorganismos (i. e. *Enterococcus sp.*), siempre con vistas a minimizar el riesgo microbiológico asociado a la reutilización de las aguas.

Enterococcus sp. son bacterias grampositivas, que poseen una pared celular más gruesa y pueden resultar más difíciles de inactivar. Al igual que *E. coli*, son de origen fecal y se encuentran comúnmente en el agua de salida de depuradora. 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, quimioheterótrofas, y mesófilas.

3. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

La desinfección es la reducción del número de microorganismos en un producto hasta un nivel específico y apropiado para su uso posterior y, por tanto, es una barrera fundamental de la exposición humana a los patógenos causantes de enfermedades (Schaechter, 2009b).

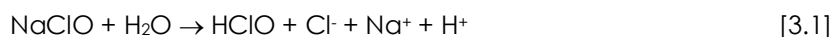
Los tratamientos de desinfección se basan tanto en métodos físicos como químicos y su eficacia dependerá de su habilidad para producir daños celulares. Entre los factores que influyen sobre el poder bactericida destacan el estado físico de los microorganismos, la materia orgánica del agua, el pH, la temperatura, la concentración del agente desinfectante y el tiempo de contacto. Si la desinfección se fundamenta en la generación de especies oxidantes, será necesario tener en cuenta la dosis del producto para satisfacer los requerimientos, tanto de inactivación bacteriana como los de oxidación de compuestos del agua.

A continuación se describen diferentes tratamientos de desinfección, tanto convencionales como basados en procesos de oxidación avanzada.

3.1. Cloración

La utilización de cloro es el método de desinfección más común y uno de los mayores logros del siglo XX, ya que permitió a la población disponer de agua potable previniendo así enfermedades letales transmitidas vía hídrica.

Se utilizan numerosos derivados clorados para llevar a cabo las desinfecciones como cloro gas, hipoclorito sódico o dióxido de cloro. El hipoclorito sódico, conocido comúnmente como lejía, es la forma más utilizada en los sistemas de desinfección, en muchas plantas de tratamiento de agua se prefiere su uso ya que su almacenamiento es menos peligroso que el cloro líquido o gas. Se trata de un líquido transparente que se comercializa normalmente en concentraciones de 5, 10 y 15% en peso de cloro. Este compuesto se disocia en el agua formando ácido hipocloroso mediante la reacción 3.1 y este a su vez en ión hipoclorito según la reacción 3.2.



Las concentración de cloro molecular, ácido hipocloroso e ión hipoclorito varían en función del pH del medio, la presencia de sales y la temperatura. Entre ellos, el compuesto más efectivo para la inactivación de microorganismos es el ácido hipocloroso que tiene el mayor potencial de oxidación del cloro, y predomina en el agua a valores de pH de 8-9.

El cloro que se añade al agua residual depurada reacciona rápidamente con el nitrógeno amoniacal presente, dando lugar a la formación de cloraminas (NH_2Cl , N_2HCl , N_3Cl) que tienen cierto poder desinfectante. A su vez, se producen otras reacciones del cloro libre y de las cloraminas con otros iones inorgánicos, reduciendo ambos compuestos a ión cloruro, sin poder bactericida. Después de un minuto, el consumo de cloro se produce por reacciones con compuestos orgánicos, pero de manera más lenta (Black & Veatch Corporation, 2010).

Los mecanismos de acción del cloro sobre los microorganismos son varios. El cloro penetra por difusión a través de la membrana celular, que en ocasiones puede ir acompañado por reacciones con los componentes que la forman, pero los mayores daños se producen por ataque a componentes internos (ácidos nucleicos y enzimas) lo que deshabilita funciones intracelulares como el transporte de nutrientes o la respiración de la célula (Cho *et al.*, 2010).

Para llevar a cabo la cloración se deben tener en cuenta principalmente los siguientes parámetros: dosis o concentración de cloro (C) y tiempo de contacto (T). Además, para que el tratamiento de desinfección sea efectivo se debe operar en condiciones de agitación logrando una buena mezcla del reactivo.

El cloro tiene un poder germicida de amplio espectro, poder residual en los sistemas de distribución, es fácilmente medible y controlable y tiene bajo coste. Por otro lado, el inconveniente de utilizarlo como desinfectante radica en la formación de subproductos potencialmente cancerígenos y teratogénicos (WHO, 2000). Durante la cloración, la materia orgánica presente en el agua reacciona con el cloro añadido dando lugar a compuestos llamados trihalometanos (THM). Bajo esta denominación se agrupan fundamentalmente el cloroformo, el bromodicloroetano, el dibromoclorometano y el bromoformo. También pueden formarse ácidos haloacéticos y acetonitrilos.

3.2. Procesos de oxidación avanzada

Los POA agrupan un conjunto de procesos que son capaces de generar especies reactivas del oxígeno (ROS) con un alto poder oxidante y de ataque poco selectivo. Las principales especies generadas son los radicales hidroxilo (OH^\bullet) que son los más potentes con un potencial de oxidación de 2,80 eV, los radicales superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), los radicales hidropéroxido (HO_2^\bullet) y moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lanao, 2012).

Durante los POA se producen un gran número de reacciones que pueden ser iniciadas mediante fotólisis, ozono, peróxido de hidrógeno, calor, etc. El grado de oxidación depende de diversos factores, como la concentración de contaminantes, de oxígeno, el pH, la temperatura y la presencia de "scavengers" o secuestradores de radicales, como el ión bicarbonato (Parsons, 2004).

Los mecanismos de acción de las distintas especies sobre los microorganismos son variados. Los radicales OH^\bullet son capaces de atacar a la mayoría de componentes celulares; las moléculas de H_2O_2 son solubles en lípidos, lo que les permite traspasar la membrana celular e iniciar procesos de peroxidación lipídica y oxidación de aminoácidos; los radicales superóxido pueden liberar hierro de las proteínas ferrosulfatadas comenzando reacciones Fenton intracelulares que generaran nuevos radicales. Se suceden así una serie de reacciones en cadena que provocan un estrés oxidativo letal para las células (Fina, 2006). No obstante, la principal desventaja de estos procesos es su elevado coste.

En los siguientes apartados se describen los POA que se han aplicado en el presente trabajo de investigación, basados en ozono y radiación UV/visible.

3.2.1. Tratamientos basados en ozono

El ozono (O_3) fue utilizado por primera vez en el tratamiento de agua potable en 1893, pero el descubrimiento de los trihalometanos en la década de los 70 impulsó esta técnica para procesos de desinfección y de oxidación, tanto en aguas naturales como residuales. Se trata de un gas azulado de olor metálico y picante, potente oxidante y desinfectante eficiente, su potencial de oxidación es 2,07 eV. Es un compuesto inestable que se descompone fácilmente produciendo oxígeno, por lo que debe ser generado *in situ* mediante un ozonizador.

El ozono puede reaccionar con los compuestos de una disolución acuosa mediante dos mecanismos: directo e indirecto o radicalario (Hoigné y Bader, 1976). En el mecanismo directo se produce la acción directa de compuestos por el propio ozono molecular, proceso relativamente más lento que el mecanismo indirecto, en el que se descompone el ozono formando $^\bullet\text{OH}$ libres,

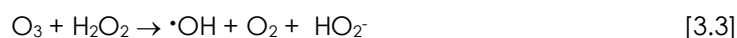
especies con mayor poder oxidativo que el ozono, que atacarán de forma no selectiva la materia orgánica. Para favorecer el mecanismo radicalario puede combinarse el ozono con otras sustancias, como el peróxido de hidrógeno o catalizadores metálicos.

Además de la acción radicalaria, la penetración del ozono a través la barrera protectora de las células va acompañada por la reacción con diversos componentes de la pared celular, liberándose proteínas y produciéndose la peroxidación de lípidos y cambios en la permeabilidad. Hasta que estas reacciones no se han completado lo suficiente, la penetración del ozono en el citoplasma y la reacción directa con componentes intracelulares son limitados, por lo que la muerte celular causada por el ozono está relacionada principalmente con daños en la superficie celular (Cho *et al.*, 2010).

El ozono no forma subproductos de desinfección organoclorados, pero si pueden aparecer compuestos bromados si el agua tratada contiene bromuros, además de otros productos orgánicos como aldehídos o cetonas (USEPA, 1999). El ozono por su inestabilidad carece de efecto residual en el agua, por lo que solo puede ser utilizado como desinfectante primario.

Sistema peroxona (O_3/H_2O_2)

El sistema peroxona provoca una destrucción de la carga orgánica y microbiana adicional a la conseguida mediante la ozonización por sí sola. La combinación de ozono y peróxido de hidrógeno produce la oxidación directa selectiva del ozono a la vez que el peróxido de hidrógeno favorece la formación rápida de radicales hidroxilo. El H_2O_2 es un iniciador potente del mecanismo radicalario del ozono (Glaze *et al.*, 1987), ya que es capaz de disociarse en radicales hidroperóxido (HO_2^*) que aceleran la descomposición de las moléculas de ozono por una serie de reacciones en cadena, entre las que destacan las ecuaciones 3.3 y 3.4.



La relación entre la concentración de O_3 y H_2O_2 es un parámetro a optimizar en el tratamiento, ya que un exceso de peróxido de hidrógeno puede conducir a reacciones competitivas disminuyendo la presencia de $\cdot OH$ [3.5-3.6].



3.2.2. Tratamientos basados en radiación UV/visible

A finales del siglo XIX Downs y Blunt reportaron los efectos germicidas de la energía radiante del sol, siendo en la actualidad la luz ultravioleta una alternativa de creciente popularidad al uso de químicos para la desinfección de agua para consumo humano, residual e industrial.

Radiación solar

La radiación solar es el conjunto de radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol, que comprenden desde el infrarrojo hasta el ultravioleta (UV). En este intervalo, el rango UV (7% de la radiación solar) presenta las mejores propiedades para la desinfección, pudiéndose diferenciar tres regiones del espectro: UVC (200-280 nm), UVB (280-315 nm) y UVA (315-400 nm) (Meulemans, 1986). La absorción de radiación de longitud de onda corta por la capa de ozono de la tierra impide que alcancen la tierra cantidades significativas de UVB y UVC (UNEP, 2010) con mayor potencial de inactivación de microorganismos por su ataque a los ácidos nucleicos.

La radiación UVA no es suficientemente energética para provocar daños sobre las bases de los ácidos nucleicos, pero sí puede bloquear la cadena de transporte celular (Jagger, 1972). Además, la desinfección se produce por acción fotolítica directa, alterando los componentes moleculares esenciales en sus funciones vitales, y activando sustancias fotosensibles presentes que pueden reaccionar con el oxígeno produciendo especies reactivas en el agua y en el interior de las células (Blanco *et al.*, 2009). Se puede producir un efecto sinérgico en la velocidad de inactivación de bacterias cuando la temperatura supera los 50 °C (Wegelin *et al.*, 1996).

En un tratamiento por radiación UV/visible influyen principalmente la intensidad de la radiación, el tiempo de exposición y las características del agua. En general, a mayor intensidad y tiempo de exposición más eficaz es el tratamiento. En cuanto a las características del agua, tiene especial importancia la presencia de partículas que pueden afectar a la eficiencia de desinfección protegiendo a los microorganismos de la radiación y de la dispersión de la luz. Al igual que la turbidez producida por partículas, los agregados de microorganismos pueden ejercer el mismo efecto. Esta técnica no produce subproductos mutagénicos o carcinógenos, y la formación de los subproductos puede considerarse despreciable.

Además, los métodos basados en irradiación con luz solar son más baratos al aprovechar la energía del sol, incluso pueden ser muy sencillos y su uso se está extendiendo en países en desarrollo con escasez de agua potable.

Radiación solar con H₂O₂

El proceso H₂O₂/radiación UV/visible está generando interés en la inactivación de patógenos presentes en el agua debido a la sinergia entre el H₂O₂ y la radiación solar. La irradiación del H₂O₂ con fotones de longitud de onda menores a 300 nm produce $\cdot\text{OH}$ mediante el proceso de fotólisis (reacción 3.7).



La radiación solar que llega a la superficie terrestre no contiene los fotones mencionados, por lo que es ineficiente en la generación de $\cdot\text{OH}$ por esta vía. Sin embargo, se logra un efecto bactericida combinado, incluyendo daños sobre los microorganismos asociados al H₂O₂ por la generación de $\cdot\text{OH}$ mediante reacciones Fenton intracelulares debido al contenido natural de hierro y la difusión de H₂O₂ a través de la membrana (García-Fernández *et al.*, 2012).

En general, mayores dosis de H₂O₂ contribuirán a una mayor inactivación celular. Sin embargo, al igual que en el sistema peroxona, es importante llegar a un compromiso en las concentraciones de peróxido de hidrógeno para evitar su actuación como secuestrador de radicales hidroxilo.

Fotocatálisis

El catalizador semiconductor más estudiado es el dióxido de titanio (TiO₂) por sus características (i.e. alta fotoactividad, bajo coste, estabilidad química y biológica e inocuidad) (Mills *et al.*, 1993).

El TiO₂ presenta dos zonas electrónicas, la banda de valencia y la banda de conducción, que presentan una alta y baja densidad de electrones respectivamente. Entre ambos niveles existe una diferencia de energía, llamado salto de energía, de 3,2 eV. Cuando el catalizador es irradiado con luz UV a longitudes de onda entre 300 y 390 nm (equivalente al salto de energía) los electrones de la banda de valencia se excitan pasando a la banda de conducción, dejando un hueco en la banda de valencia. De esta forma se generan en la superficie del catalizador estructuras duales electrón-hueco (e^-/h^+), a partir de ellas se inician reacciones de oxidación y

reducción en su superficie dando lugar a la formación de ROS, como el radical hidroxilo (Figura 2). Se puede producir una recombinación de los pares e^-/h^+ por lo que es necesario que exista un oxidante que actúe como aceptor de electrones.

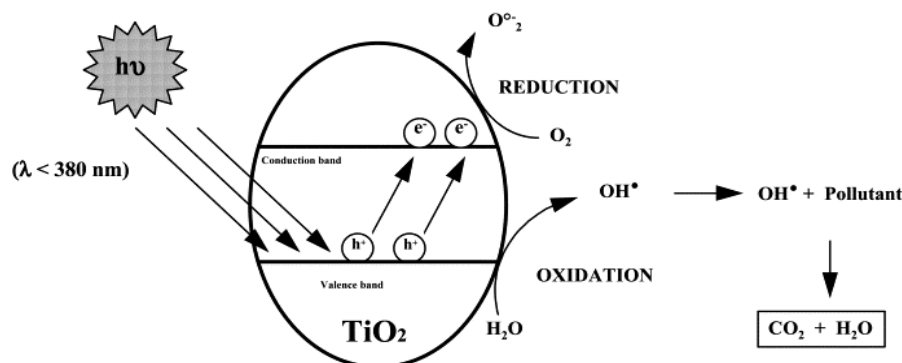


Figura 2. Mecanismo general de la fotocatalisis (Robert y Malato, 2003)

Las ROS generadas causaran daños celulares y estrés oxidativo. También las partículas de TiO_2 tienen vía libre para introducirse en las células dañadas, ya que tienen un tamaño 30 veces inferior, lo que lleva al ataque directo de los componentes intracelulares, acelerando su muerte (Huang *et al.*, 2000).

Las mayores ventajas de este POA son que trabaja a presión y temperatura ambiente, la posibilidad de utilizar la luz solar para la irradiación y el bajo coste del catalizador. Sin embargo, presenta desventajas importantes como las dificultades a mayor escala para conseguir alcanzar una radiación uniforme en toda la superficie del catalizador o la necesidad de un tratamiento posterior de separación para recuperar el catalizador en suspensión, lo cual encarece el proceso.

Una de las limitaciones del proceso TiO_2 /radiación UV/visible es la recombinación de los pares e^-/h^+ que provoca una disminución de la efectividad del proceso. Para inhibir dicho efecto pueden adicionarse oxidantes auxiliares, como el peróxido de hidrógeno, incrementando la concentración de $\cdot\text{OH}$ en la superficie del catalizador (Robert y Malato, 2003).

La adición de H_2O_2 en dosis adecuadas aumenta la velocidad de reacción, aumentando la inactivación bacteriana, y permitiendo la utilización de foto-reactores de dimensiones menores reduciendo así el coste del proceso. Sin embargo, este oxidante puede actuar como secuestrador de radicales y un exceso de H_2O_2 puede formar peroxocompuestos en la superficie del TiO_2 perjudicando el proceso fotocatalítico, ya que son menos reactivos (Kositzi *et al.*, 2004).

Los mecanismos de desinfección mediante este método incluyen los descritos en la radiación solar, su combinación con el peróxido de hidrógeno y la fotocatalisis.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Metodología analítica

4.1.1. Análisis de parámetros físico-químicos

En la Tabla 2 se presentan los parámetros físico-químicos del agua que se han analizado en el presente proyecto de Máster, así como los métodos analíticos y la instrumentación utilizada. Una información más extensa de estos métodos se encuentra disponible en el Anexo III de este documento.

Tabla 2. Instrumentación utilizada para la caracterización de las muestras de agua, metodología, rango de medida y error.

Parámetro	Método	Instrumento	Marca y modelo	Rango de medida	Error
pH	4500-HB <i>Standard Methods</i>	pH-metro	CRISON GLP 21	1-14	± 0,02
Conductividad	UNE-EN-ISO 27888	Conductímetro	CRISON Basic 30	0,01 - 19999 $\mu\text{S}/\text{cm}$	± 0,02 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Turbidez	ISO 7027	Turbidímetro	HANNA <i>Instruments LP 2000</i>	0-1000 UNT	± 0,5 UNT
Sólidos en suspensión totales (SST)	2540D <i>Standard Methods</i>	Espectofotómetro	Hach LANGE DR 2800	5 – 750 mg/L	± 0,1 mg/L
Demanda química de oxígeno (DQO)	410.4 EPA (adaptado)	Fotómetro multiparamétrico de sobremesa	HANNA <i>instruments HI 83099</i>	0-150 mg/L	± 1 mg/L
		Reactor de DQO	HANNA <i>instruments HI 839800</i>	-	-
Carbono orgánico total (COT)	5310 B <i>Standard Methods</i>	Analizador de COT	SHIMADZU TOC-VCSH	CT: 0 – 25000 mg/L Cl: 0 – 300000 mg/L	-
H ₂ O ₂	Colorimétrico	Test indicador de peróxidos	Merckoquant	0 - 100 mg/L 100-1000 mg/L	-
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	D1426-92 Manual ASTM (adaptado)	Fotómetro multiparamétrico de sobremesa	HANNA <i>instruments HI 83099</i>	0 – 10 mg/L	±0,05mg/L
Demanda de cloro (DC)	5710 B <i>Standard Methods</i>	Valoración volumétrica	-	-	-
Cloro libre residual	Colorimétrico	Test indicador de cloro	Merckoquant	0 – 500 mg/L	-

4.1.2. Análisis microbiológico

Tal y como se ha comentado en los objetivos de este trabajo, el microorganismo objeto de estudio es el indicador de contaminación fecal *Escherichia coli*. Todo el material utilizado en el análisis microbiológico es esterilizado, con el fin de evitar la posible contaminación por otros organismos. La esterilización se realiza mediante temperaturas de 121 °C y 1 bar de presión durante 15 minutos.

Equipos

Los equipos utilizados en los análisis microbiológicos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Equipos utilizados para análisis microbiológicos y función.

Instrumento	Marca	Modelo	Funcion
Autoclave	J.P. Selecta	437-P	Esterilización de material
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Mantenimiento del medio de cultivo en estado líquido
Agitador Vortex	Velp Scientifica	ZX3	Homogeneización de soluciones en tubos de ensayo
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Siembra por filtración
Estufa de cultivo	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Incubación bacteriana
Contador de colonias manual	Interscience	Scan 100	Recuento de colonias bacterianas
Mechero bunsen	-	-	Crear ambiente de esterilidad

Medio de cultivo

Los medios de cultivo son ambientes artificiales diseñados para favorecer el crecimiento microbiano en el laboratorio. Para asegurar el desarrollo óptimo de *Escherichia coli* se utiliza el agar selectivo MacConkey (Scharlau). Las colonias de *E. coli* adquieren un color rosa-violeta con un halo turbio alrededor causado por la precipitación de sales biliares consecuencia de una disminución del pH en el medio. En el Anexo IV se describen la composición y preparación del medio de cultivo.

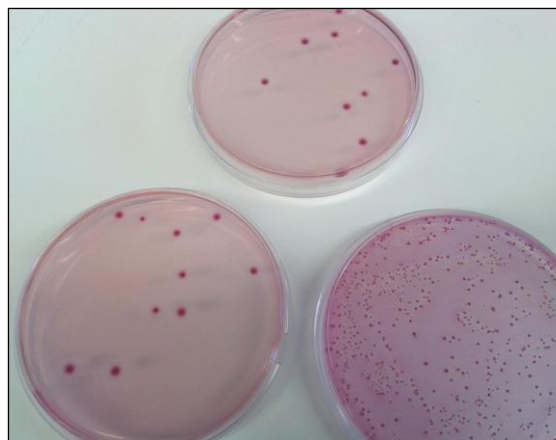


Figura 3. Colonias de *E. coli* en agar MacConkey.

Métodos de siembra

El análisis de *E. coli* se realiza siguiendo dos procedimientos. El método de filtración por membrana de la Norma Española UNE-EN ISO 9308-1 "Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes" y el método normalizado de siembra en superficie 9215 C (Clesceri *et al.*, 2005).

La elección de uno de los dos métodos depende de la concentración bacteriana presente en la muestra. Así, cuando la población bacteriana no es muy elevada se utiliza el método de filtración por membrana. Sin embargo, cuando la población es significativa se utiliza el método de siembra en superficie. Este último método requiere la realización de diluciones decimales seriadas de la muestra. En el anexo IV se explican detalladamente los métodos de siembra y la preparación de diluciones decimales seriadas.

Incubación

Las placas sembradas se incuban en la estufa a 42 °C (± 2 °C) durante 24 horas.

Para un correcto desarrollo bacteriano las placas se colocan en la estufa invertidas (es decir la tapa haciendo de base), con el fin de evitar que el agua condensada caiga sobre el agar y las bacterias permanezcan fijas en el sustrato. Al finalizar el periodo de incubación se procede a su recuento.

Recuento

El recuento en placa, o recuento de viables, se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias con frecuencia crecen unidas en cadenas o en agrupaciones. Por consiguiente, a menudo una colonia se produce como resultado de segmentos cortos de una cadena o de un agregado bacteriano. Por otro lado, pueden existir células que no sean capaces de formar colonias. Por tanto, para reflejar esta realidad los recuentos en placa se informan como unidades formadoras de colonias (UFC) (Tortora *et al.*, 2007) y los datos de cada tratamiento realizado se expresan en $\text{UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$.

Para un recuento correcto el número de colonias presente en las placas no debe ser muy alto, ya que algunas colonias pueden fusionarse, ni muy bajo para que la cantidad de colonias sea significativa. En el método de filtración se realiza el recuento de placas con 20 -200 UFC, y en el método de siembra en superficie con 30 - 300 UFC (Clesceri *et al.*, 2005). En el caso de no detectar actividad microbiana en la placa sembrada en superficie el valor tomado es $1 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$.

El recuento bacteriano se obtiene aplicando la ecuación 4.1, donde F_d es el factor de dilución, que se obtiene realizando la inversa de la dilución de la placa seleccionada.

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

4.2. Muestras de agua

Las muestras utilizadas para estudiar los diferentes tratamientos de desinfección se obtienen mediante la depuración de agua residual sintética en una planta piloto de lodos activos a escala de laboratorio (Figura 4) situada en el laboratorio del grupo de investigación de "Calidad y Tratamientos de Aguas", perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.



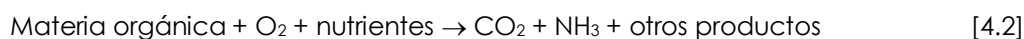
Figura 4. Planta piloto de lodos activos

El agua a depurar se prepara en el laboratorio adicionando diversos compuestos (Tabla 4), según la Directiva 82/243/CEE del año 1982.

Tabla 4. Composición del agua de alimentación de la planta piloto (Directiva 82/243/CEE).

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

La planta piloto consta de un reactor biológico con capacidad de 2 litros y un decantador de 3 litros. El agua residual sintética es alimentada a un caudal aproximado de 1 L · h⁻¹ al reactor biológico. A éste se le proporciona oxígeno, mediante aireación constante, necesario para los microorganismos encargadas de la depuración. A su vez, este proceso de aireación homogeneiza los fangos. La reacción general que tiene lugar en el reactor se describe en la ecuación 4.2:



A continuación, el agua pasa al decantador donde sedimentan los fangos; parte de ellos son recirculados al reactor para mantener una concentración adecuada de microorganismos (entre 3000-3500 mg · L⁻¹). El agua clarificada rebosa en la parte superior del decantador y es recogida, contando ya con unas características que simulan al agua tratada en una depuradora convencional (Tabla 5).

Tabla 5. Valores medios de las características físico-químicas del agua de salida de la planta piloto.

Parámetro	Valor
pH	7,5
Conductividad	767 μS/cm
Turbidez	26,0 UNT

Parámetro	Valor
DQO	38,8 mg/L O ₂
DBO ₅	19,7 mg/L O ₂
SST	7,3 mg/L
NH ₃	5,7 mg/L NH ₄ ⁺
Carbono orgánico total	7,2 mg/L
Demanda de cloro	39,4 mg/L Cl ₂

Antes de empezar con los experimentos de desinfección las muestras de agua recogidas a la salida de la depuradora se autoclavan en botellas de vidrio, con el objetivo de eliminar la carga microbiana presente.

A continuación, una vez que las muestras se encuentran a temperatura ambiente, se realiza el proceso llamado fortificación, que consiste en aumentar de manera artificial la población bacteriana de una muestra. Para ello, se preparan suspensiones bacterianas concentradas a partir de cultivos puros de *Escherichia coli* y posteriormente se añaden a las muestras de agua. El procedimiento de fortificación de muestras se encuentra explicado en el anexo IV. En este caso se fortifica hasta una concentración de *E. coli* de $10^7 - 10^8$ UFC · 100 mL⁻¹.

4.3. Tratamientos de desinfección aplicados

Los tratamientos escogidos coinciden con los estudiados por Valero (2013) para la desinfección de *Enterococcus* sp., con el objetivo de comparar su eficacia en la inactivación de *Escherichia coli*.

El cálculo de la inactivación bacteriana necesario para evaluar la eficacia de un tratamiento de desinfección se realiza con unidades logarítmicas, utilizando la expresión 4.3, donde N_t es la población que sobrevive a un tiempo determinado y N_0 la población inicial.

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

4.3.1. Cloración

Los ensayos de cloración se realizan sobre 300 mL de muestra fortificada en reactores de 600 mL. El desinfectante que se aplica es hipoclorito sódico (NaClO, 5%, Panreac) adicionando a la muestra distintas dosis de cloro (3,8, 15 y 30 mg Cl₂ · L⁻¹). La dosis de 3,8 mg Cl₂ · L⁻¹ se corresponde con la demanda de cloro de un agua natural (Lanao, 2012) y la de 30 mg Cl₂ · L⁻¹ con la demanda de cloro de la muestra utilizada.

Durante el tratamiento la muestra clorada se mantiene en agitación a 100 r.p.m. para favorecer su homogeneización. A partir del instante en el que se adiciona el reactivo se toman alícuotas a distintos intervalos (0,5; 1; 3; 5; 10; 20 y 30 minutos) para valorar el efecto del cloro sobre la población de estudio en el tiempo.

El cloro residual de las muestras extraídas se neutraliza con tiosulfato sódico (Na₂S₂O₃ · 5H₂O, 99,5%, Panreac) para evitar que el cloro siga ejerciendo su efecto bactericida sobre las poblaciones supervivientes. El análisis microbiológico se realiza inmediatamente una vez finalizado el experimento.

4.3.2. Tratamientos basados en ozono

Los tratamientos aplicados basados en ozono son la ozonización y el sistema peroxona. En ambos tratamientos el ozono fue generado *in situ* mediante un ozonizador (Fischer 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 (Figura 5). En la descarga eléctrica que se produce se consigue descomponer la molécula en oxígeno elemental, estos átomos se combinan con moléculas de oxígeno intactas dando lugar a moléculas de ozono. La descripción completa de la instalación se encuentra en el Anexo V.

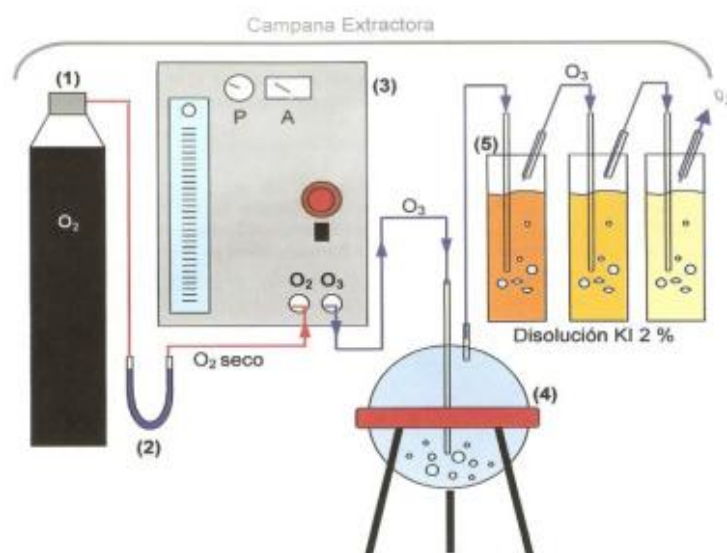
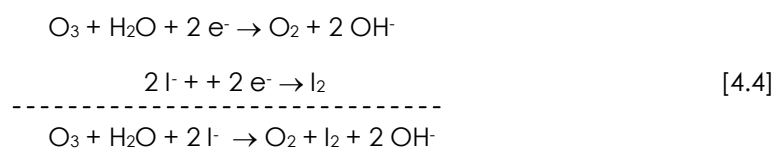


Figura 5. Esquema de la instalación de ozonización. (1. Oxígeno, 2. Silica gel, 3. Ozonizador, 4. Reactor, 5. Borbotadores).

El flujo de ozono introducido al reactor se mantiene constante ($888 \text{ mg O}_3 \cdot \text{h}^{-1}$) y es calculado mediante la calibración del equipo (Anexo V). Todo el ozono producido no llega a consumirse en la reacción, por lo que el exceso debe ser destruido. Para ello se conectan en serie al reactor varios borbotadores con una disolución de yoduro potásico al 2% (Figura 5). El ozono reacciona con el yoduro reduciéndose a oxígeno y el yoduro se oxida a yodo (I_2) según la reacción 4.4:



El ozono no consumido se calcula por valoración con tiosulfato de sodio (método yodométrico) descrito en detalle en el Anexo V.

El O_3 consumido por la muestra se calcula mediante la ecuación 4.5:

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

La cantidad de ozono residual disuelto en la muestra puede ser desestimada, ya que resulta despreciable en comparación con la cantidad de ozono no consumido.

Se tratan volúmenes de muestra de 1 L en un reactor de vidrio de 2 L de capacidad a temperatura ambiente. Tanto en la ozonización como en los tratamientos peroxona se realizan análisis microbiológicos a diferentes tiempos: 0,5; 1; 3; 6; 9 y 15 minutos. De esta forma se aplican

distintas dosis a las muestra según el tiempo seleccionado, pudiéndose relacionar la inactivación de *E. coli* con el ozono consumido por la muestra.

En los tratamientos peroxona se añade peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30% p/v, Panreac) en distintas dosis: 1,4 y 20 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Tras su adición se procede a la aplicación del ozono de forma inmediata. Las dosis coinciden con las aplicadas por Valero (2013) en aguas residuales para la inactivación de *Enterococcus sp.*

Se añade tiosulfato sódico (99,5%, Panreac) para neutralizar los efectos bactericidas del ozono y el peróxido de hidrógeno.

4.3.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible

Los métodos estudiados basados en radiación consisten en irradiación con radiación UV/visible, irradiación combinada con H_2O_2 , irradiación catalizada con dióxido de titanio (fotocatálisis) y la fotocátalisis combinada con H_2O_2 .

Con el fin de llevar a cabo todos estos métodos se emplea como fuente de irradiación una cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS (Figura 6).



Figura 6. Cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS

La cámara está provista de una lámpara de xenón que emite a longitudes de onda entre 290 y 800 nm. Mediante dos filtros que cubren la lámpara, uno de cuarzo y un filtro adicional de ventana (Xenochrome 320) se consigue una emisión situada entre 320 y 800 nm que comprende las radiaciones UVA y visible, eliminando el rango del UVB, lo que permite simular la radiación solar que alcanza la superficie terrestre, e impide que las radiaciones más energéticas inactiven de forma directa las bacterias (Figura 7).

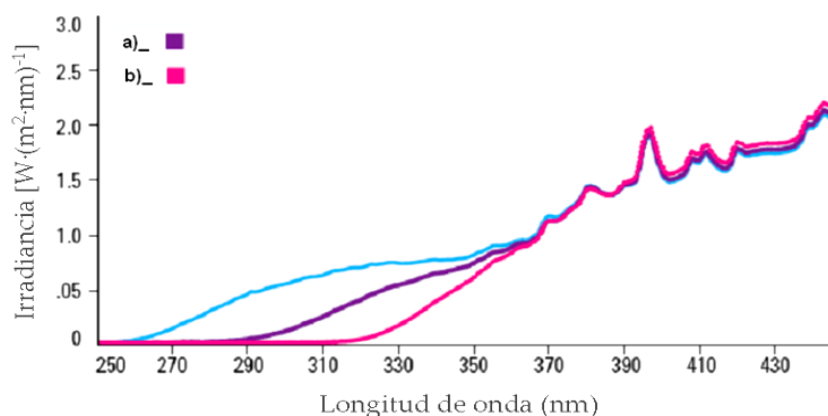


Figura 7. Espectro solar natural y espectro simulado (a. sin filtro de ventana, b. con filtro de ventana) (Miguel, 2010).

Para realizar todos los tratamientos basados en radiación UV/visible se colocan 150 mL de muestra en reactores de vidrio de cuarzo de 250 mL. Los reactores se introducen en la cámara solar y se someten a agitación, con el objetivo de homogeneizar y airear la muestra. La intensidad seleccionada de irradiación para los experimentos es de $500 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, que corresponde al 50% de la intensidad de la radiación solar natural ecuatorial al medio día y utilizada por diversos autores en sus estudios (Miguel, 2010; Lanao, 2012). La temperatura máxima alcanzada en los distintos experimentos es de 37°C .

En el caso de los experimentos realizados con peróxido de hidrógeno se añaden distintas dosis de éste: 1,4; 20; 200 y $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ (H_2O_2 , 30% p/v, Panreac), y seguidamente se procede a encender la cámara solar. Una vez finalizado el periodo de irradiación se neutraliza la acción del H_2O_2 añadiendo catalasa (Sigma Aldrich).

Para los ensayos de fotocatalisis se utiliza como catalizador TiO_2 comercial en forma de polvo (Degussa P25) en dosis de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, tal y como aconsejan distintos autores en tratamientos de fotocatalisis (Rincón y Pulgarín, 2003; Cho *et al.*, 2004; Ibarz, 2008).

Los experimentos basados en radiación tienen una duración de 30 minutos, excepto en aquellos en los que se utilizaron dosis de $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ en los que se realizan análisis microbiológicos a 5, 15, 30 y 45 minutos.

4.4. Tratamiento de datos: modelos cinéticos de inactivación microbiana

La microbiología predictiva pretende conocer la respuesta de las poblaciones microbianas a cualquier factor que pueda afectar a su supervivencia, con el fin de desarrollar modelos matemáticos que permitan predecir el ritmo de inactivación de los microorganismos de una población bajo unas condiciones determinadas.

Las curvas de supervivencia son gráficas que representan la relación entre la concentración de organismos supervivientes y la población inicial, en escala logarítmica, frente al tiempo. Se utilizan para representar los datos de inactivación bacteriana e interpretarlos (Figura 8). La inactivación puede producirse de forma lineal, pero frecuentemente atiende a curvas convexas, cóncavas o sigmoideas.

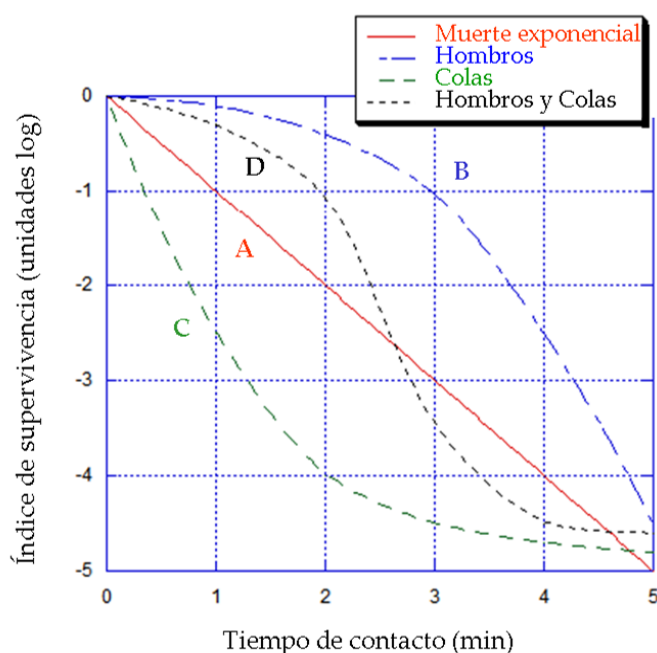


Figura 8. Curvas de supervivencia microbiana (Gyürek y Finch, 1998)

Con el fin de explicar la configuración de las distintas curvas, en la literatura existen diferentes modelos matemáticos, basados en enfoques teóricos y prácticos, que permiten estudiar la inactivación microbiana como un proceso cinético.

En el presente trabajo, los modelos utilizados para describir las gráficas de inactivación conseguidas se han obtenido de diferentes estudios (Tabla 6) (Lanao, 2012; Valero, 2013). En el Anexo VI se explican con más detalle cada uno de estos modelos.

Para el cálculo de los coeficientes cinéticos de cada modelo y tratamiento se utiliza la herramienta Solver de Excel (Microsoft) y el complemento GiNaFIT (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) (Geeraerd *et al.*, 2005).

Tabla 6. Modelos cinéticos de inactivación bacteriana aplicados.

Modelo cinético	Ecuación integrada	Coeficientes cinéticos	Referencia
Modelo de Hom	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -k_{ap} \cdot t^m$	k_{ap}, m	Hom, 1972
Modelo de Hom modificado	$\text{Ln} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nk'}\right)^m k \cdot C_0^n \left[1 - e^{\left(\frac{-nk't}{m}\right)}\right]^m$	k, k', n, m	Haas y Joffe, 1994
Modelo bifásico	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} \left[P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1-P) \cdot e^{-k_2 \cdot t} \right]$	P, k_1, k_2	Pruitt y Kamau, 1993
Modelo de Mafart	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p$	δ, p	Mafart <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 2000

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. También se realiza la representación gráfica de los valores obtenidos con los valores estimados.

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

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

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Inactivación de *Escherichia coli*

5.1.1. Cloración

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en los tratamientos de cloración. Las concentraciones iniciales de *Escherichia coli* varían entre $5,3 \cdot 10^7$ y $2,3 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹. En todos los tratamientos quedó cloro residual sin reaccionar al final del tratamiento.

Tabla 7. Valores de recuento (N_t) e inactivación de *E. coli* con diferentes dosis de Cl_2 y tiempos de tratamiento.

Tiempo (min)	Dosis de cloro					
	3,8 mg Cl_2 /L		15 mg Cl_2 /L		30 mg Cl_2 /L	
	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	$1 \cdot 10^8$	0,0	$2,3 \cdot 10^8$	0,0	$5,3 \cdot 10^7$	0,0
0,5	$2,9 \cdot 10^7$	-0,54	$8 \cdot 10^3$	-4,45	0	-7,7
1	$1,7 \cdot 10^7$	-0,76	$1,3 \cdot 10^3$	-5,24	0	-7,7
3	$1,7 \cdot 10^6$	-1,77	22	-7,01	0	-7,7
5	$6,5 \cdot 10^4$	-3,19	0	-8,35	0	-7,7
10	$6 \cdot 10^2$	-5,22	0	-8,35	0	-7,7
20	0	-8,0	0	-8,35	0	-7,7
30	0	-8,0	0	-8,35	0	-7,7

Cuando se utilizaron dosis de $3,8 \text{ mg } Cl_2 \cdot L^{-1}$ se logró una inactivación cercana a 1 unidad logarítmica tras 1 minuto de tratamiento. Conforme avanzó el proceso de cloración se disminuyó más carga microbiana, reduciéndose en más de 3 \log_{10} al cabo de 5 minutos, y logrando una inactivación a los 10 minutos de más de 5 unidades logarítmicas. A los 20 minutos de tratamiento la desinfección de *E. coli* fue completa.

Al aplicar dosis de $15 \text{ mg } Cl_2 \cdot L^{-1}$ se observó una inactivación de más de 4 \log_{10} en los primeros 30 segundos de tratamiento, mientras que en el intervalo siguiente, de medio minuto, la desinfección fue menor a la unidad logarítmica. Al cabo de 5 minutos el cloro eliminó toda presencia bacteriana. La curva de inactivación presentó una forma cóncava.

Al añadir la dosis mayor, $30 \text{ mg } Cl_2 \cdot L^{-1}$, y cumplir la demanda de cloro de la muestra, la inactivación fue de 7,7 \log_{10} en 30 segundos, lográndose una desinfección total en ese corto periodo de tiempo (Figura 9).

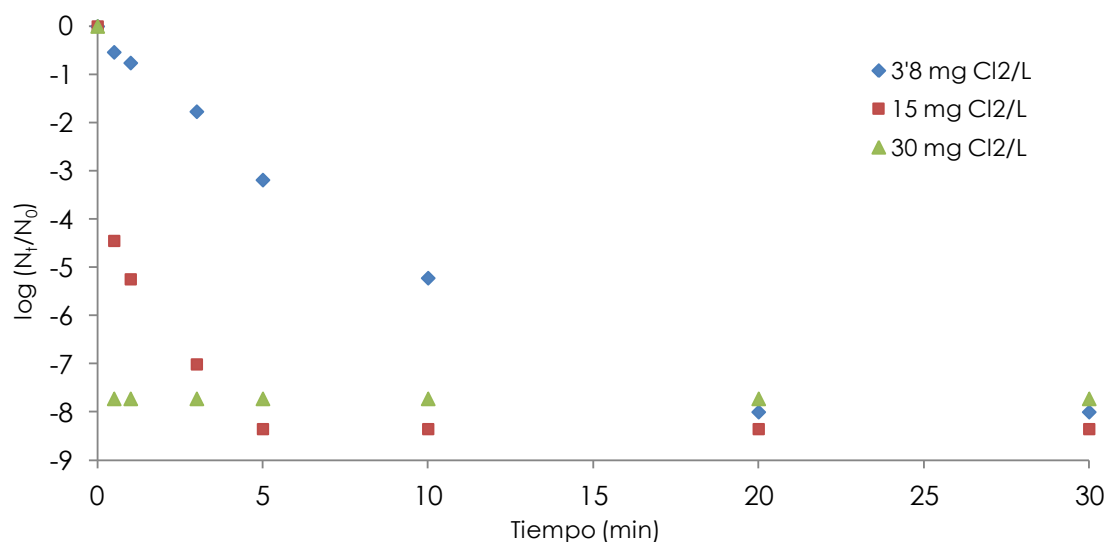


Figura 9. Inactivación de *E. coli* durante tratamientos de cloración con distintas dosis. $N_0 = 5,3 \cdot 10^7 - 2,3 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹.

Teniendo en cuenta la dosis y el tiempo de tratamiento (CT) se logró una inactivación de toda actividad microbiana con valores de CT de $75 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 10). Estos datos indican que pueden realizarse variaciones en uno de los parámetros, siempre que la relación CT satisfaga dicho valor y lograr la desinfección completa de la muestra utilizando dosis menores a la demanda de cloro. Se podría conseguir una reducción de $8 \log_{10}$ de *E. coli* con dosis de reactivo menores, por ejemplo, $3 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ durante 25 minutos.

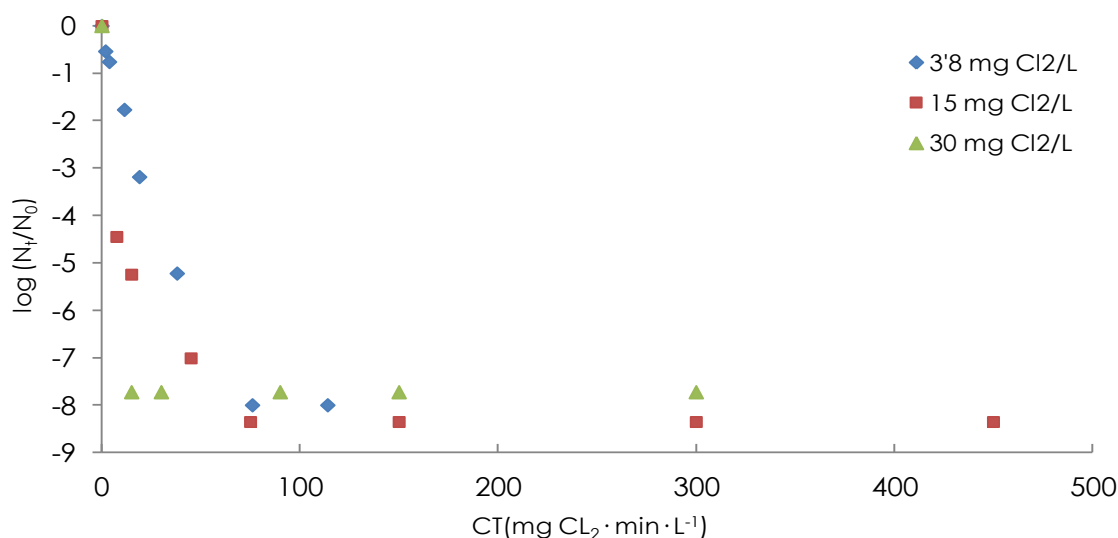


Figura 10. Inactivación de *E. coli* en los tratamientos de cloración en función al parámetro CT. $N_0 = 5,3 \cdot 10^7 - 2,3 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹.

5.1.2. Tratamientos basados en ozono

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos con ozono se presentan en la Tabla 8. En ella se muestran los valores de recuento microbiano y de ozono consumido en los diferentes tiempos de tratamiento. La Figura 11 representa las curvas de supervivencia de *E. coli* en función del ozono consumido. En el anexo VII se encuentran todos los resultados de los tratamientos basados en ozono.

Tabla 8. Valores de recuento de *E. coli* (N_t) y consumo de ozono a diferentes tiempos de tratamiento.

Tiempo (min)	Tratamiento					
	Ozono		Peroxona 1,4 mg H ₂ O ₂ /L		Peroxona 20 mg H ₂ O ₂ /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)	O ₃ consumido (mg/L)
0	$9,6 \cdot 10^8$	0	$3,3 \cdot 10^8$	0	$4,5 \cdot 10^8$	0
0,5	$8,7 \cdot 10^8$	5,6	$2,3 \cdot 10^8$	5,6	$2,1 \cdot 10^8$	5,6
1	$8,6 \cdot 10^8$	12,9	$1,6 \cdot 10^8$	12,7	$2 \cdot 10^8$	12,5
3	$3,2 \cdot 10^8$	22,6	$5,6 \cdot 10^6$	30,8	$8,1 \cdot 10^7$	32,4
6	$2,2 \cdot 10^7$	31,2	$3,6 \cdot 10^5$	43,2	$8 \cdot 10^6$	55,7
9	$4 \cdot 10^4$	42,6	$7,1 \cdot 10^4$	60,2	$3,1 \cdot 10^6$	63,6
15	$5,8 \cdot 10^2$	71,0	$1 \cdot 10^2$	84,4	$3,1 \cdot 10^5$	78,5

En los primeros momentos del tratamiento de ozonización apenas se observó disminución en la actividad microbiana. En cambio, a los 6 minutos de tratamiento se alcanzó una inactivación de 1,64 unidades logarítmicas, que en las condiciones aplicadas correspondió a un consumo de $31,2 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. A partir de ese momento la inactivación comenzó a ser más rápida, lográndose más de 4 log₁₀ de desinfección aplicando dosis de $42,6 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (alcanzadas tras 9 minutos), y llegando a superar las 6 log₁₀ de inactivación con dosis de $71,0 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, es decir, al cabo de 15 minutos.

En el sistema peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ se observó al comienzo del tratamiento un descenso de la población bacteriana ligeramente superior al logrado por la ozonización. Con un consumo de ozono de $31,2 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (3 minutos de tratamiento) se lograron valores similares de desinfección de *E. coli*, de aproximadamente 1,8 unidades logarítmicas (Figura 11). Al sobrepasar dicha dosis de ozono consumido, se observó una inactivación más rápida en la ozonización. Al final del tratamiento la desinfección fue similar en ambos casos, con un consumo de $71,0 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ en la ozonización y $84,4 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ en el proceso peroxona $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, con valores de 6,2 y 6,5 log₁₀ de inactivación respectivamente.

En los primeros minutos del tratamiento peroxona con $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ se obtuvieron valores de inactivación similares a los observados en el tratamiento peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Sin embargo, con cantidades de $32,4 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ consumido, la inactivación de *E. coli* fue menor que en la ozonización y que en el tratamiento peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. En este caso, la utilización de dosis de $78,5 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ solo permitió la desinfección de 3 unidades logarítmicas.

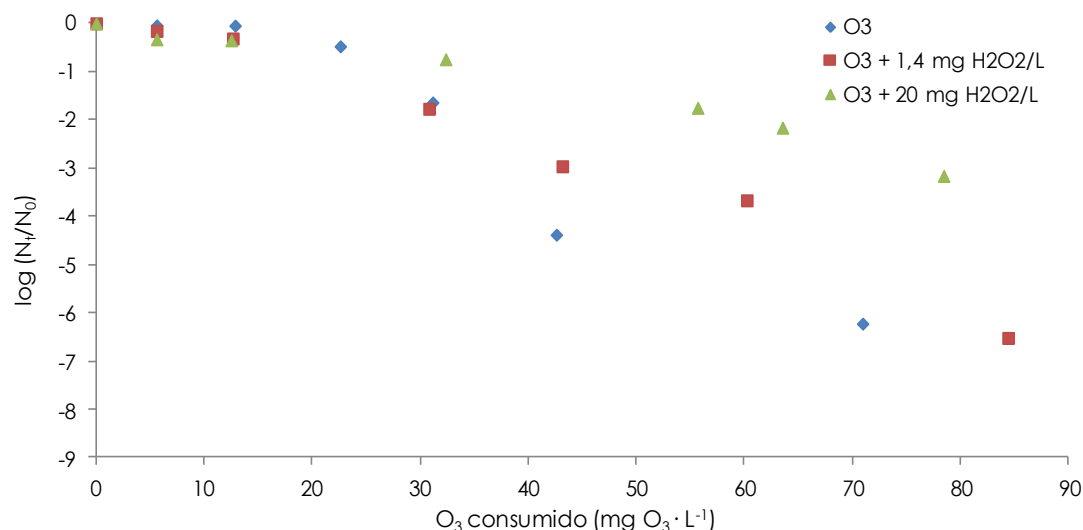


Figura 11. Curvas de supervivencia de *E. coli* en función del ozono consumido.
 $N_0 = 4,5 \cdot 10^8 - 9,6 \cdot 10^8$ UFC · 100 mL⁻¹.

Son diversos los estudios que han demostrado el efecto positivo de la combinación del peróxido de hidrógeno y el ozono en la desinfección (Cho y Yoon, 2006; Sommer *et al.*, 2004; Lanao, 2012). En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó un ligero aumento de la eficacia del sistema peroxona al comienzo de los tratamientos para ambas dosis de H₂O₂. Sin embargo, dicho efecto de mejora desaparece conforme aumenta el consumo de ozono. Al sobrepasar cierta cantidad de ozono consumido la ozonización resulta más eficaz en la desinfección.

Wolfe *et al.* (1989) indicaron que la efectividad del sistema peroxona en la desinfección depende en gran medida del ratio H₂O₂/O₃. Sus resultados sugirieron una relación en peso de dichos agentes de 0,5, ya que con valores superiores la inactivación de *E. coli* disminuyó. A su vez el sistema peroxona no superó la desinfección lograda por la ozonización, por lo que concluyeron en que el efecto bactericida del ozono fue superior al de los radicales hidróxilo. Por tanto, en los resultados obtenidos, al reaccionar el ozono con el peróxido de hidrógeno para generar ROS a lo largo del tratamiento la velocidad en la desinfección del sistema peroxona en los últimos minutos pudo verse mermada. Además, debe tenerse en cuenta la capacidad del peróxido de hidrógeno para reaccionar con los radicales hidroxilo cuando se encuentra en exceso, hecho que pudo suceder durante los tratamientos peroxona, especialmente con dosis de 20 mg H₂O₂ · L⁻¹. Este fenómeno explicaría la mayor efectividad inicial en comparación con la ozonización y el posterior descenso en la velocidad de inactivación.

La representación de las curvas de supervivencia en función del tiempo se muestra en la Figura 12. La curva de inactivación mediante el tratamiento de ozonización presentó una clara forma sigmoidea, en ella una fracción de organismos permaneció constante (hombro) hasta un punto en el cual se produjo un descenso lineal y más rápido. Se diferencia de las obtenidas en los tratamientos peroxona, que presentan una curva de inactivación ligeramente cóncava en el tratamiento con dosis de 1,4 mg H₂O₂ · L⁻¹ y lineal en el caso del peroxona de 20 mg H₂O₂ · L⁻¹.

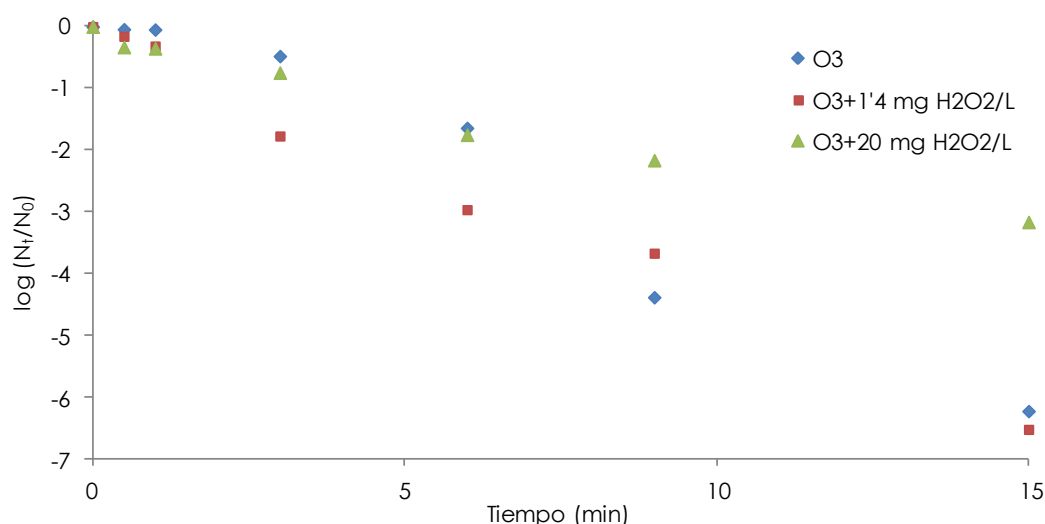


Figura 12. Curvas de supervivencia de *E. coli* a diferentes tiempos en tratamientos basados en ozono. $N_0 = 4,5 \cdot 10^8 - 9,6 \cdot 10^8$ UFC \cdot 100 mL $^{-1}$.

5.1.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible

En la Tabla 9 se encuentran los resultados de inactivación de *E. coli* obtenidos en los experimentos realizados con radiación UV/visible y una duración de 30 minutos.

El tratamiento radiación UV/visible mostró una inactivación de 0,31 unidades logarítmicas. La combinación de este tratamiento con diferentes dosis de peróxido de hidrógeno favoreció la desinfección de *E. coli*. Con dosis de 1,4 y 20 mg H₂O₂ \cdot L $^{-1}$ no se alcanzó la unidad logarítmica de inactivación, con valores de 0,46 y 0,67 log₁₀ respectivamente. Mediante la aplicación de una dosis de 200 mg H₂O₂ \cdot L $^{-1}$ la cantidad de bacterias presentes disminuyó en 3,78 unidades logarítmicas.

La adición de 1 g TiO₂ \cdot L $^{-1}$ al tratamiento UV/visible (30 minutos) favoreció la inactivación bacteriana, resultando en una desinfección de 1,64 log₁₀. En este caso, la combinación de dosis de peróxido de hidrógeno de 20 mg \cdot L $^{-1}$ con la fotocatalisis llegó a eliminar 3,06 unidades logarítmicas de *E. coli*. El aumento de la dosis a 200 mg H₂O₂ \cdot L $^{-1}$ alcanzó una desinfección de 5,42 log₁₀.

Tabla 9. Valores de recuento (N_0 , N_t) e inactivación de *E. coli* en tratamientos de 30 minutos con radiación UV/visible.

Tipo de tratamiento UV/visible (t=30 min)	N_0 (UFC/100 mL)	N_t (UFC/100 mL)	Log(N_t/N_0)
Fotólisis	$4,2 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	-0,31
1,4 mg H ₂ O ₂ /L	$4,6 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	-0,46
20 mg H ₂ O ₂ /L	$3,1 \cdot 10^8$	$6,6 \cdot 10^7$	-0,67
200 mg H ₂ O ₂ /L	$3,8 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^4$	-3,78
TiO ₂ *	$4,2 \cdot 10^8$	$9,7 \cdot 10^6$	-1,64
20 mg H ₂ O ₂ /L + TiO ₂ *	$5,8 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^5$	-3,06
200 mg H ₂ O ₂ /L + TiO ₂ *	$5,8 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^3$	-5,42

*[TiO₂] = 1g/L

Es interesante comprobar el efecto sinérgico de la fotocatalisis con TiO_2 al utilizar dosis de 20 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, que se tradujo en una inactivación superior a la suma de ambos tratamientos por separado, logrando la eliminación de 3 unidades logarítmicas, lo que corrobora la importancia de la adición de especies oxidantes en este tipo de tratamientos. En cambio, los resultados obtenidos al aumentar la dosis de peróxido de hidrógeno a 200 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ no mostraron sinergismo en el proceso de desinfección, que pudo ser provocado por reacciones competitivas entre el reactivo y los radicales hidroxilo (Malato *et al.*, 2009).

En la Tabla 10 se presentan los recuentos bacterianos y datos de inactivación en tratamientos de H_2O_2 /radiación UV/visible y TiO_2 /radiación UV/visible con 680 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ a diferentes tiempos de tratamiento (5, 15, 30 y 45 minutos).

Tabla 10. Valores de recuento (N_t) e inactivación de *E. coli* en tratamientos con radiación UV/visible, H_2O_2 y TiO_2 a diferentes tiempos.

Tiempo (min)	UV/vis + 680 mg H_2O_2 /L		UV/vis + 680 mg H_2O_2 + 1 g TiO_2 /L	
	N_t (UFC/100 mL)	$\text{Log}(N_t/N_0)$	N_t (UFC/100 mL)	$\text{Log}(N_t/N_0)$
0	$4,1 \cdot 10^8$	0	$4,1 \cdot 10^8$	0
5	$9 \cdot 10^7$	-0,66	$1,7 \cdot 10^7$	-1,38
15	$6,9 \cdot 10^3$	-4,77	$2,4 \cdot 10^4$	-4,23
30	<10	-7,61	<10	-7,61
45	0	-8,61	0	-8,61

En los tratamientos con 680 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, los resultados mostraron pocas diferencias al añadir 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ dióxido de titanio. A los 5 minutos de tratamiento, la utilización de TiO_2 mejoró la inactivación microbiana en 0,7 log_{10} . Sin embargo, al aumentar el tiempo de tratamiento la disminución de la población en los dos procesos fue similar (Figura 13). En este caso, el aumento a dosis elevadas de peróxido de hidrógeno en la fotocatalisis no provocó una mejora significativa en la desinfección de *E. coli*.

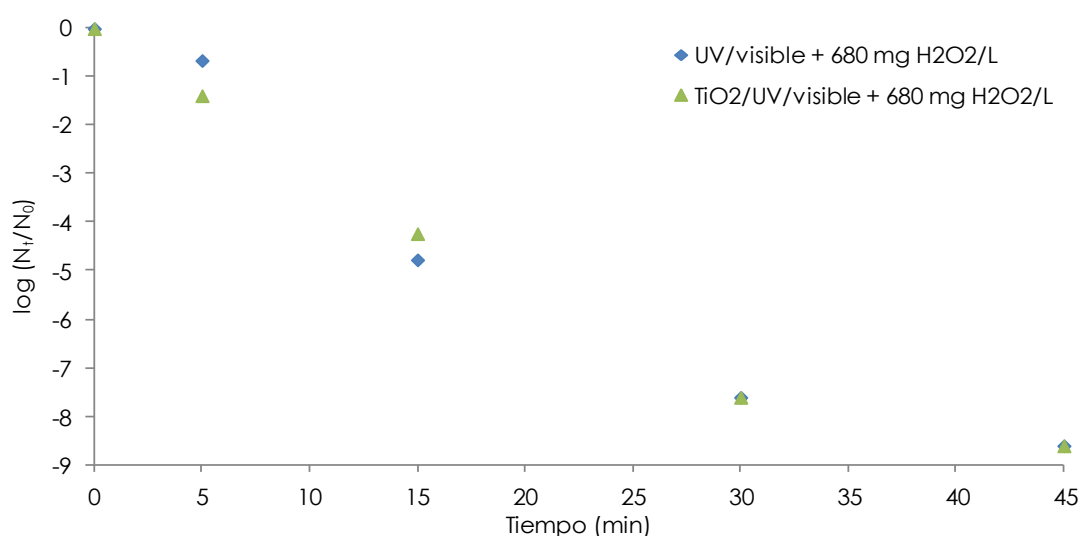


Figura 13. Curvas de supervivencia de *E. coli* a diferentes tiempos en tratamiento UV/visible y TiO_2 /UV/visible con 680 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. $N_0 = 4,1 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$.

5.2. Modelización cinética

Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados se analizaron mediante los diferentes modelos cinéticos recogidos en la Tabla 6, con el objetivo de confirmar el efecto de las diferentes condiciones de los ensayos sobre la inactivación de *Escherichia coli* presente en el agua de salida de depuradora. A su vez, se comparan los resultados con los obtenidos por Valero (2013) mediante los mismos tratamientos para *Enterococcus sp.*

En el Anexo VII se muestran las curvas de inactivación obtenidas para *Escherichia coli* con los tratamientos estudiados sobre los modelos matemáticos aplicados, y la representación de los valores experimentales obtenidos frente a los estimadas por cada modelo.

5.2.1. Cloración

Los modelos cinéticos aplicados en el caso de los tratamientos de cloración son el modelo bifásico, el modelo de Mafart, el modelo de Hom modificado y el modelo de Geeraerd. El modelo de Hom no fue utilizado, ya que no se ajusta a las condiciones experimentales en este tipo de ensayos por considerar que la concentración de desinfectante es constante. En la Tabla 11 se muestran los parámetros cinéticos y el ajuste mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático medio (ECM) de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos.

El índice ECM indicó que el modelo más ajustado a la cinética de inactivación de *E. coli* fue el de Hom modificado, con un valor de ECM de 0,33. A su vez, el coeficiente de determinación mostró un valor de 0,99. Este modelo asume que la población bacteriana se inactiva a lo largo del tratamiento (k) conforme el desinfectante se va descomponiendo (k').

Tabla 11. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus sp.* en el tratamiento de cloración $3,8 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

3,8 mg Cl ₂ /L							
Modelo bifásico							
Bacteria	p	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	R ²		
<i>Escherichia coli</i>	0,9999595	1,31	0,33	0,57	0,97		
<i>Enterococcus sp.</i>	0,9326589	1,35	0,15	0,16	0,98		
Modelo de Mafart							
Bacteria	δ	p			ECM	R ²	
<i>Escherichia coli</i>	0,47	0,53			0,7	0,97	
<i>Enterococcus sp.</i>	2,56	0,47			0,14	0,98	
Modelo de Hom modificado							
Bacteria	k (min ⁻¹)	k'(min ⁻¹)	m	n	ECM	R ²	
<i>Escherichia coli</i>	0,9	0,6	0,87	0,108	0,33	0,99	
<i>Enterococcus sp.</i>	0,634	0,428	0,47	0,001	0,14	0,98	
Modelo de Geeraerd							
Bacteria	K _{máx} (min ⁻¹)	SI	Log (N _{res})			ECM	R ²
<i>Escherichia coli</i>	0,65	-	-			1,17	0,89

A su vez, el modelo de Hom modificado explicó la cinética de inactivación adecuadamente en el del estudio realizado por Valero (2013) con *Enterococcus* sp., si bien en la tasa de inactivación mediante cloración presentó valores menores a los de *E. coli* (0,634 y 0,9 min⁻¹ respectivamente).

El modelo de Hom modificado también fue el que mejor describió la inactivación de *E. coli* al utilizar dosis de cloro de 15 mg Cl₂ · L⁻¹ (Tabla 12), mostrando este tratamiento una constante de desinfección mayor que en la cloración con 3,8 mg Cl₂ · L⁻¹. En el caso de *Enterococcus* sp., fue el modelo bifásico, reconociendo la existencia de dos poblaciones bacterianas con distinta resistencia al cloro y respondiendo ambas a una cinética de primer orden.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración 15 mg Cl₂ · L⁻¹.

15 mg Cl ₂ /L						
Modelo bifásico						
Bacteria	p	k ₁	k ₂	ECM	R ²	
<i>Escherichia coli</i>	0,999998	0,75	0,19	6,12	0	
<i>Enterococcus</i> sp.	0,9999995	1,52	0,11	0,32	0,99	
Modelo de Mafart						
Bacteria	δ(min)	p		ECM	R ²	
<i>Escherichia coli</i>	0,0001	0,17		1,04	0,91	
<i>Enterococcus</i> sp.	0,72	0,47		0,99	0,89	
Modelo de Hom modificado						
Bacteria	k (min ⁻¹)	k' (min ⁻¹)	m	n	ECM	R ²
<i>Escherichia coli</i>	1,511	0,297	0,39	0,497	0,21	0,995
<i>Enterococcus</i> sp.	1,450	0,806	0,50	0,002	1,02	0,89
Modelo de Geeraerd						
Bacteria	K _{máx} (min ⁻¹)	SI	Log (N _{res})	ECM	R ²	
<i>Escherichia coli</i>	12,09	-	0,27	0,86	0,94	

5.2.2. Tratamientos basados en ozono

Los modelos aplicados para los tratamientos con ozono coinciden con los utilizados en el caso de la cloración, sustituyendo el modelo de Hom modificado por el modelo de Hom, ya que el ozono se aplicó de manera constante al reactor a lo largo de los experimentos, por lo que no se produjo una disminución en su concentración.

Los valores de los distintos parámetros y del ajuste de los datos obtenidos a los modelos aplicados en la ozonización se presentan en la Tabla 13. En este caso, los mejores ajustes de la cinética de *E. coli* se obtuvieron en el modelo de Hom y en el de Geeraerd, con valores de ECM aproximados (0,44 y 0,5 respectivamente). El coeficiente de determinación fue ligeramente mayor en el caso del modelo de Geeraerd, que reconoce una fase inicial en forma de hombro (SI, forma convexa) seguida de una desinfección lineal sin fenómeno de cola (N_{res}).

Tabla 13. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus sp.* en el tratamiento de ozonización.

Ozonización					
Modelo bifásico					
Bacteria	p	$k_1(\text{min}^{-1})$	$k_2(\text{min}^{-1})$	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0	-	-	-	-
<i>Enterococcus sp.</i>	1,000000	0,903	0,903	0,50	0,95
Modelo de Mafart					
Bacteria	$\delta(\text{min})$	p		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	2,90	1,15		0,56	0,97
<i>Enterococcus sp.</i>	3,231	1,18		0,46	0,96
Modelo de Hom					
Bacteria	$K_{ap}(\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1})$	m		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,231	1,23		0,44	0,97
<i>Enterococcus sp.</i>	0,249	1,18		0,46	0,96
Modelo de Geeraerd					
Bacteria	$K_{m\acute{a}x}(\text{min}^{-1})$	SI	Log (N_{res})	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	1,15	1,87	-	0,5	0,97
<i>Enterococcus sp.</i>	2,23	4,81	-	0,31	0,99

En las Tablas 14 y 15 se muestran los resultados de los parámetros calculados para cada modelo en los dos tratamientos peroxona aplicados. En ambos sistemas los 4 modelos presentaron una buena adecuación a los valores experimentales. Atendiendo al ECM y al R^2 el modelo con más ajuste a los datos obtenidos fue el de Hom. El parámetro k_{ap} mostró valores superiores en el caso del sistema peroxona 1,4 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, por lo que la cinética de inactivación sobre *E. coli* fue mayor que en el peroxona 20 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ y que en la ozonización (K_{ap} de 0,538, 0,399 y 0,231 respectivamente). Los resultados del parámetro m en ambos tratamientos peroxona fueron menores a la unidad, visualizándose un efecto cola, generado por una disminución bacteriana más lenta al final del tratamiento.

En los dos tratamientos peroxona realizados el modelo de Geeraerd no indicó la presencia de una fase de hombro al comienzo de tratamiento, a diferencia de la ozonización, ni un efecto cola, por lo que quedó simplificado a un modelo de inactivación lineal, con menor ajuste en el caso del sistema peroxona 20 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. El modelo de Mafart también resultó apropiado para describir la cinética de inactivación de este tipo de tratamientos, donde el parámetro δ presentó su mayor valor en el tratamiento peroxona con 20 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Dicho parámetro informa del tiempo necesario para inactivar una unidad logarítmica, corroborando la menor efectividad de ese sistema al aumentar la dosis de peróxido de hidrógeno.

El modelo con mayor ajuste a la cinética de inactivación de *Enterococcus sp.* en todos los tratamientos con ozono fue el de Geeraerd, que en todos los casos mostró un fenómeno de hombro. Dicho fenómeno puede ser debido a un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos bacterianos o una resistencia inicial de la población bacteriana. El parámetro δ en la desinfección por el sistema peroxona con 20 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ fue similar en ambas especies microbianas, ya que en el estudio realizado por Valero (2013) con *Enterococcus sp.* no se

observó ninguna interacción entre el ozono y el peróxido de hidrógeno añadido, al contrario que en el caso de *E. coli*.

Tabla 14. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en el tratamiento peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

Peroxona $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2/\text{L}$					
Modelo bifásico					
Bacteria	p	$k_1(\text{min}^{-1})$	$k_2(\text{min}^{-1})$	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,759600	1,76	0,90	0,29	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	1,000000	0,951	0,951	0,53	0,91
Modelo de Mafart					
Bacteria	$\delta(\text{min})$	p		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	1,84	0,89		0,28	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	3,622	1,34		0,68	0,92
Modelo de Hom					
Bacteria	$K_{ap}(\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1})$	m		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,538	0,92		0,22	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	0,178	1,34		0,68	0,92
Modelo de Geeraerd					
Bacteria	$K_{m\acute{a}x}(\text{min}^{-1})$	SI	Log (N_{res})	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,991	-	-	0,28	0,988
<i>Enterococcus</i> sp.	3,01	5,47	-	0,14	0,999

Tabla 15. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en el tratamiento peroxona con $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

Peroxona $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2/\text{L}$					
Modelo bifásico					
Bacteria	p	$k_1(\text{min}^{-1})$	$k_2(\text{min}^{-1})$	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,92362	0,68	0,31	0,14	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	1,00000	0,894	0,894	0,53	0,96
Modelo de Mafart					
Bacteria	$\delta(\text{min})$	p		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	3,32	0,77		0,14	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	3,354	1,21		0,46	0,96
Modelo de Hom					
Bacteria	$K_{ap}(\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1})$	m		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,399	0,77		0,10	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	0,231	1,21		0,46	0,96
Modelo de Geeraerd					
Bacteria	$K_{m\acute{a}x}(\text{min}^{-1})$	SI	Log (N_{res})	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,48	-	-	0,186	0,979
<i>Enterococcus</i> sp.	1,98	4,16	-	0,12	0,999

5.2.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible

Los modelos matemáticos aplicados para explicar la respuesta de inactivación de *E. coli* en los tratamientos con luz solar simulada son los mismos que los utilizados en los basados en ozono.

Los tratamientos utilizados para realizar la modelización cinética son la radiación UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ y la fotocatálisis con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, con el fin de realizar la comparación de los resultados obtenidos con los de Valero (2013) sobre *Enterococcus* sp. Los valores de los distintos parámetros y los ajustes obtenidos a los diferentes modelos se encuentran en las Tablas 16 y 17.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de *E. coli* en el tratamiento de radiación UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

UV/visible + 680 mg H ₂ O ₂ /L					
Modelo bifásico					
Bacteria	p	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	R ²
<i>Escherichia coli</i>	0,99997	0,73	0,22	0,92	0,99
Modelo de Mafart					
Bacteria	δ (min)	p		ECM	R ²
<i>Escherichia coli</i>	1,69	0,68		1,15	0,96
Modelo de Hom					
Bacteria	K _{ap} (W · min ⁻¹ · m ⁻²)	m		ECM	R ²
<i>Escherichia coli</i>	0,580	0,727		0,63	0,96
Modelo de Geeraerd					
Bacteria	K _{máx} (min ⁻¹)	SI	Log (N _{res})	ECM	R ²
<i>Escherichia coli</i>	0,64	-	0,16	0,74	0,98

Los modelos que mejor describieron la inactivación provocada por el tratamiento de radiación UV/visible son el de Hom y el de Geeraerd (Tabla 16). El modelo de Hom presentó un valor de m menor a la unidad, lo que permite visualizar el efecto cola. Este efecto también se manifestó en el modelo de Geeraerd, aunque con un valor bajo (0,16 log). A su vez la velocidad de inactivación de *E. coli* es similar en ambos modelos. El efecto cola puede producirse por la agrupación de microorganismos, por la presencia de subpoblaciones resistentes o por la disminución del desinfectante en la muestra.

En el caso de TiO₂/radiación UV/visible con dosis de peróxido de hidrógeno de $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ se observó que los valores de inactivación de *E. coli* se ajustaron correctamente al modelo de Geeraerd y al modelo bifásico (Tabla 17). En el caso del modelo de Geeraerd, la constante de inactivación presentó un valor aproximado al del tratamiento en ausencia de catalizador (0,59 min⁻¹). Este modelo también mostró la presencia de una población residual o cola, pero con un valor menor que en el caso anterior, de 0,02 log. El modelo bifásico indicó la posible presencia de dos poblaciones bacterianas, con constantes de inactivación de 0,66 y 0,23 min⁻¹.

En el estudio de *Enterococcus* sp. la inactivación por fotocatálisis se ajustó mejor al modelo de Hom, si bien su cinética fue mucho menor a la obtenida para *E. coli*. *Enterococcus* sp. también presentó una curva de inactivación con cola (m<1).

La adición de dióxido de titanio bajo las condiciones establecidas en los experimentos no mejoró significativamente la cinética de desinfección de las muestras, como se puede observar atendiendo a los valores de las constantes de inactivación y del parámetro δ .

Tabla 17. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados y ajuste de los resultados a la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en el tratamiento TiO_2 /radiación UV/visible con 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

UV/visible + 680 mg H_2O_2 + 1 g TiO_2/L					
Modelo bifásico					
Bacteria	p	$k_1(\text{min}^{-1})$	$k_2(\text{min}^{-1})$	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,999969	0,66	0,23	0,37	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	1	0,16	0,16	0,54	0,97
Modelo de Mafart					
Bacteria	$\delta(\text{min})$	p		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	1,70	0,68		0,74	0,98
<i>Enterococcus</i> sp.	18,87	1,11		0,36	0,98
Modelo de Hom					
Bacteria	$K_{ap}(\text{W} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2})$	m		ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,622	0,71		0,40	0,98
<i>Enterococcus</i> sp.	0,037	0,90		0,23	0,98
Modelo de Geeraerd					
Bacteria	$K_{m\max}(\text{min}^{-1})$	SI	Log (N_{res})	ECM	R^2
<i>Escherichia coli</i>	0,59	-	0,02	0,23	0,99

5.3. Estudio económico

La estimación de los costes económicos de un tratamiento es también un factor importante a la hora de decidir cuál utilizar en un proceso de regeneración de aguas a escala real. Para evaluar de forma precisa la rentabilidad coste-efectividad de un tratamiento se deben tener en cuenta diversos factores: cantidad y calidad de agua a tratar, costes de inversión y operación, configuración del sistema, grado de descontaminación, etc.

Con el objetivo de estimar los costes de los distintos tratamientos utilizados en el presente trabajo se consideraron exclusivamente los costes relativos al agente desinfectante aplicado. Para poder compararlos entre sí se calcularon los costes asociados a la desinfección de un ciclo logarítmico, que corresponde a un 90% de inactivación, en 1 m^3 de muestra.

5.3.1. Cloración

El cálculo de la dosis de cloro necesaria para inactivar una unidad logarítmica de *Escherichia coli* se realizó considerando el parámetro CT (Figura 10). Según el modelo de Hom modificado, se necesitan 2,44 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$, utilizando los parámetros de aquel que mostró mayor ajuste al proceso de cloración (dosis de 15 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$). Fijando un tiempo de tratamiento de 5 minutos, la cantidad de hipoclorito sódico necesaria es de 0,48 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

El reactivo empleado en la cloración es hipoclorito sódico al 15% p/v, con un precio de venta según la empresa Ercros de 97€ $\cdot \text{Tm}^{-1}$ (Lanao, 2012).

Para realizar el cálculo se aplicó la expresión 5.1:

$$\text{Coste NaClO} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Dosis Cl}_2 \left(\frac{\text{mg Cl}_2}{\text{L}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L NaClO}}{150000 \text{ mg Cl}_2} \cdot \frac{1'15 \text{ kg NaClO}}{1 \text{ L NaClO}} \cdot \frac{97 \text{ €}}{1000 \text{ kg NaClO}} \quad [5.1]$$

El coste del tratamiento de cloración se presenta en la Tabla 18.

Tabla 18. Coste del tratamiento de cloración para inactivar 1 unidad logarítmica de *Escherichia coli*.

Tratamiento	Coste calculado (€/m ³)
Cloración (0,48 mg Cl ₂ /L)	0,00036

5.3.2. Tratamientos basados en ozono

Para la estimación del coste de los diferentes tratamientos basados en ozono se tiene en cuenta el coste del ozono generado (según el tiempo necesario para inactivar 1 unidad logarítmica) y el del peróxido de hidrógeno en el caso de los sistemas peroxona. Para el cálculo del coste del ozono se consideran el consumo de oxígeno realizado en los ensayos y el coste de la electricidad asociado en las condiciones en las que se realizaron los tratamientos (ecuación 5.2).

$$\text{Coste O}_3 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Coste O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) + \text{Coste electricidad} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) \quad [5.2]$$

El precio del oxígeno (5.3) se calculó para un caudal del ozonizador de 50 L O₂ · h⁻¹, con un coste de 0,025 € · kg⁻¹ O₂ (Lucas, 2010). Para valorar el coste energético del proceso (5.4) se estableció un consumo del ozonizador de 12 W · h · g⁻¹ O₃ producido (Lucas, 2010), generando 888 mg O₃ · h⁻¹. El coste de la energía es de 0,140728 € · kW⁻¹ · h⁻¹ establecido por la empresa Iberdrola (2013).

$$\text{Coste O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\text{Tiempo (min)}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{50 \text{ L O}_2}{60 \text{ min}} \cdot \frac{0'0013 \text{ kg O}_2}{1 \text{ L O}_2} \cdot \frac{0'025 \text{ €}}{1 \text{ kg O}_2} \quad [5.3]$$

$$\text{Coste electricidad} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\text{Tiempo (min)}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{0'888 \text{ g O}_3}{60 \text{ min}} \cdot \frac{12 \text{ Wh}}{1 \text{ g O}_3} \cdot \frac{0'140728 \text{ €}}{1000 \text{ Wh}} \quad [5.4]$$

Para la estimación de los costes de los tratamientos peroxona se sumó al coste del ozono el precio del peróxido de hidrógeno en función de las dosis utilizadas (5.5). El precio del mencionado reactivo es de 0'21€ kg⁻¹ H₂O₂ al 30% p/v, según la empresa suministradora FCM Foret Zaragoza (Lanao, 2012).

$$\text{Coste H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Dosis} \left(\frac{\text{mg H}_2\text{O}_2}{\text{L}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L H}_2\text{O}_2}{300000 \text{ mg H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{1'1 \text{ kg H}_2\text{O}_2}{1 \text{ L H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{0'21 \text{ € H}_2\text{O}_2}{1 \text{ kg H}_2\text{O}_2} \quad [5.5]$$

El tiempo necesario para la inactivación de 1 log₁₀ en los tratamientos basados en ozono se obtuvo a partir del modelo de Hom, que fue el que presentó mayor adecuación a la cinética de inactivación de *E. coli*. En la Tabla 19 se muestran los costes de los distintos tratamientos, entre ellos el sistema peroxona con 1,4 mg H₂O₂ · L⁻¹ es el más económico.

Tabla 19. Coste de los tratamientos basados en ozono para inactivar 1 unidad logarítmica de *Escherichia coli*.

Tratamiento	Tiempo inactivación 1 log (min)	Coste O ₃ (€/m ³)	Coste H ₂ O ₂ (€/m ³)	Coste total (€/m ³)
Ozonización	3,28	0,1710	-	0,1710
Peroxona 1,4 mg H ₂ O ₂ /L	1,97	0,1036	0,0011	0,1047
Peroxona 20 mg H ₂ O ₂ /L	3,30	0,1721	0,0154	0,1875

5.3.3. Tratamientos basados en radiación UV/visible

Los procesos basados en radiación UV/visible fueron configurados para imitar a la luz solar natural, por lo que en el cálculo de los costes asociados a los tratamientos realizados con radiación no se tienen en cuenta los gastos energéticos de la cámara solar, ya que a escala real se realizarían en presencia de luz natural. Por tanto, solo se consideran aquellos costes derivados de la adición de los distintos reactivos.

En los experimentos realizados en la presente investigación se utilizaron diferentes dosis de H₂O₂ y 1 g · L⁻¹ de TiO₂ en el caso de los tratamientos de fotocatalisis. En la Tabla 20 se muestran los costes de los distintos tratamientos realizados durante 30 minutos, según las cantidades de reactivo aplicadas en cada uno así como la inactivación de *E. coli* alcanzada. La estimación del coste del peróxido de hidrógeno se realiza según la expresión 5.5. El coste del dióxido de titanio se calculó mediante la expresión 5.6, con un precio de 1'55 € · kg⁻¹, según la empresa Degussa Ibérica S.A. (Lanao, 2012).

$$\text{Coste TiO}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{1 \text{ g TiO}_2}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1'55 \text{ €}}{1000 \text{ g TiO}_2} \quad [5.6]$$

Tabla 20. Coste de los tratamientos con radiación UV/visible y valor de inactivación de *E. coli* tras 30 minutos de tratamiento.

Tipo de tratamiento UV/vis (t=30 min)	Log(N _i /N ₀)	Coste TiO ₂ (€/m ³)	Coste H ₂ O ₂ (€/m ³)	Coste total (€/m ³)
Fotólisis	-0,31	-	-	-
1,4 mg H ₂ O ₂ /L	-0,46	-	0,0011	0,0011
20 mg H ₂ O ₂ /L	-0,67	-	0,0154	0,0154
200 mg H ₂ O ₂ /L	-3,78	-	0,1540	0,1540
TiO ₂ *	-1,64	1,55	-	1,5500
20 mg H ₂ O ₂ /L + TiO ₂ *	-3,06	1,55	0,0154	1,5654
200 mg H ₂ O ₂ /L + TiO ₂ *	-5,42	1,55	0,154	1,7400

*[TiO₂]= 1g/L

El tiempo necesario para inactivar 1 unidad logarítmica en el tratamiento UV/visible con 680 mg H₂O₂ · L⁻¹ según el modelo de Hom fue de 2,22 minutos, y en el caso del tratamiento TiO₂/UV/visible con 680 mg H₂O₂ · L⁻¹ se logró en 2,58 minutos atendiendo al modelo de Geaerd. El coste de los dos procesos se encuentra en la Tabla 21.

Tabla 21. Coste de los tratamientos con radiación UV/visible, H_2O_2 y TiO_2 para inactivar 1 unidad logarítmica de *Escherichia coli*.

Tratamiento	Tiempo inactivación 1 log (min)	Coste TiO_2 (€/m ³)	Coste H_2O_2 (€/m ³)	Coste total (€/m ³)
UV/visible + 680 mg H_2O_2 /L	2,2185	-	0,5236	0,5236
UV/visible + 680 mg H_2O_2 + 1 g TiO_2 /L	2,5760	1,55	0,5236	2,0736

La combinación de TiO_2 /UV/visible con 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ no sale rentable, ya que la inactivación lograda en las mismas condiciones sin utilizar dióxido de titanio es similar, y este compuesto encarece mucho el proceso.

El tratamiento más rentable es la cloración, con un coste 0,00036 € · m⁻³. Entre los tratamientos basados en ozono, el sistema peroxona con 1,4 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ es el que tiene menor coste, 0,1047 € · m⁻³. Sin embargo es muy superior al de la cloración, ya que el precio del peróxido de hidrógeno es mayor al del hipoclorito sódico. Los tratamientos basados en radiación UV/visible tienen la ventaja de utilizar la luz solar natural, por lo que permite ahorrar en costes energéticos. La combinación de la fotocatalisis con dosis bajas de peróxido de hidrógeno mostró buenos resultados de inactivación en tratamientos de 30 minutos, sin embargo, el coste del fotocatalizador provoca que el proceso resulte económicamente excesivo.

Pese a que la cloración es el tratamiento de desinfección más barato, debe tenerse en cuenta el daño a la salud que conlleva este tipo de tratamientos. La formación de THM mediante este proceso depende de la materia orgánica presente en el agua, que es mayor en el caso de aguas residuales que las naturales, y su concentración aumenta con la dosis de cloro y el tiempo de exposición (Sun *et al.*, 2005), por ello es importante reducir la dosis y el tiempo de contacto sin perder efectividad en la desinfección. Los tratamientos basados en ozono evitan la formación de THM, especialmente si se favorece la creación de radicales hidroxilo capaces de atacar las sustancias precursoras de los THM, como ocurre en los sistemas peroxona (USEPA, 1999), aunque su coste es más elevado.

6. CONCLUSIONES

- El tratamiento con hipoclorito sódico logró los valores más altos de inactivación de *Escherichia coli* en aguas de salida de depuradora. En 20 minutos con dosis de $3,8 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ se logró la desinfección total de dicha bacteria. Al aumentar la dosis de cloro a $15 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ la velocidad de inactivación bacteriana fue mayor. Al final de todos los tratamientos quedo cloro sin reaccionar. Los datos indicaron un valor del parámetro CT de $2,44 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$, por lo que pueden variarse las dosis y los tiempos de contacto y cumplir los objetivos de inactivación requeridos para la reutilización. La cinética de inactivación *E. coli* en los procesos de cloración mostró mayor ajuste al modelo de Hom modificado.
- Los tratamientos basados en ozono aplicados mostraron diferencias en los valores de inactivación de *E. coli*. La ozonización logró una desinfección más rápida al superar el consumo de $31,2 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, sin embargo, con consumos inferiores los sistemas peroxona alcanzaron mejores resultados. Los tres tratamientos se ajustaron al modelo de inactivación de Hom, siendo el tratamiento peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ el que presentó una constante de velocidad de inactivación bacteriana mayor. El aumento a dosis de peróxido de hidrógeno de $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ no provocó una mejoría en el proceso de desinfección. Se observó una interacción entre el ozono y el peróxido de hidrógeno, por lo que la dosis de este reactivo debe ser bien controlada en este tipo de tratamientos para evitar efectos contraproducentes en la inactivación de *E. coli*.
- En los tratamientos con radiación UV/visible (320-800 nm) la adición de diferentes dosis de peróxido de hidrógeno ($1,4$, 20 y $200 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) supuso una incremento en la inactivación de *E. coli*. En los tratamientos TiO_2 /radiación UV/visible se observó un efecto sinérgico mediante la adición de dosis de peróxido de hidrógeno $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Al aumentar la dosis a $200 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ el efecto sinérgico fue inhibido. Los ensayos con radiación UV/visible y $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ presentaron valores de inactivación mayores, si bien, la combinación del tratamiento con TiO_2 no reveló una mejora significativa en la desinfección. El tratamiento radiación UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ respondió al modelo cinético de Hom, y el de TiO_2 /radiación UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ mostró un mejor ajuste al modelo de Geeraerd.
- La comparación de los resultados del presente trabajo con los de Valero (2013) indicó que *Escherichia coli* tiene una mayor sensibilidad a los tratamientos aplicados que *Enterococcus sp.* siendo su constante de velocidad de inactivación generalmente mayor. En el caso del sistema peroxona con dosis de $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ los valores de los parámetros cinéticos fueron aproximados entre las dos especies, debido posiblemente a que en el caso de *Enterococcus sp.* no se observó interacción entre el ozono y el peróxido de hidrógeno y al efecto negativo que produjo la adición de dosis más elevadas de H_2O_2 en la desinfección de *E. coli* con ozono. Las curvas de inactivación bacteriana y el ajuste de los distintos modelos matemáticos muestran un comportamiento diferente de inactivación de ambas bacterias ante las distintas condiciones aplicadas.
- La cloración es el proceso de desinfección económicamente más rentable. Entre los tratamientos basados en ozono, el sistema peroxona $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ además de resultar el más eficaz resultó ser el más barato. Si bien su coste es superior al de la cloración, se puede evitar el riesgo asociado para la salud por la formación de THM. Los tratamientos basados en radiación UV/visible permiten ahorrar costes energéticos, siendo la dosis de peróxido de hidrógeno el principal gasto de dichos procesos, que puede optimizarse en función del tiempo de tratamiento. La utilización de TiO_2 en este tipo de procesos no es rentable, con un coste muy superior a la cloración y a los tratamientos basados en ozono.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Black & Veatch Corporation. "White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants". Ed. Wiley, Nueva Jersey, 5ª edición, 2010.
- Blanco J., Malato S., Fernandez-Ibanez P., Alarcon D., Gernjak W., Maldonado M. I. "Review of feasible solar energy applications to water processes". Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13, 1437–1445, 2009.
- Cho M. y Yoon J. "Enhanced bactericidal effect of O_3/H_2O_2 followed by Cl_2 ". Ozone: Science and Engineering, 28, 335-340, 2006.
- Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. "Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO_2 photocatalytic disinfection". Water Research 38, 1069-1077, 2004.
- Cho M., Kim J., Kim J.Y., Yoon J., Kim J.H. "Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants". Water Research, 44, 3410-3418, 2010.
- Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W., Greenberg A.E. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21ª edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.
- 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 tensioactivos 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 L35, 40-52, 1991.
- Fina, B. "Estrés oxidativo". Laboratorio de Biología Osea y Metabolismo Mineral, Facultad Cs. Médicas, UNR, 2006.
- García-Fernández I., Polo-López M. I., Oller I., Fernández-Ibáñez P. "Bacteria and fungi inactivation using Fe_{3+} /sunlight, H_2O_2 /sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study" Applied Catalysis B: Environmental 121–122, 20–29, 2012.
- 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.
- Glaze W.H., Kang J.W., Chapin D.H. "The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation". Ozone Science and Engineering, 9, 335-352, 1987.
- Györek 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.
- Hoigné J., Bader H. "Rate constants reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water". Water Resource, 17, 173-183, 1983.
- 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.
- Huang Z., Maness P.C., Blake D.M., Wolfrum E.J., Smolinski S.L., Jacoby W.A. "Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 130, 163–170, 2000.
- Ibarz C. "Desactivación de Enterococos en Agua Natural mediante Fotocatálisis con Dióxido de Titanio y Radiación Solar". Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 2008.
- Jagger J. "Growth delay and photoprotection induced by near-ultraviolet light". *Research progress in organic biological and medicinal chemistry*, 3 Pt 1, 383-401, 1972.
- Koivunen J., Heinonen-Tanski H. "Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments". *Water Research*, 39, 1519–1526, 2005
- Kositz M., Poullos I., Malato S., Caceres J., Campos A. "Solar photocatalytic treatment of synthetic municipal wastewater". *Water Research*, 38, 1147–1154, 2004.
- 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.
- Lucas M.S., Peres J.A, Puma G.L. "Treatment of winery wastewater by ozone-based oxidation processes (O_3 , O_3/UV and $O_3/UV/H_2O_2$) in a pilot-scale bubble column reactor and process economics". *Separation and Purification Technology* 72, 235-241, 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.
- Meulemans, C.C.E. "The basic principles of UV-sterilization of water: Ozone + Ultraviolet Water Treatment", Aquatec Amsterdam. Paris: International Ozone Association, Paris, B.1.1-B.1.13, 1986.
- 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.
- Mills A., Davies R.H., Worsley D. "Water-purification by semiconductor photocatalysis". *Chemical Society Reviews*, 22 (6), 417-425, 1993.
- 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*, 68(3), 575-583, 2013.
- Nikolaou A. D., Golfinopoulos S. K., Arhonditsis G. B., Kolovoyiannis V., Lekkas T. D. "Modeling the formation of chlorination by-products in river waters with different quality". *Chemosphere* 55(3):409–20, 2004.

- 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.
- Ramalho R. S. "Tratamiento de aguas residuales". Ed. Reverté , ISBN: 84-291-7975-5, 1996.
- 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.
- 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.
- Robert D., Malato S. "Solar photocatalysis: a clean process for water detoxification" Science of The Total Environment, Volume 291, 1-3, 27, 85-97, 2002.
- Rook J.J. "Formation of haloforms during chlorination of natural water". Journal of Water Treatment and Examination, 23 (2), 234-243, 1974.
- Salgot M., Huertas E., Weber S., Dott W., Hollender J. "Wastewater reuse and risk: definition of key objectives". Desalination, Desalination 187,29-40, 2006.
- Schaechter M. "Encyclopedia of Microbiology". 3ª ed. Elsevier Inc, San Diego. ISBN: 978-0-12-373944-5, Vol. 2, 2009a.
- Schaechter M. "Encyclopedia of Microbiology". 3ª ed. Elsevier Inc, San Diego. ISBN: 978-0-12-373944-5, Vol. 1, 2009b.
- Schaefer K., Exall K., Marsalek J. "Water reuse and recycling in Canada: a status and needs assessment". Canadian Water Resource Journal, 29 (3),195-208, 2004,
- Shiklomanov I.A., Rodda J. C. "World water resources at the beginning of the Twenty-First Century". UNESCO, Paris, 2003.
- Sommer R., Pribil W., Pflieger 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.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. "Introducción a la microbiología". Ed. Medica Paramericana, 9ª Ed. ISBN: 978-95-0060-740-7, 2007.
- UNEP. "Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change". United Nations Environmental Programme, Nairobi, Kenia, 2010.
- USEPA. "Guidance Manual. Alternative Disinfectants and Oxidants, Office of Water". United States Environmental Protection Agency, 1999.
- Valero P. "Inactivación de *Enterococcus sp.*, presentes en aguas de salida de depuradora mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación". Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Zaragoza, 2013.
- Wegelin. M., S. Canonica, K. Mechsner, T. Fleischmann, F. Pesaro y A. Metzler, J. "Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments". Journal of water supply: Research and Technology 43, 154, 1994.
- WHO. "Disinfectant and disinfectant by-product". Environmental Health Criteria 216, Geneva, 2000.

- Wolfe R. L., Stewart M. H., Liang S, McGuire. "Disinfection of model indicator organism in a drinking water pilot plant using peroxone". Applied and environmental microbiology, 55(9), 2230-2241, 1989.
- Yuk H., Gevecke D. J., Zhang H. Q. "Efficacy of supercritical carbon dioxide for nonthermal inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple cider". International Journal of Food Microbiology 138, 91–99, 2010.

ANEXOS

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

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
1.- USOS URBANOS				
CALIDAD 1.1: RESIDENCIAL ² a) Riego de jardines privados. ³ b) Descarga de aparatos sanitarios. ³	1 huevo/10 L	0 (UFC ⁴ /100 mL)	10 mg/L	2 UNT ⁵
CALIDAD 1.2: SERVICIOS a) Riego de zonas verdes urbanas (parques, campos deportivos y similares). ⁹ b) Baileo de calles. ⁹ c) Sistemas contra incendios. ⁹ d) Lavado industrial de vehículos. ⁹	1 huevo/10 L	200 UFC/100 mL	20 mg/L	10 UNT
				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 ⁷ deberá asegurarse el respeto de las NCAs. ⁸ <i>Legionella spp.</i> 100 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización)

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 (1).

USO DEL AGUA PREVISTO		VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)				OTROS CRITERIOS
		NEMATODOS INTESTINALES	ESCHERICHIA COLI	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	
2.- USOS AGRÍCOLAS ¹						
CALIDAD 2. 1 ²						
a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco.		1 huevo/10 L	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; Cadmio: 0,01 mg/L; Cobalto: 0,05 mg/L; Cromo: 0,1 mg/L; Cobre: 0,2 mg/L; Manganeseo: 0,2 mg/L; Molibdeno: 0,01 mg/L; Níquel: 0,2 mg/L; Selenio : 0,02 mg/L; Vanadio: 0,1 mg/L.. Para el cálculo de RAS se utilizará la fórmula:

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

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 cuyo número de bacterias se sitúa entre m y M.

Tabla III. Criterios de calidad de reutilización de las aguas para usos agrícolas (2).

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 huevo/10 L	1.000 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases ¹ 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 de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones. c) Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas.	1 huevo/10 L	10.000 UFC/100 mL	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>Legionella spp.</i> 100 UFC/L

¹ 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 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 3.1¹ a) Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria. b) Otros usos industriales.	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 spp.</i> : 100 UFC/L
	1 huevo/10 L	1.000 UFC/100 mL Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases ² 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>Legionella spp.</i> : 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
	1 huevo/10 L	Ausencia UFC/100 mL	5 mg/L	1 UNT	<i>Legionella spp.</i> : Ausencia UFC/L Para su autorización se requerirá: - 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 higiénico-sanitarios 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.
CALIDAD 3.2 a) Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.					

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: 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 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 4.1¹ a) Riego de campos de golf.	1 huevo/10 L	200 UFC/100 mL	20 mg/L	10 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. 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 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 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. P _T : 2 mg P/L (en agua estancada)

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 ¹ : 10 mg N/L NO ₃ : 25 mg NO ₃ /L Art. 257 a 259 del RD 849/1986
CALIDAD 5.2 a) Recarga de acuíferos por inyección directa.	1 huevo/10 L	0 UFC/100 mL	10 mg/L	2 UNT	
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. Principales agentes etiológicos potencialmente presentes en agua residuales

Tabla VII. Principales agentes etiológicos potencialmente presentes en el agua residual y su enfermedad asociada.

Agente etiológico	Enfermedad asociada
Bacterias	
<i>Aeromonas</i> spp.	Gastroenteritis
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	Gastroenteritis, síndrome de Guillain-Barré
<i>Clostridium perfringens</i>	Gangrena gaseosa
<i>Escherichia coli</i>	Síndrome urémico hemolítico
<i>E. coli</i> enteropatógena	Enfermedades respiratorias (legionelosis)
<i>Legionella</i> sp.	Enfermedades vías respiratorias
<i>Mycobacterium avium</i> complex	Gastroenteritis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecciones en heridas, quemaduras y tracto urinario
<i>Salmonella typhi/paratyphi</i>	Fiebre tifoidea y paratifoidea
<i>Salmonella</i> sp.	Gastroenteritis (salmonelosis)
<i>Shigella</i> sp.	Disenteria bacilar (shigelosis)
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis, septicemia (yersinosis)
Virus	
Adenovirus	Inespecífica, encefalitis
Adenovirus (40 y 41)	Gastroenteritis
Agente Norwalk	Gastroenteritis
Astrovirus	Gastroenteritis
Calicivirus	Gastroenteritis
Echovirus	Meningitis
Enterovirus tipo 68-71	Meningoencefalitis
Hepatitis A y B	Hepatitis
Poliovirus	Poliomielitis
Rotavirus	Gastroenteritis, encefalitis
Small round virus (SRV)	Gastroenteritis
Protozoos	
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Meningoencefalitis, lesiones en ojos, piel y vías respiratorias
<i>Blanditi coli</i>	Disenteria (balantidiasis)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Gastroenteritis (criptosporidiasis)
<i>Giardia intestinalis</i>	Gastroenteritis (giardiasis)
Helminths	
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Anemia, gastroenteritis
<i>Schistosoma</i> sp.	Esquistosomiasis (bilharziosis)
<i>Taenia</i> sp.	Teniasis
<i>Trichuris trichiura</i>	Tricuriosis
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Síndrome Loeffler, gastroenteritis (ascariasis)

Bibliografía

Alcalde L. "Evaluación y gestión del riesgo asociado a la reutilización de aguas naturales". Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 2012.

ANEXO III. Metodología de los análisis físico-químicos

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 de 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 que consiste en introducir la célula en la muestra, agitarla y esperar unos minutos antes de tomar el valor. Los resultados se expresan en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ o en $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 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 empleó el método 2540D de Standard Methods (Clesceri *et al.*, 2005), en el que los sólidos en suspensión totales se miden a 810 nm.

III.V. Carbono orgánico total (COT)

La medida del Carbono Orgánico Total (COT) sirve para cuantificar la materia orgánica presente en el agua. Se analiza de acuerdo al método 5310B de Standard Methods (Clesceri *et al.*, 2005) utilizando un equipo SHIMADZU, modelo TOC-VCSH (Figura I).



Figura I. Analizador de carbono orgánico total SHIMADZU, modelo TOC-V_{CSH}

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 CO₂, o bien en forma de compuestos como los carbonatos y bicarbonatos. Conjuntamente, ambos tipos de carbonos constituyen el carbono total, CT, y por lo tanto cumplen la relación: $COT = CT - CI$. El equipo utilizado se basa en esta relación para medir el COT.

Material y reactivos

- Equipo SHIMADZU, modelo TOC-V_{CSH}.
- 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 VIII.

Tabla VIII. 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 (H₂O₂)

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 -100 mg · L⁻¹) o amarillo (100-1000 mg · L⁻¹). A continuación, la zona de reacción de la tira de ensayo se compara visualmente con una escala colorimétrica.

III.VII. Cloro residual

La concentración cloro se determina semicuantitativamente por comparación colorimétrica mediante un test indicador de cloro marca *Merckoquant*. El cloro oxida un compuesto orgánico presente en las tiras formándose un producto de oxidación violeta. La zona de reacción de la tira de ensayo se compara visualmente con una escala colorimétrica.

III.IX. Demanda de cloro

La demanda de cloro (DC) 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 (DC) la diferencia de ambos valores en mg · L⁻¹, como indica la ecuación I:

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

Para determinar D_0 se añaden 5 mL de hipoclorito sódico comercial de 50.000 mg · L⁻¹ Cl₂ 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 (Na₂S₂O₄ · 5H₂O, 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).

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

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. Transcurrido 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).

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

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

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

Bibliografía

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

ANEXO IV. Metodología microbiológica

IV.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. Se pueden encontrar en diferentes estados, los que se utilizaron en esta investigación fueron medios sólidos, que se presentan en forma de polvos deshidratados.

Para la reconstrucción de medios deshidratados se suspende la cantidad indicada por el fabricante en agua destilada y se lleva a ebullición. Posteriormente, se esteriliza la disolución en frascos de vidrio durante 15 minutos a 121 °C en el autoclave. Tras finalizar el proceso los frascos se colocan en el baño termostático a 50 °C para evitar que la temperatura disminuya excesivamente y el agar solidifique. Una vez que ha alcanzado dicha temperatura se procede a verter su contenido en placas de petri. Las placas preparadas deben guardarse refrigeradas y por un tiempo no superior a un mes.

Los medios empleados en la investigación son agar nutritivo y MacConkey (Tablas IX y X). La diferencia entre ellos radica en que el agar nutritivo es un medio de uso general para microorganismos poco exigentes, por lo que en él pueden desarrollarse una amplia gama de bacterias, mientras que el agar Macconkey es un medio selectivo y diferencial de salmonella y coliformes.

Tabla IX. Composición del agar nutritivo (Scharlau).

Agar nutritivo	
Ingrediente	Concentración (g/L)
Extracto de carne	1
Extracto de levadura	2
Peptona	5
Cloruro sódico	5
Agar	15

Tabla X. Composición del agar MacConkey (Scharlau).

Agar MacConkey (Scharlau)	
Ingrediente	Concentración (g/L)
Peptona de gelatina	17
Peptona de carne	1,50
Peptona de caseína	1,50
Lactosa	10
Sales biliares	1,5
Cloruro sódico	5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	15

IV.II. Fortificación de muestras

La cepa de *Escherichia coli* utilizada proviene del stock del Departamento de Investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas. Está identificada, por lo que no se considera necesario realizar pruebas bioquímicas de confirmación. En caso de duda puede realizarse una tinción gram para asegurar la pureza de la cepa (Anexo IV.III).

La fortificación de las diferentes muestras se realiza a partir de un criovial congelado de 1,5 mL que contiene la cepa de *E. coli* inmersa en leche desnatada estéril, ésta funciona como agente crioprotector. Tras descongelar el vial, se recoge una pequeña cantidad de muestra con un asa de siembra y se extiende sobre agar nutritivo.

La siembra se realiza mediante la técnica de agotamiento en zigzag (Figura II), que consiste en depositar el inóculo tomado en uno de los extremos superiores de la placa y realizar movimientos en zigzag sin levantar el asa hasta concluir la siembra en toda la placa. Se asegura un ambiente estéril mediante una cámara de flujo laminar o mechero bunsen durante el proceso. El objetivo de este método de siembra es obtener colonias aisladas al final del recorrido para poder diferenciar el posible crecimiento de microorganismos indeseados.

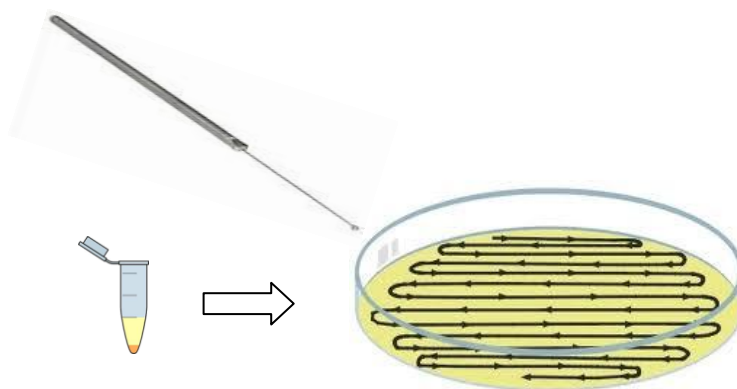


Figura II. Siembra en superficie por agotamiento

Las placas se incuban invertidas a 42 °C durante 24 horas en ambiente aerobio. Las colonias de *E. coli* en agar nutritivo crecen con forma circular, lisas, de color blanco-grisáceo translucido, sin pigmentación. Cuando las placas no son utilizadas tras la incubación, se cubren con parafilm y se guardan bajo refrigeración para posteriores usos.

El siguiente paso a seguir para realizar la fortificación es la preparación de una suspensión bacteriana concentrada. Para ello, se transfirieron las colonias obtenidas en las placas a un tubo estéril con suero fisiológico (NaCl, 0,9%) previamente autoclavado. El número de colonias presentes en la suspensión se calcula en relación a la turbidez de ésta. Una vez alcanzada la concentración deseada se adicionan 5 mL de suspensión bacteriana por 1 L de agua, logrando una concentración inicial en la muestra de $10^7 - 10^8 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$.

IV.III. Tinción gram

La tinción gram fue 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 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 III. En primer lugar se realiza un frotis de la colonia que se quiere estudiar en un portaobjetos. Cuando la muestra está seca, se procede a la tinción. A continuación 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. Por último, el frotis se tiñe de nuevo (tinción de contraste) con safranina que tiñe las bacterias gramnegativas de rosa a rojo (Figura IV), dejando a las bacterias grampositivas de color morado oscuro.

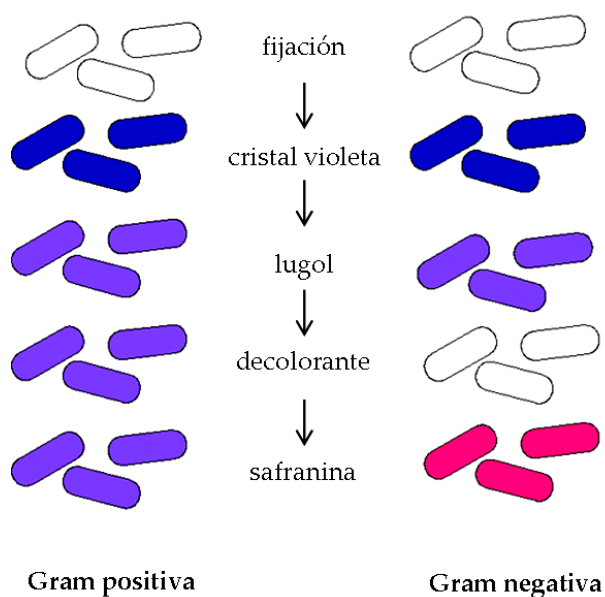


Figura III. Método de la tinción gram



Figura IV. *E. coli* tras la tinción gram (Manning, 2010)

IV.IV. Diluciones decimales seriadas

La preparación de diluciones seriadas es necesaria para realizar análisis cuantitativos de una muestra, ya que permiten reducir el número de microorganismos presentes por unidad de volumen y hacer posible su posterior recuento en placa. Las series de diluciones son generalmente decimales para facilitar el cálculo de los resultados finales.

El número de diluciones necesarias depende de la concentración inicial, normalmente desconocida, y del nivel de concentración esperado, que debe ser aquel que permita obtener un número de colonias en placa entre 30 y 300.

A partir de la muestra de agua se toma 1 mL y se pipetea a un tubo que contiene 9 mL de solución salina estéril (0,9% NaCl), a continuación se homogeneiza en el vortex, de esta forma se obtiene la primera dilución 1:10 o 10^{-1} . Para realizar las diluciones sucesivas se repite el proceso, tomando 1 mL del tubo anterior y transfiriéndolo al siguiente con 9 mL de solución salina (Figura V). Todo el proceso debe realizarse en ambiente estéril proporcionado por el mechero bunsen. Tras realizar las diluciones decimales seriadas puede procederse a su siembra.

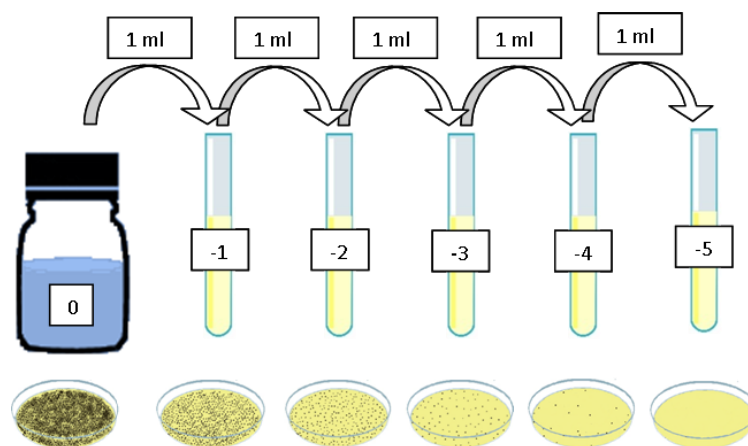


Figura V. Esquema del método de diluciones seriadas

IV.V. Métodos de siembra

Método de siembra en superficie

Para siembras en superficie se sigue el procedimiento normalizado 9215 C (Clesceri *et al.*, 2005). Con una pipeta automática se pipetea 100 μ L en el centro de una placa con el medio sólido. Mediante una varilla de vidrio estéril se extiende la muestra uniformemente por toda la superficie de agar.

Método de filtración en membrana

En la Figura VI se muestran los pasos necesarios para realizar las siembras por el método de filtración en membrana (UNE-EN ISO 9308-1). Con la ayuda de unas pinzas previamente flameadas en el mechero bunsen se coloca un filtro de membrana estéril (Millipore) de 0,45 μ m de diámetro de poro sobre el soporte del equipo filtración conectado a un sistema de vacío (a). A continuación se adapta un embudo estéril a la base y se vierte una pequeña cantidad de solución salina (0,9% NaCl) para humedecer el filtro (b, c). Seguidamente se vierte la muestra a filtrar homogeneizada, al abrir la llave del vacío, los microorganismos presentes en la muestra quedan retenidos en el filtro. Para la filtración de muestras inferiores a 30 mL, antes deben

añadirse al embudo entre 20 y 50 mL de solución salina, de esta manera se logra que el crecimiento bacteriano se produzca de forma uniforme sobre la placa.

Cuando la muestra ha sido filtrada, se cierra la llave de vacío, se retira el embudo y se recoge el filtro con las pinzas depositándolo sobre la placa con agar sólido, evitando que se formen burbujas de aire debajo del filtro, ya que impedirían el contacto de los microorganismos con el agar (d, e).

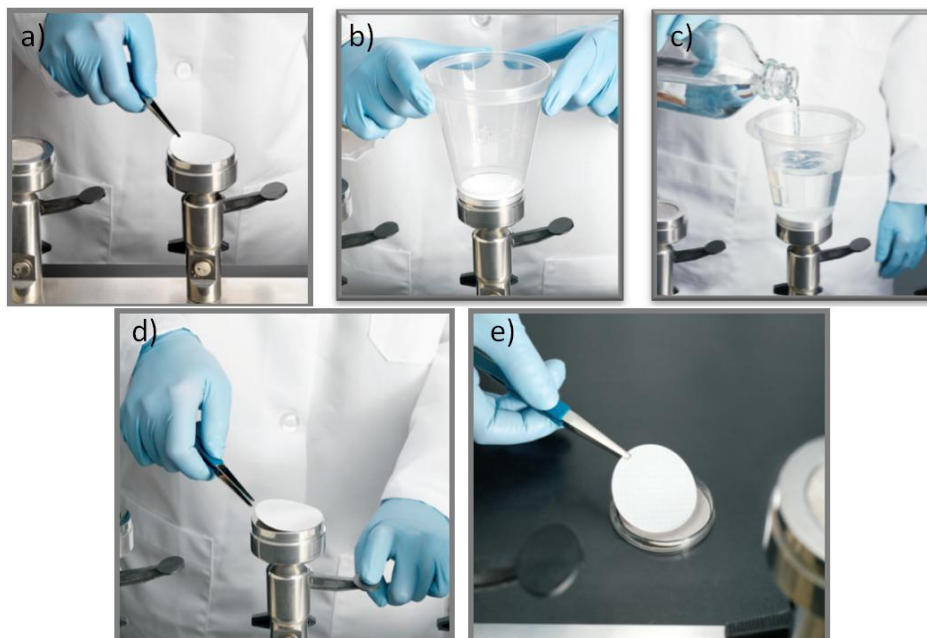


Figura VI. Método de filtración de membrana (Millipore).

Bibliografía

- Clesceri L.S., Eaton A.D., Rice E.W. "Standard Methods for the examination of Water and Wastewater". 21ª edición. APHA, AWWA, WEF, 2005.
- Maning S. "*Escherichia coli* infections". Second Edition, Infobase Publishing, 2ª edición, New York, 2010.
- Willey J.M., Serwood L.M., Woolverton C.J. "Microbiología de Prescott, Harley y Klein". McGrawHill, Madrid, 2009.
- UNE-EN ISO 9308-1. "Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1. Método de filtración en membrana", Octubre 2001.

ANEXO V. Ozonización

V.I. Descripción general de la instalación de ozonización

El oxígeno es aportado al ozonizador desde una botella de gas comprimido conectada al equipo. La generación de ozono aumenta con el caudal de oxígeno introducido, por lo que debe regularse el flujo mediante una válvula situada en el frontal del equipo. Entre la botella de gas y el ozonizador, debe colocarse un lecho de sílica gel que por sus propiedades higroscópicas elimine la humedad de la corriente de O_2 antes de entrar en el ozonizador. El ozonizador se conecta a un reactor cerrado que funciona en régimen semicontinuo, continuo respecto al gas y discontinuo respecto al líquido. El ozono gas se trasfiere a la muestra por la parte superior del reactor a través de un difusor poroso (O_3 introducido) que 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 aplicó en las muestras se realizaron una serie de ensayos a diferentes tiempos, determinándose en cada caso la cantidad de ozono que se genera. Para ello se conectaron dos borboteadores en serie directamente a la salida del ozonizador conteniendo cada uno 250 mL de KI (Panreac) al 2%. Durante un tiempo fijado, se hace pasar por el ozonizador un caudal de oxígeno de $50 L \cdot h^{-1}$, utilizando una potencia de ozonización de 1,5 W y aplicando una presión de oxígeno de 1 bar.

V.III. Método yodométrico

La cantidad de ozono presente en los borboteadores se calcula por el método yodométrico (Kolthoff y Belcher, 1957). Este método se utiliza tanto en la calibración del equipo para conocer el ozono generado, como en la realización de experimentos con el fin de 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 (I_2). 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 yodo formado con una disolución de tiosulfato sódico ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 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 I_2 formado se torna amarillo pálido. En ese 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 V, donde V es el volumen del agente valorante consumido (tiosulfato sódico), N es la normalidad del tiosulfato sódico (0,025N), V' es el volumen de yoduro potásico utilizado en la valoración, y 24, el peso equivalente del ozono. Si se trabaja con borboteadores en serie, la cantidad de ozono total es la suma de los mg de O_3 retenidos por cada uno de ellos.

$$\text{mg O}_3 = V \cdot N \cdot \frac{250}{V'} \cdot 24 \quad [\text{V}]$$

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 H₂SO₄ 96%, 1 g de KI y 10 mL de K₂Cr₂O₇ 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 VI.

$$N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \frac{1}{\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \quad [\text{VI}]$$

V.IV. Recta de calibrado

En la Figura VII se muestra la recta obtenida del calibrado del ozonizador, que representa el ozono generado en mg en función del tiempo de tratamiento.

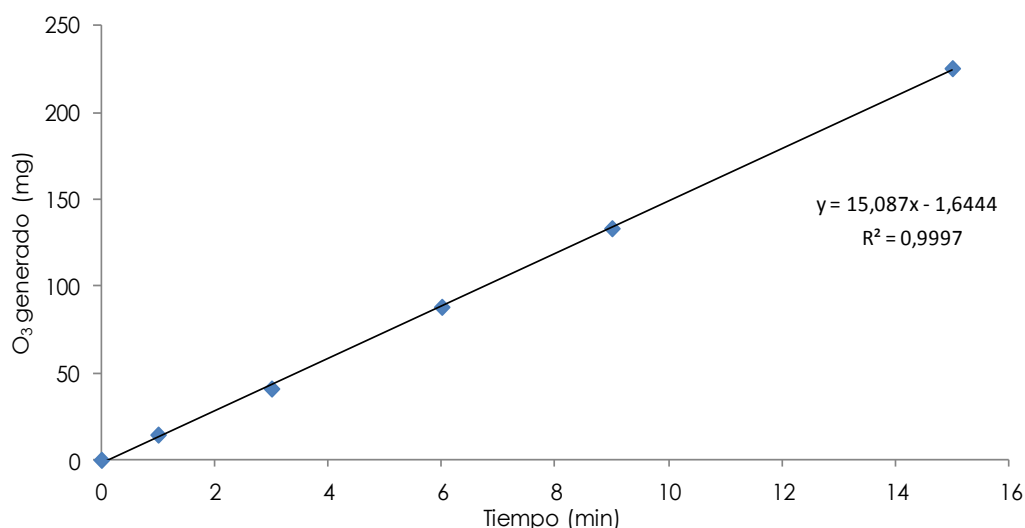


Figura VII. Recta de calibrado del ozonizador

Bibliografía

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

ANEXO VI. Modelos cinéticos de inactivación bacteriana

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 VII 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.

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

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 VIII, 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).

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

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 VIII. 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 sigmoideas).

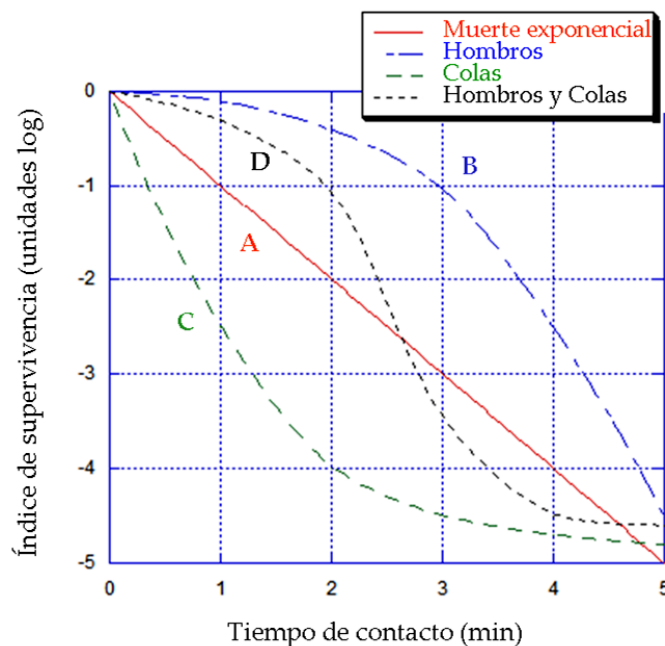


Figura VIII. Curvas de supervivencia microbiana (Gyürék y Finch, 1998)

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 de la memoria recoge los modelos matemáticos utilizados 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 IX, 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 X, 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.

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

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

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 VIII y se simplifica al modelo Chick-Watson para $m=1$. Cuando m es menor que la unidad, se visualiza un efecto de cola.

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 XI donde C_0 es la concentración inicial y k , la constante de velocidad de descomposición del desinfectante (min^{-1}).

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

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

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

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 XIII, 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.

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} \left[P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1-P) \cdot e^{-k_2 \cdot t} \right] \quad [\text{XIII}]$$

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 XIV. La distribución de Weibull es una distribución de probabilidades diseñada para describir el comportamiento de sistemas que tienen cierto grado de variabilidad.

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

Mafart (2002) modifica la ecuación de Weibull según la ecuación XV, 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.

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

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 sigmoideas (Geeraerd *et al.*, 2000). La incorporación de cada fenómeno se engloba en la ecuación XVI, 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.

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

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.*, 1993). En la actualidad, muchos programas informáticos estadísticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utilizó 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 utilizaron dos índices: el coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático medio (ECM). También se utilizó con este propósito la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente. El cálculo de R^2 y ECM se realizó 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 XVII, donde \tilde{y}_i son los valores estimados \bar{y} es la media de los valores reales.

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

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 XVIII, 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.

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

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.
- Györek 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". Journal of Hygiene 8, 536-542, 1908.

ANEXO VII. Resultados

VII.I. Resultados de inactivación de los tratamientos basados en ozono.

En las Tablas XI, XII y XIII se presentan los resultados de inactivación de *E. coli* durante los tratamientos basados en ozono, así como el control de ozono durante el proceso.

Tabla XI. Inactivación de *Escherichia coli* en el tratamiento de ozonización.

Tiempo (min)	Ozonización					
	mg O ₃ generado	mg O ₃ no consumido	mg O ₃ consumido	N _t (UFC/100 mL)	Log N _t	Log(N _t /N ₀)
0	0	0	0	9,6·10 ⁸	8,98	0,00
0,5	5,9	0,30	5,60	8,7·10 ⁸	8,94	-0,04
1	13,4	0,90	12,86	8,6·10 ⁸	8,93	-0,05
3	43,6	21,00	22,60	3,2·10 ⁸	8,51	-0,48
6	88,9	57,75	31,15	2,2·10 ⁷	7,34	-1,64
9	134,1	91,50	42,60	4·10 ⁴	4,60	-4,38
15	224,7	153,75	70,95	5,75·10 ²	2,76	-6,22

Tabla XII. Inactivación de *Escherichia coli* en el tratamiento peroxona 1,4 mg H₂O₂·L⁻¹.

Tiempo (min)	Peroxona 1,4 mg H ₂ O ₂ /L					
	mg O ₃ generado	mg O ₃ no consumido	mg O ₃ consumido	N _t (UFC/100 mL)	Log N _t	Log(N _t /N ₀)
0	0	0	0	3,3·10 ⁸	8,52	0,00
0,5	5,9	0,30	5,60	2,3·10 ⁸	8,36	-0,16
1	13,4	0,75	12,65	1,6·10 ⁸	8,20	-0,31
3	43,6	13,13	30,81	5,6·10 ⁶	6,75	-1,77
6	88,9	45,75	43,15	3,6·10 ⁵	5,56	-2,96
9	134,1	73,88	60,23	7,1·10 ⁴	4,85	-3,67
15	224,7	144,00	84,41	1·10 ²	2,00	-6,52

Tabla XIII. Inactivación de *Escherichia coli* en el tratamiento peroxona 20 mg H₂O₂·L⁻¹.

Tiempo (min)	Peroxona 20 mg H ₂ O ₂ /L					
	mg O ₃ generado	mg O ₃ no consumido	mg O ₃ consumido	N _t (UFC/100 mL)	Log N _t	Log(N _t /N ₀)
0	0	0	0	4,5·10 ⁸	8,65	0,00
0,5	5,9	0,30	5,60	2,1·10 ⁸	8,32	-0,33
1	13,4	0,90	12,50	2·10 ⁸	8,30	-0,35
3	43,6	11,25	32,35	8,1·10 ⁷	7,91	-0,74
6	88,9	34,50	55,68	8·10 ⁶	6,90	-1,75
9	134,1	70,54	63,56	3,1·10 ⁶	6,49	-2,16
15	224,7	146,25	78,45	3,1·10 ⁵	5,49	-3,16

VII.II. Cinéticas de inactivación

VI.II.i. Cloración

En la Figura IX se representa el ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos matemáticos durante el proceso de cloración con $3,8 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Los valores observados frente a los estimados por cada modelo se pueden observar en la Figura X.

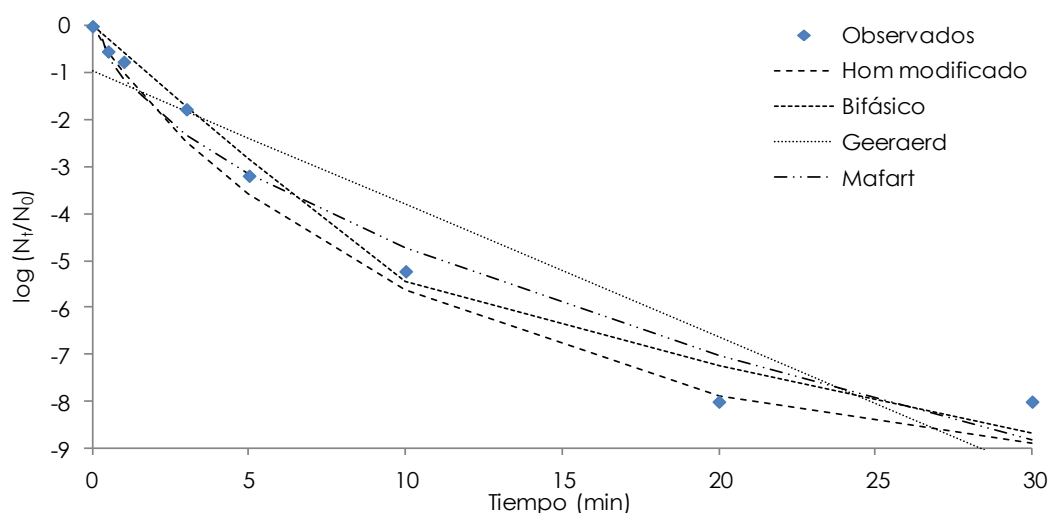


Figura IX. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en el tratamiento de cloración con $3,8 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

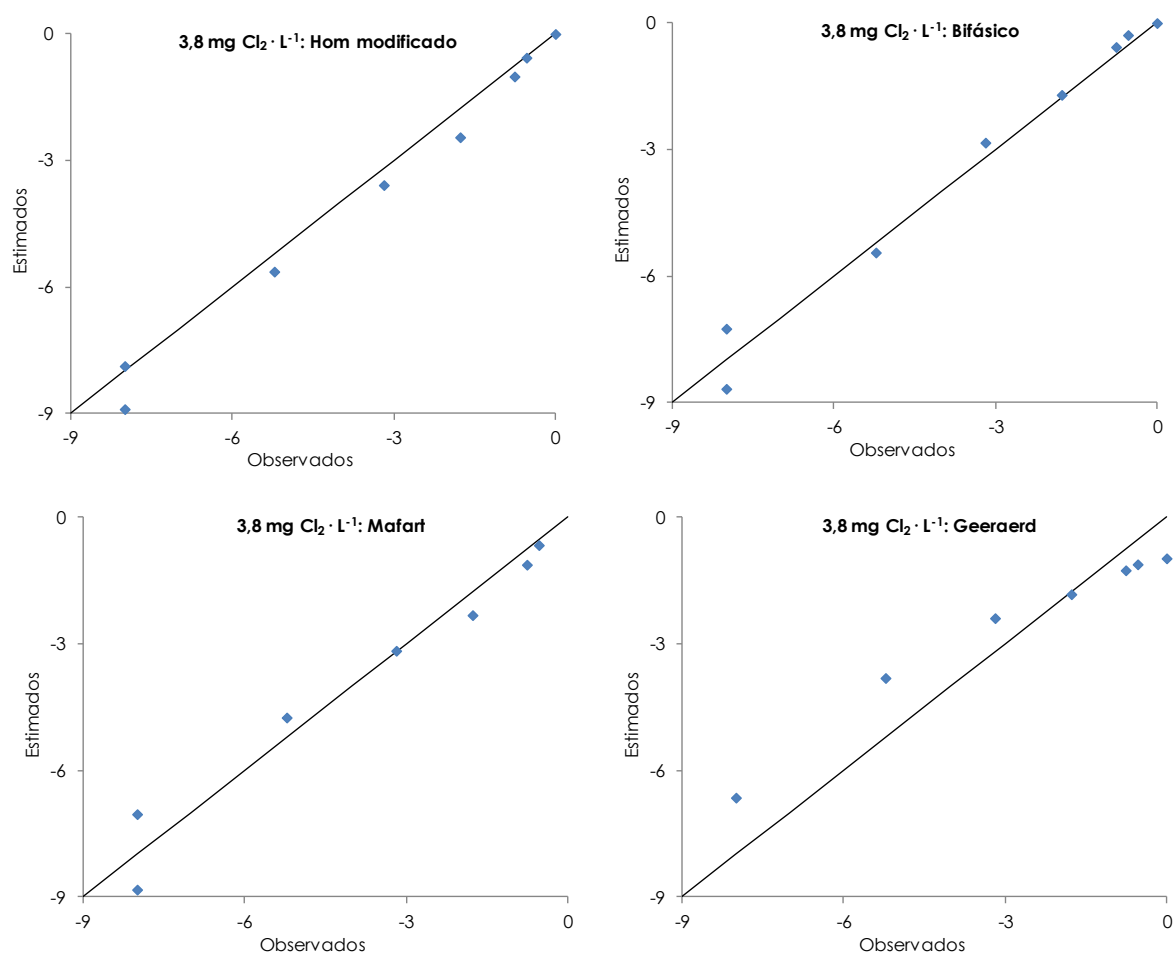


Figura X. Representación de los valores estimados frente a los observados en el tratamiento de cloración $3,8 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

En la Figura XI se muestra el ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos matemáticos durante el proceso de cloración con $15 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Los valores observados frente a los estimados por cada modelo se representan en la Figura XII.

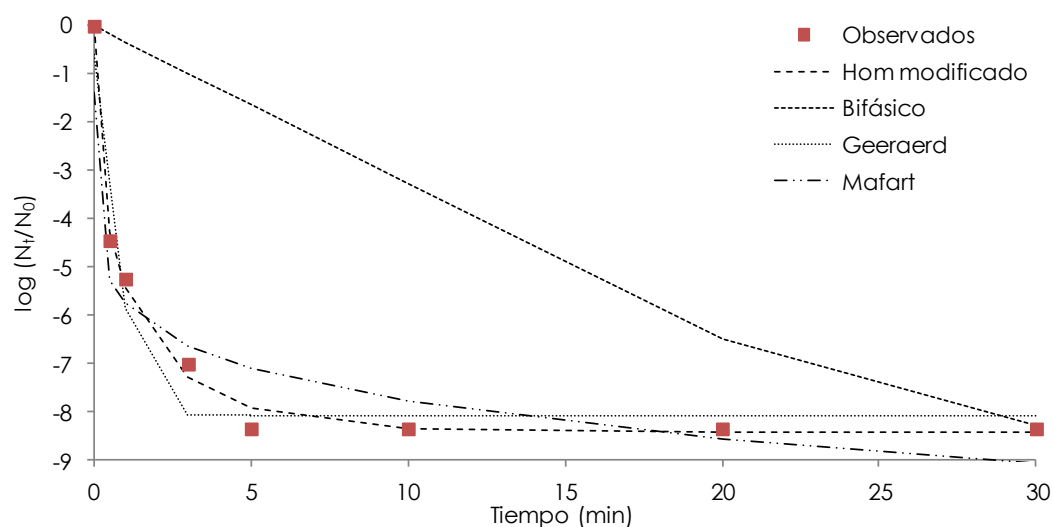


Figura XI. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en el tratamiento de cloración con $15 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

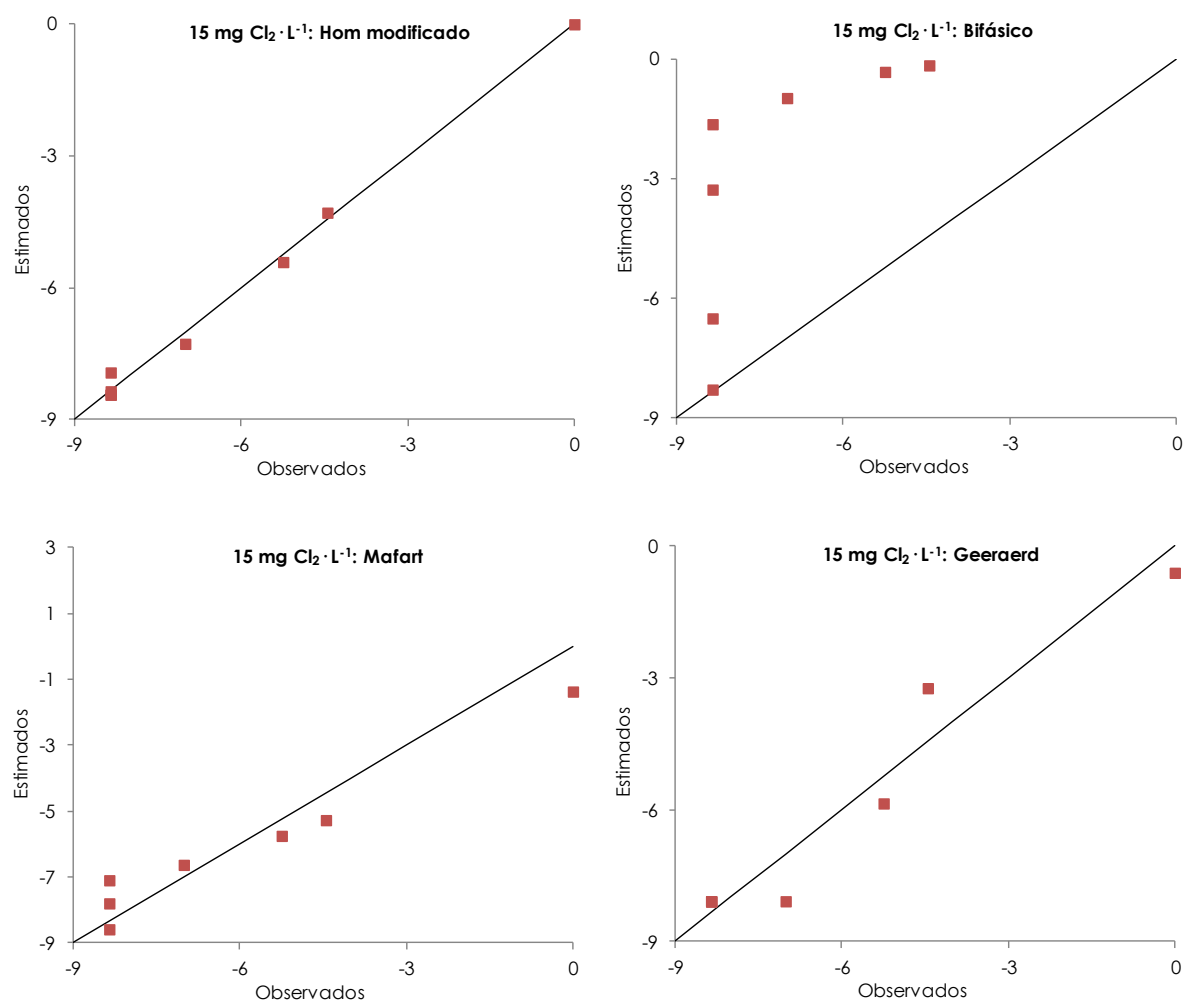


Figura XII. Representación de los valores estimados frente a los observados en el tratamiento de cloración $15 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

VI.II.ii. Tratamientos basados en ozono

En la Figura XIII se muestra el ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos matemáticos durante el proceso de ozonización. Los valores observados frente a los estimados por cada modelo se observan en la Figura XIV.

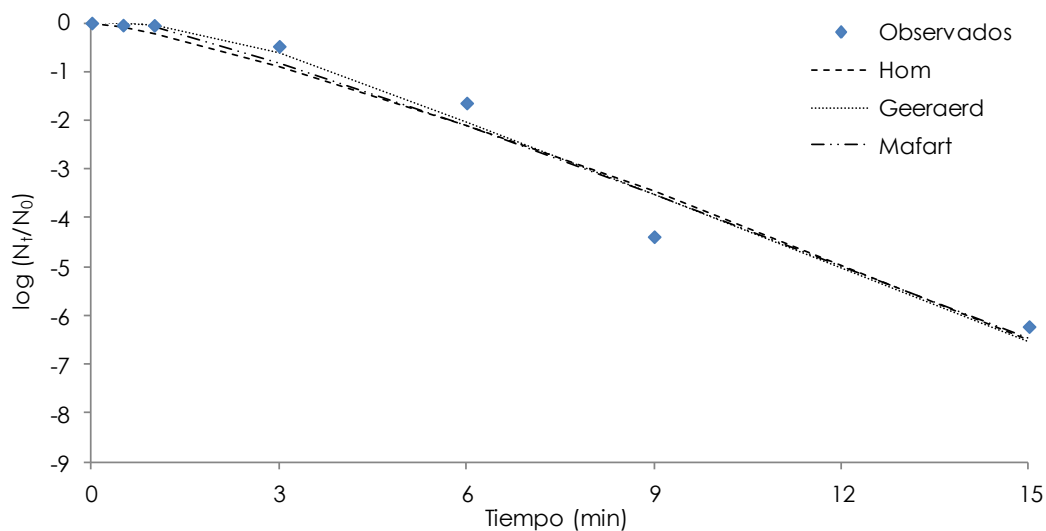


Figura XIII. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en el tratamiento de ozonización.

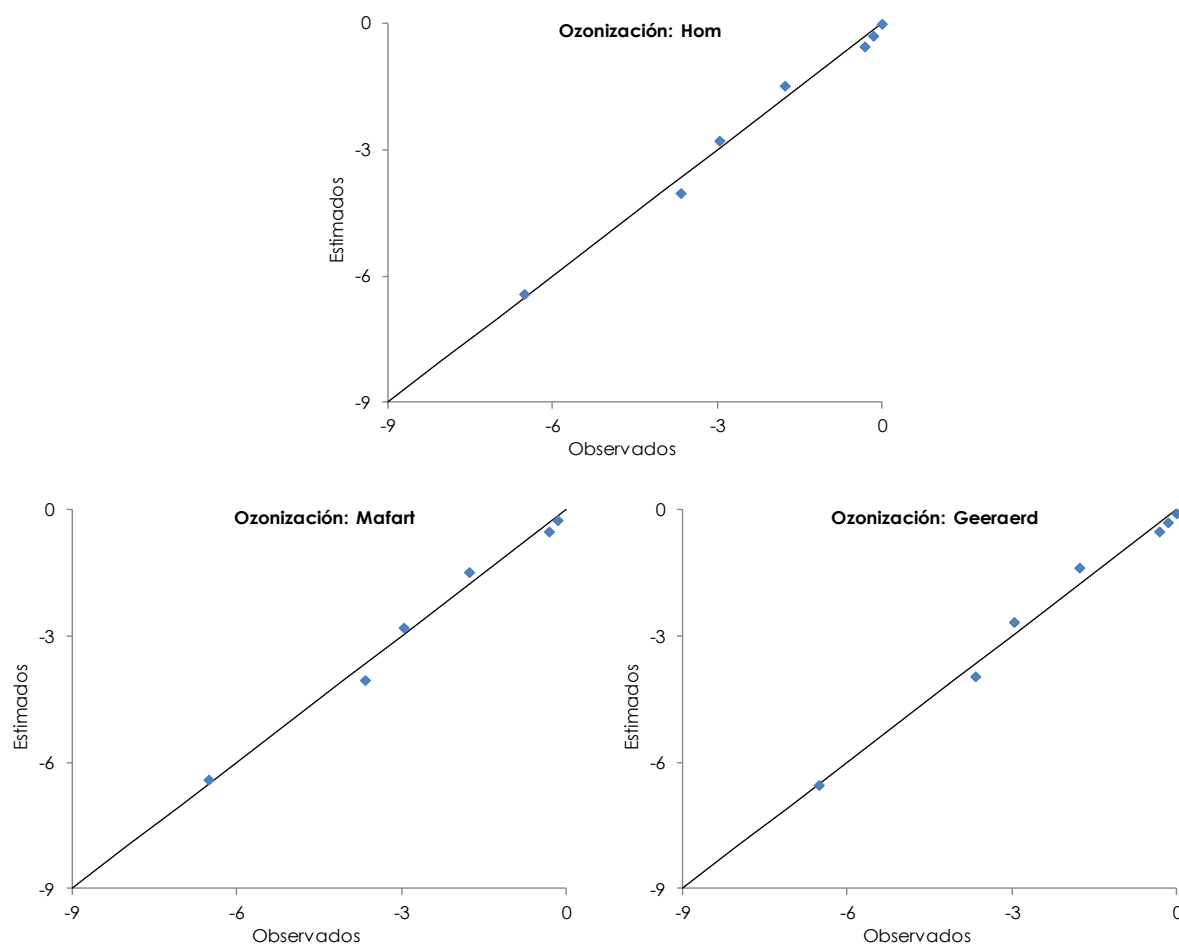


Figura XIV. Representación de los valores estimados frente a los observados en el tratamiento de ozonización.

En la Figura XV se muestra el ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos matemáticos durante el tratamiento peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Los valores observados frente a los estimados por cada modelo se representan en la Figura XVI.

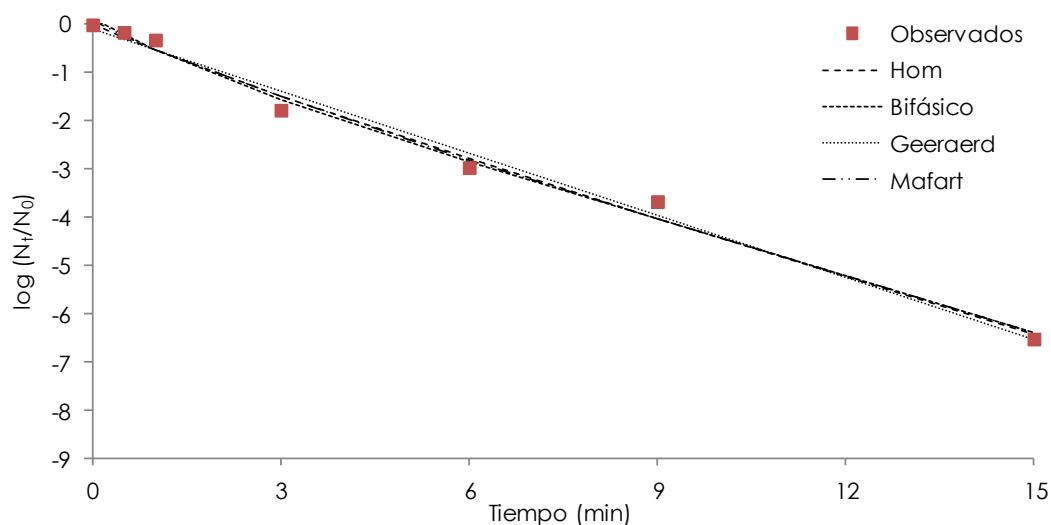


Figura XV. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en el tratamiento peroxona $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

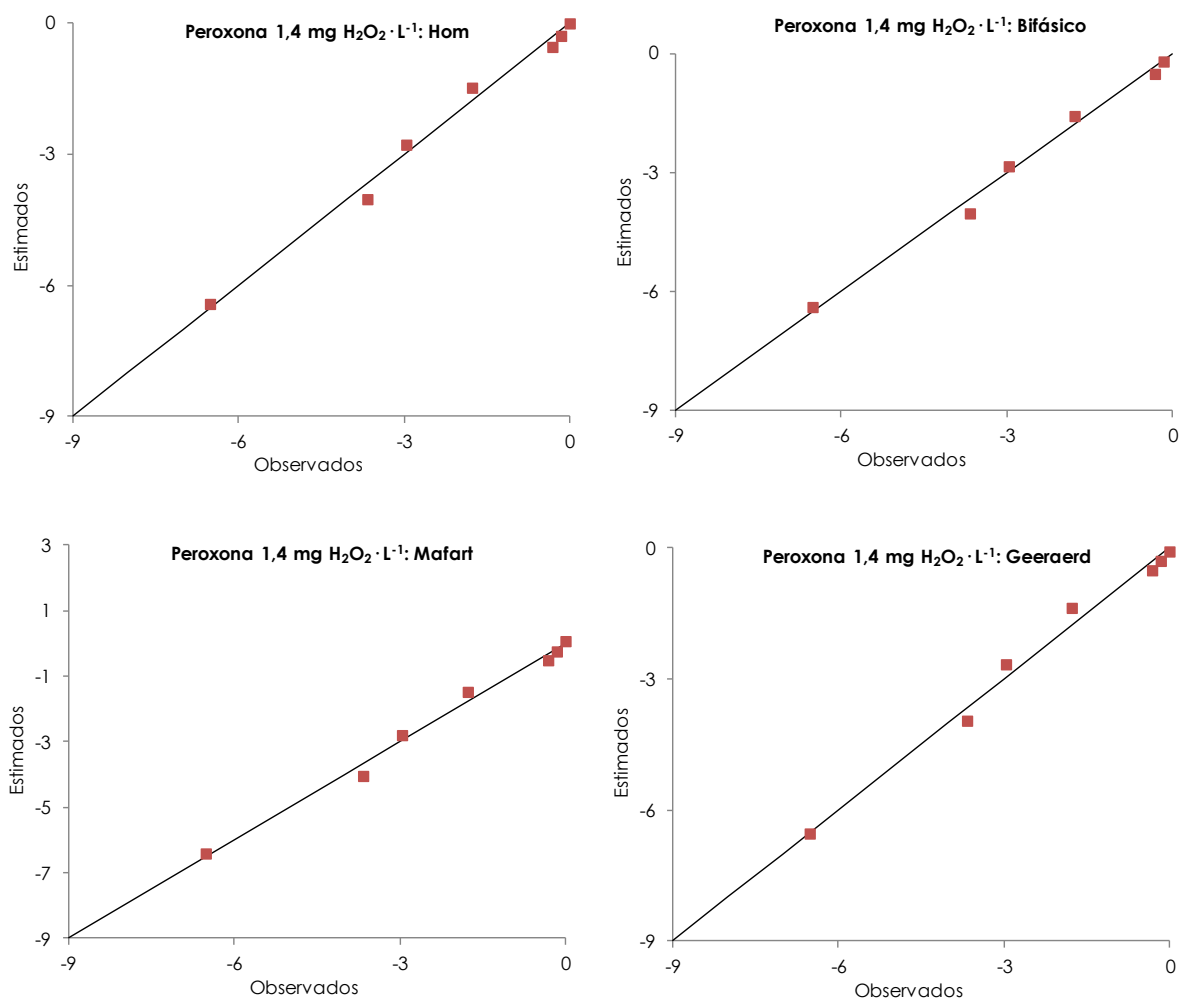


Figura XVI. Representación de los valores estimados frente a los observados en el tratamiento peroxona $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

En la Figura XVII se observa el ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos matemáticos durante el tratamiento peroxona con $1,4 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Los valores observados frente a los estimados por cada modelo se muestran en la Figura XVIII.

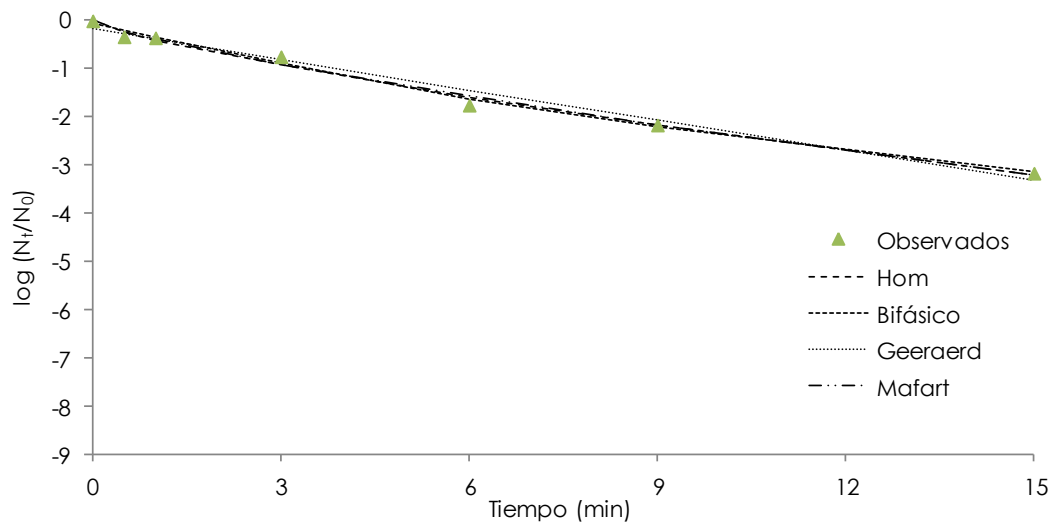


Figura XVII. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en el tratamiento peroxona $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

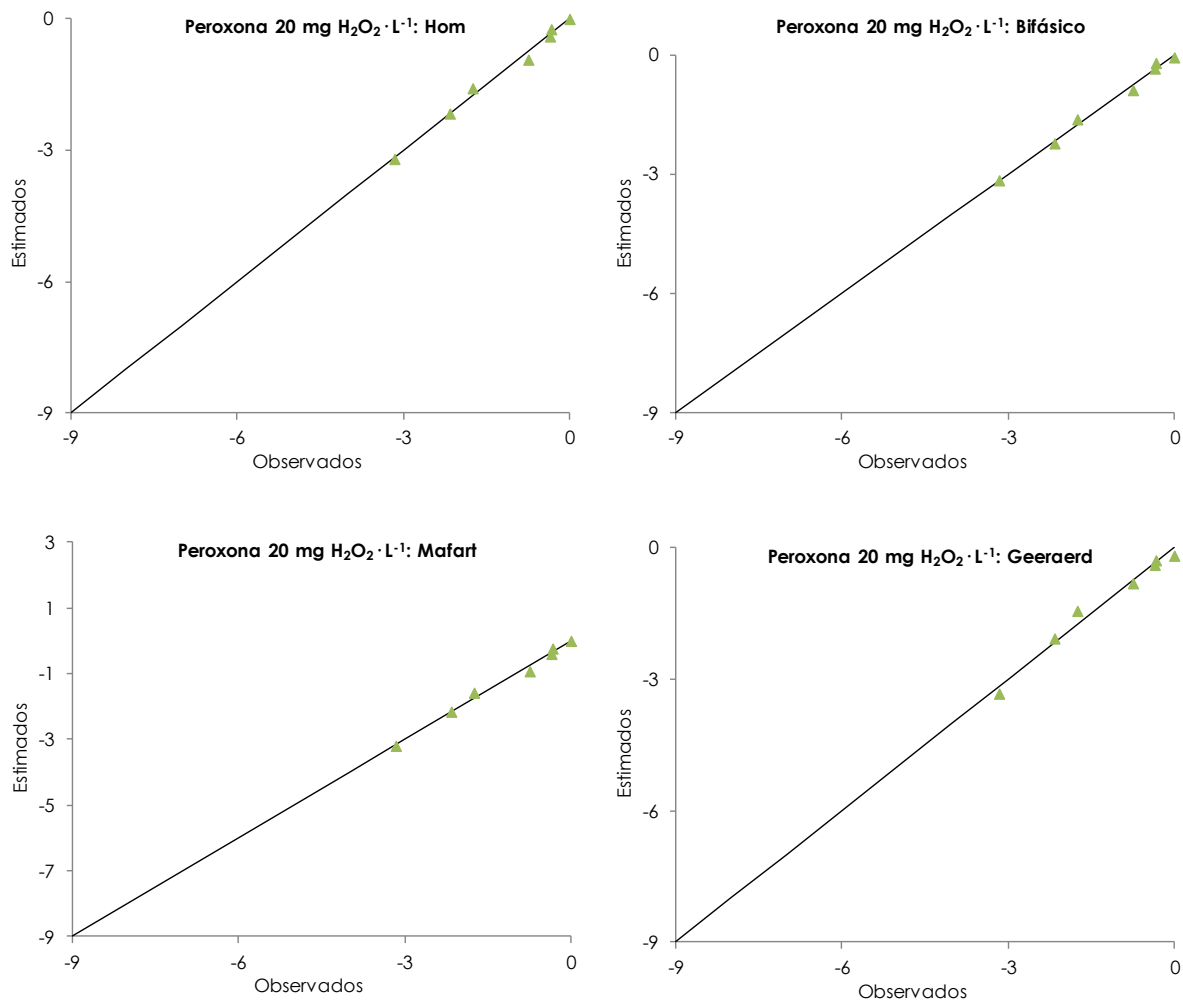


Figura XVIII. Representación de los valores estimados frente a los observados en el tratamiento peroxona $20 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

VI.II.iii. Tratamientos basados en radiación UV/vis

En la Figura XIX se observa el ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos matemáticos durante el tratamiento radiación UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Los valores observados frente a los estimados por cada modelo se muestran en la Figura XX.

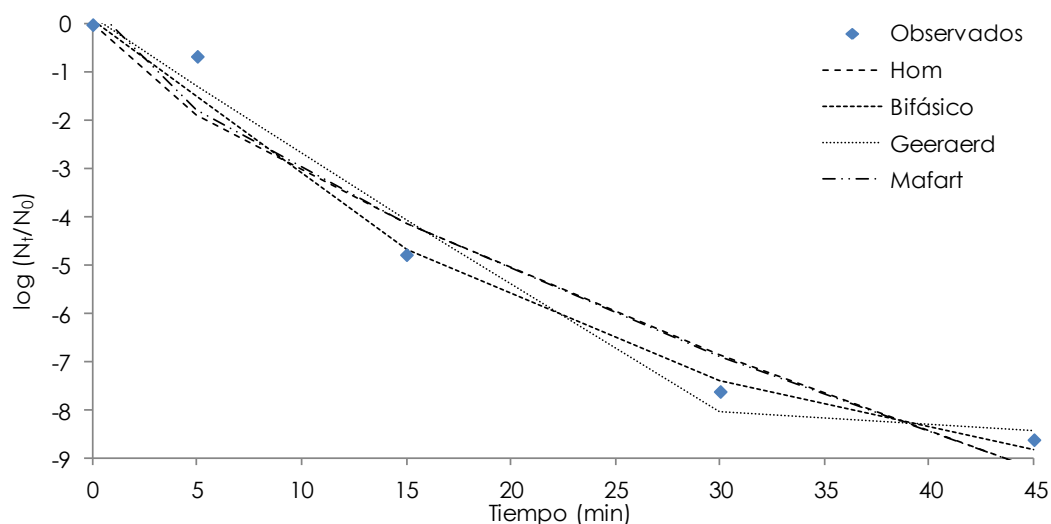


Figura XIX. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en el tratamiento radiación UV/visible + $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

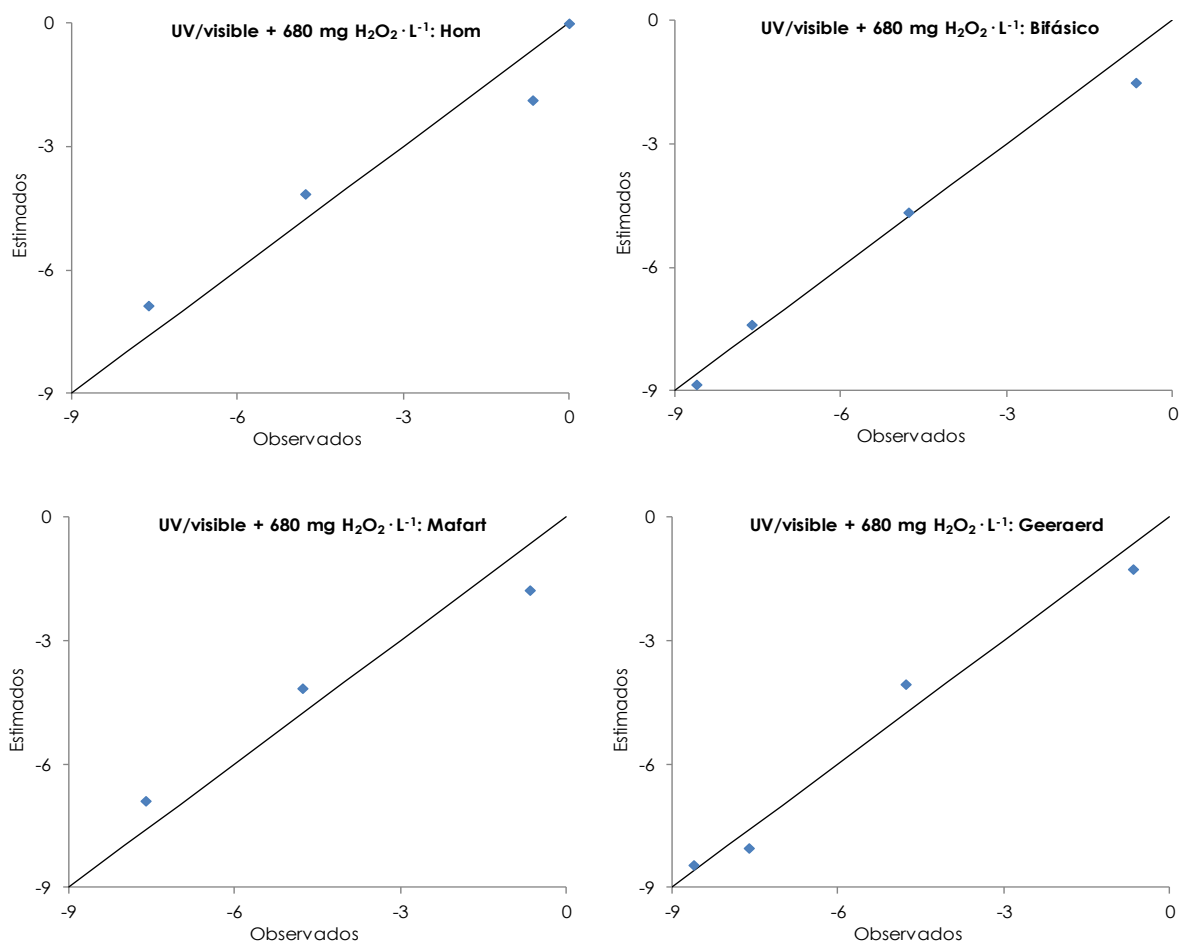


Figura XX. Representación de los valores estimados frente a los observados en el tratamiento radiación UV/visible + $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

El ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos matemáticos durante el tratamiento radiación UV/visible con $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ se puede observar en la Figura XXI. Los valores observados frente a los estimados por cada modelo se presentan en la Figura XXII.

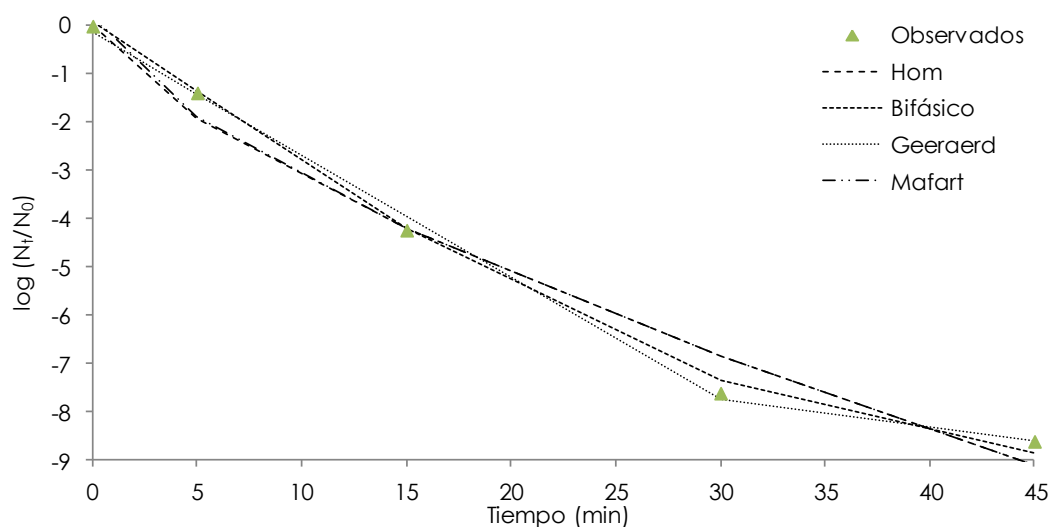


Figura XXI. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en el tratamiento TiO_2 / radiación UV/visible + $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ($1 \text{ g TiO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)

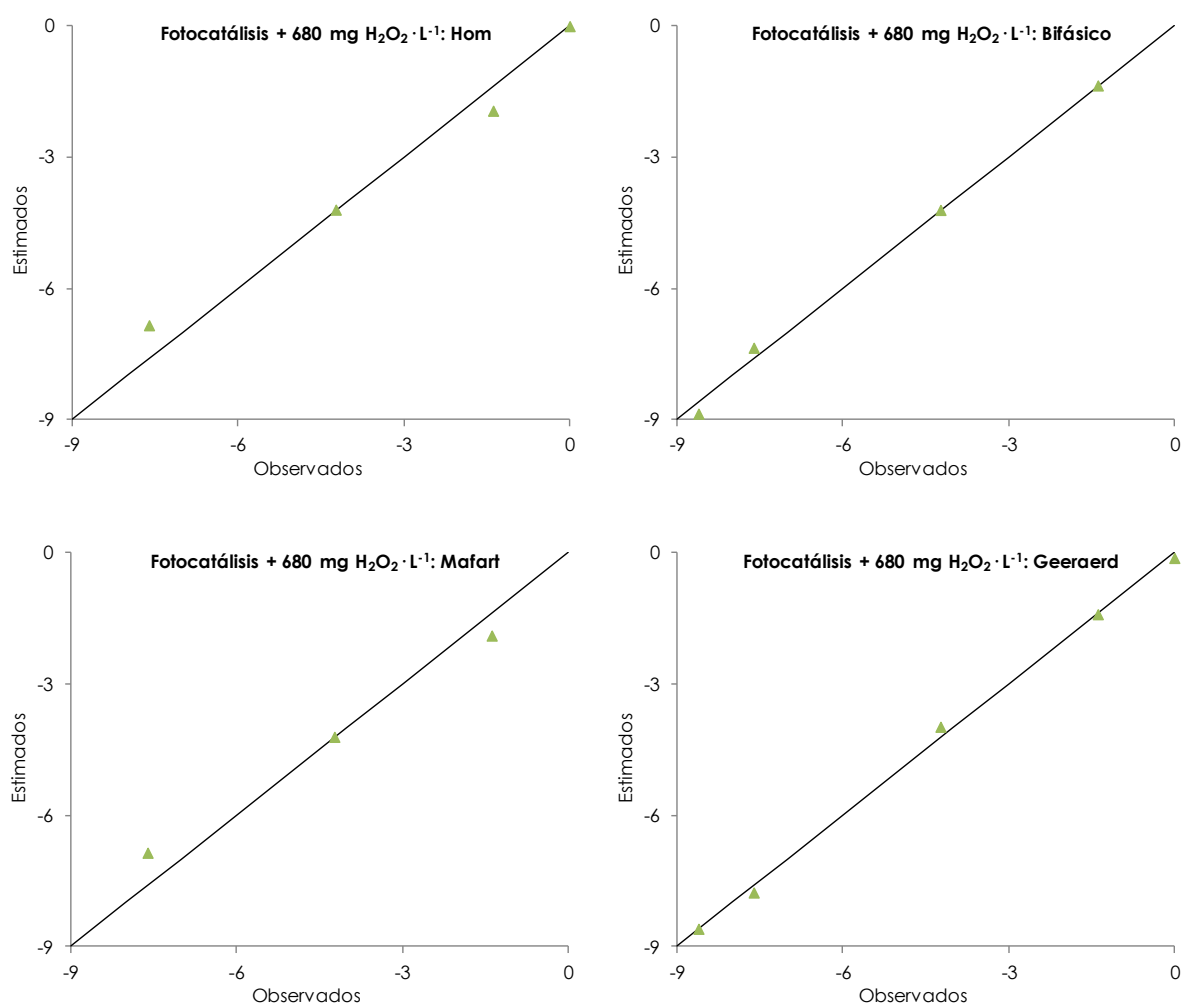


Figura XXII. Representación de los valores estimados frente a los observados en el tratamiento de fotocatálisis + $680 \text{ mg H}_2\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.