



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

*Eliminación de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas naturales mediante técnicas de oxidación avanzada basadas en ozono*

Autor

Javier Esteban Finol

Director

Rosa Mosteo Abad

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2014

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias...

A mis padres por el esfuerzo y trabajo que han realizado y están realizando para ofrecerme todas las oportunidades que disfruto. Gracias por vuestro apoyo, ánimo y paciencia. También a mi familia y sobre todo a Tania por apoyarme en todo momento y estar siempre a mi lado.

A Rosa por su ayuda y darme la oportunidad de hacer este trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Gracias a todos.

ELIMINACIÓN DE *PSEUDOMONA AERUGINOSA* EN AGUAS NATURALES MEDIANTE TÉCNICAS DE OXIDACIÓN AVANZADA BASADAS EN OZONO

RESUMEN

La posible exposición de las personas a los agentes biológicos, como bacterias patógenas, es uno de los principales factores de riesgo que están asociados al uso del agua. Entre las principales bacterias patógenas causantes de enfermedades de origen hídrico, se encuentran *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli* y *P.aeruginosa* todos ellos considerados indicadores de contaminación fecal aunque *P.aeruginosa* es el indicador de uso menos extendido y objetivo de este estudio de investigación.

Los tratamientos de desinfección más comunes, para la eliminación de contaminantes microbiológicos presentes en el agua, son la cloración y la ozonización directa. Sin embargo, los inconvenientes que presentan estos tratamientos, hacen que se estudien otras vías de desinfección como los procesos de oxidación avanzada. En este proyecto, se estudia la desinfección y eliminación de *P.aeruginosa* mediante procesos de oxidación avanzada basados en ozono.

El objetivo de este proyecto de investigación es el estudio de la desinfección y eliminación de *P.aeruginosa* mediante POAs basados en ozono. Dichos procesos son la combinación de ozono y peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2), la combinación de ozono y dióxido de titanio (O_3/TiO_2), y la combinación de ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$). Se estudia el efecto del tiempo de tratamiento y tipo de agente desinfectante. Además, mediante un estudio de las cinéticas de inactivación bacteriana se evalúa la eficiencia de los tratamientos de desinfección aplicados en este trabajo y se comparan los resultados con los obtenidos en el grupo de investigación, Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza, en procesos de potabilización de aguas naturales.

La adición de peróxido de hidrógeno al ozono mejora los resultados de inactivación respecto al tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la combinación ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio supone una mejora sobre el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio tanto desde el punto de vista de inactivación como desde el punto de vista de dosis de ozono.

Por otra parte, el uso de modelos de inactivación, puede predecir fielmente el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas de *P.aeruginosa* a la largo de un proceso de desinfección.

Índice General

Índice de Anexos	III
Índice de figuras-Memoria.....	V
Índice de figuras-Anexos	VI
Índice de tablas- Memoria.....	IX
Índice de tablas- Anexos.....	XI
Capítulo 1. Introducción y objetivos.....	1
Capítulo 2. Contaminación microbiológica del agua	3
Capítulo 3. Desinfección del agua.....	5
3.1. Desinfección convencional	5
3.1.1. Cloro y derivados.....	5
3.1.2. Ozono.....	5
3.2. Desinfección basada en POAs	6
Capítulo 4. Procedimiento experimental	8
4.1. Metodología analítica.....	8
4.1.1. Análisis físico-químico	8
4.1.2. Análisis microbiológico <i>P.aeruginosa</i>	8
4.2. Muestras.....	11
4.3. Descripción de experimentos. Materiales y reactivos	11
4.3.1. Ozono.....	11
4.3.2. Dióxido de titanio.....	12
4.3.3. Peróxido de hidrógeno	12
4.4. Condiciones de operación de los ensayos propuestos	12
4.5. Modelos cinéticos de inactivación microbiana. Ajuste de datos experimentales e índices de error	13
4.5.1. Modelos cinéticos.....	13
4.5.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error	14
4.6. Tratamiento de los datos	15
Capítulo 5. Resultados.....	16
5.1. Resultados inactivación <i>P.aeruginosa</i>	16
5.1.1. Ozonización	16
5.1.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂)	19
5.1.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O ₃ /TiO ₂)	22
5.1.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio (O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂)	24
5.2. Modelización cinética	29

5.2.1. Ozonización	30
5.2.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2)	31
5.2.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O_3/TiO_2)	31
5.2.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$)	32
5.3. Análisis de los modelos cinéticos	33
5.3.1. Ozonización	33
5.3.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2)	35
5.3.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O_3/TiO_2)	36
5.3.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$)	38
5.4 Estudio económico	39
Capítulo 6. Conclusiones.....	40
Capítulo 7. Bibliografía.....	42

Índice de Anexos

ANEXO I. Normas de calidad microbiológica en aguas	49
ANEXO II. Terminología microbiológica	51
II.1. Bacterias	51
II.2. Protozoos	52
II.3. Virus	53
II.4. Indicadores microbiológicos de contaminación fecal.....	53
II.4.1. <i>Escherichia coli</i>	54
II.4.2. <i>Clostridium perfringens</i>	55
II.4.3. <i>Enterococcus sp.</i>	55
II.4.4. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	55
ANEXO III. Técnicas convencionales y procesos de oxidación avanzada.....	58
III.1. Desinfección convencional con ozono.....	61
III.2. Procesos de oxidación avanzada.....	63
III.2.1. Clasificación de los procesos de oxidación avanzada.....	63
III.2.2. POAs utilizados.....	64
ANEXO IV. Desarrollo de la metodología analítica físico-química.....	68
IV.1. Turbidez.....	68
IV.2. Conductividad.....	68
IV.3. pH.....	68
IV.4. Sólidos en Suspensión Totales (S.S.T)	68
IV.5. Peróxido de Hidrógeno	68
ANEXO V. Metodología microbiológica.....	70
V.1. Fortificación de muestras con <i>Pseudomona aeruginosa</i>	70
V.2. Análisis de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	70
ANEXO VI. Tratamientos basados en Ozono	75
VI.1. Descripción detallada de la instalación de ozonización	75
VI.2. Calibración del ozonizador.....	76
IV.2.1. Método Iodométrico	76
IV.2.2. Recta de calibrado	77
ANEXO VII. Modelos cinéticos de inactivación microbiana	79
VII.1. Descripción de modelos.....	79
VII.1.1. Modelo de Chick-Watson (1908)	79
VII.1.2. Modelo de Hom (1972)	81

VII.1.3. Modelo de bifásico de Pruitt y kamau (1993).....	82
VII.1.4. Modelo de Mafart (2002)	82
VII.1.5. Modelo de Gereard	83
VII.2. Ajuste datos experimentales e índices de error	83
ANEXO VIII. Estudio económico	86
ANEXO XI. Resultados.....	89
IX.1. Resultados Físico-químicos	89
IX.2. Resultados de inactivación	89
IX.2.1. Ozonización	89
IX.2.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂)	92
IX.2.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O ₃ /TiO ₂).	94
IX.2.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio (O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂).....	96
IX.3. Cinéticas de inactivación.....	97
IX.3.1. Ozonización	97
IX.3.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂)	99
IX.3.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O ₃ /TiO ₂)	102
IX.3.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio (O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂)	104

Índice de figuras-Memoria

Figura 1. Apariencia de las colonias de <i>P.aeruginosa</i> en el agar de selectivo Centrimide . Método de siembra superficie.	9
Figura 2. Descripción de la instalación de ozonización.....	11
Figura 3. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: Gyürek and Finch, 1998).	13
Figura 4. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozonización. $N_0 \approx 7,2 \cdot 10^8$ UFC·100mL ⁻¹	17
Figura 5. Comparativa en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. ($N_0 \approx 3,2 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹), <i>C. perfringens</i> ($N_0 \approx 2,7 \cdot 10^6$ UFC· 100 mL ⁻¹) y <i>E.coli</i> ($N_0 \approx 3,5 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹) con la obtenida para <i>P.aeruginosa</i> ($N_0 \approx 7,2 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹) en los tratamientos de ozonización.	18
Figura 6. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con <i>P.aeruginosa</i> . $N_0 = 2,37 \cdot 10^9$ UFC·100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04 mM.....	20
Figura 7. Comparativa en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. ($N_0 \approx 4,7 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹), <i>C. perfringens</i> ($N_0 \approx 9,8 \cdot 10^5$ UFC· 100 mL ⁻¹) y <i>E.coli</i> ($N_0 \approx 4,35 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹) con la obtenida para <i>P.aeruginosa</i> ($N_0 \approx 2,37 \cdot 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹) en los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno.	21
Figura 8. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con TiO ₂ sobre la muestra agua fortificada. $N_0 = 2,1 \cdot 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [TiO ₂]= 1 g·L ⁻¹	23
Figura 9. Comparativa en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. ($N_0 \approx 6,2 \cdot 10^7$ UFC· 100 mL ⁻¹), <i>C. perfringens</i> ($N_0 \approx 1,6 \cdot 10^6$ UFC· 100 mL ⁻¹) y <i>E.coli</i> ($N_0 \approx 4,14 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹) con la obtenida para <i>P.aeruginosa</i> ($N_0 \approx 2,1 \cdot 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹) en los tratamientos de ozono combinado con dióxido de titanio.....	24
Figura 10. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> . en el tratamiento O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂ sobre la muestra de agua fortificada. $N_0 = 1,72 \cdot 10^9$ UFC·100mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04mM. [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	25
Figura 11. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> tras los tratamiento con O ₃ (×), O ₃ /H ₂ O ₂ (▲), O ₃ /TiO ₂ (◆), H ₂ O ₂ /TiO ₂ /O ₃ (■). $N_0 \approx 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04 mM. [TiO ₂]=1 g L ⁻¹	26
Figura 12. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> tras los tratamiento con O ₃ (×), O ₃ /H ₂ O ₂ (▲).....	27
Figura 13. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> tras los tratamiento con O ₃ /TiO ₂ (◆), H ₂ O ₂ /TiO ₂ /O ₃ (■).....	27
Figura 14. Comparativa en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. ($N_0 \approx 7,5 \cdot 10^7$ UFC· 100 mL ⁻¹) y <i>E.coli</i> ($N_0 \approx 4,35 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹) con la obtenida para <i>P.aeruginosa</i> ($N_0 \approx 1,72 \cdot 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹) en los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.	28

Índice de figuras-Anexos

Figura A- I. Diagrama simplificado de la envoltura celular de bacterias grampositivas y gramnegativas.....	52
Figura A- II. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento.	70
Figura A- III. Aspecto de colonias de <i>P.aeruginosa</i> en el agar centrimide.....	71
Figura A- IV. Esquema del método de diluciones decimales seriadas.	72
Figura A- V. Aspecto de las colonias de <i>P.aeruginosa</i> en las placas de Petri después de utilizar el método de diluciones decimales seriadas de una muestra de agua y su posterior análisis por el método de siembra en superficie.	72
Figura A- VI. Método de filtración por membrana (<i>Millipore</i>).	74
Figura A- VII. Aspecto de colonias de <i>P.aeruginosa</i> . Método de filtración de membrana.	74
Figura A- VIII. Esquema de generación de ozono mediante descarga eléctrica.....	75
Figura A- IX. Descripción de la instalación de ozonización.	76
Figura A- X. Curva de calibrado del ozonizador para un caudal de 50 L·h ⁻¹ . Potencia de ozonización 1,5 W y presión de oxígeno 1 bar.	78
Figura A- XI. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: <i>Gyürék and Finch, 1998</i>).....	80
Figura A- XII. Inactivación de <i>C.Perfringens</i> y <i>Enterococcus sp.</i> tras el tratamiento de ozonización N_0 (<i>C.Perfringens</i>) $\approx 10^6$ UFC· 100 mL ⁻¹ , N_0 (<i>Enterococcus sp.</i>) $\approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹	91
Figura A- XIII. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> y <i>E.coli</i> tras el tratamiento de ozonización. N_0 (<i>P.aeruginosa</i>) $\approx 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹ , N_0 (<i>E.coli</i>) $\approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹	91
Figura A- XIV. Inactivación de <i>C.Perfringens</i> y <i>Enterococcus sp.</i> tras el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno . N_0 (<i>C.Perfringens</i>) $\approx 10^6$ UFC· 100 mL ⁻¹ N_0 (<i>Enterococcus sp.</i>) $\approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04mM.	93
Figura A- XV. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> y <i>E.coli</i> tras el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno. N_0 (<i>P.aeruginosa</i>) $\approx 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹ , N_0 (<i>E.coli</i>) $\approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04mM.	93
Figura A- XVI. Inactivación de <i>C.Perfringens</i> y <i>Enterococcus sp.</i> tras el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio . N_0 (<i>C.Perfringens</i>) $\approx 10^7$ UFC· 100 mL ⁻¹ , N_0 (<i>Enterococcus sp.</i>) $\approx 10^7$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	95
Figura A- XVII. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> y <i>E.coli</i> tras el tratamiento de ozonización. N_0 (<i>P.aeruginosa</i>) $\approx 10^9$ UFC· 100 mL ⁻¹ , N_0 (<i>E.coli</i>) $\approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	95
Figura A- XVIII. Inactivación de <i>P.aeruginosa</i> y <i>E.coli</i> tras el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. N_0 (<i>Enterococcus sp.</i>) $\approx 10^7$ UFC· 100 mL ⁻¹ ,	

N_0 (<i>P.aeruginosa</i>) $\approx 10^9$ UFC \cdot 100 mL ⁻¹ , N_0 (<i>E.coli</i>) $\approx 10^8$ UFC \cdot 100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04mM. [TiO ₂]=1 g \cdot L ⁻¹	97
Figura A- XIX. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozonización.....	97
Figura A- XX. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozonización.....	98
Figura A- XXI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozonización.	98
Figura A- XXII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozonización.	99
Figura A- XXIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geereard aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozonización.	99
Figura A- XXIV. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno.....	100
Figura A- XXV. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento con peroxona.....	100
Figura A- XXVI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento con peroxona.....	101
Figura A- XXVII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento con peroxona.....	101
Figura A- XXVIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geereard aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento con peroxona.....	102
Figura A- XXIX. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.	102
Figura A- XXX. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la	

	inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.	103
Figura A-	XXXI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.	103
Figura A-	XXXII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento ozono combinado con dióxido de titanio.	104
Figura A-	XXXIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geereard aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.	104
Figura A-	XXXIV. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.	105
Figura A-	XXXV. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.	105
Figura A-	XXXVI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.	106
Figura A-	XXXVII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.	106
Figura A-	XXXVIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geereard aplicados en la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.	107

Índice de tablas- Memoria

Tabla 1. Instrumentación, metodología, rango de medida y error de cada uno de los instrumentos para la caracterización físico-química de las muestras. (Eaton et al., 2005)	8
Tabla 2. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos.	9
Tabla 3. Condiciones de operación de los tratamientos estudiados.	13
Tabla 4. Modelos cinéticos de estudio aplicados.....	14
Tabla 5. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra de agua fortificada con <i>P.aeruginosa</i>	16
Tabla 6. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.	16
Tabla 7. Resumen de las condiciones en los tratamientos para la eliminación de <i>P.aeruginosa</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , células vegetativas de <i>C. perfringens</i> y <i>E.coli</i>	19
Tabla 8. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con <i>P.aeruginosa</i>	19
Tabla 9. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.	20
Tabla 10. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O ₃ combinado con TiO ₂ sobre el agua fortificada con <i>P.aeruginosa</i>	22
Tabla 11. Condiciones del tratamiento de O ₃ combinado con TiO ₂ e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo. [TiO ₂]= 1 g L ⁻¹	22
Tabla 12. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂ sobre la muestra agua fortificada con <i>P.aeruginosa</i> . [H ₂ O ₂]=0,04mM. [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	24
Tabla 13. Condiciones del tratamiento de O ₃ combinado con TiO ₂ y H ₂ O ₂ sobre la muestra agua fortificada con <i>P.aeruginosa</i> . [H ₂ O ₂]=0,04mM. [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	25
Tabla 14. Resumen de los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección estudiados para <i>P.aeruginosa</i> en comparación con <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus sp.</i> y <i>C. perfringens</i>	29
Tabla 15. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de ozonización.....	30
Tabla 16. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>P.aeruginosa</i> en el tratamiento de peroxona.	31

Tabla 17. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de O₃/TiO₂.31

Tabla 18. Parámetros cinéticos del modelo de Hom, modelo bifásico y modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de O₃/TiO₂/H₂O₂.32

Tabla 19. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento de ozonización.....33

Tabla 20. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento con peroxona.35

Tabla 21. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento de O₃/TiO₂.36

Tabla 22. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* en el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂.38

Índice de tablas- Anexos

Tabla A- I. Subproductos de desinfección del cloro y el ozono. (<i>Rivera et al.,2010</i>)	61
Tabla A- II. Principales características físicas del ozono.	62
Tabla A- III. Potenciales estándar de oxidación.	63
Tabla A- IV. Composición del agar Centrimide.	71
Tabla A-V. Tabla resumen de los resultados físico-químicos en los tratamientos estudiados sobre las muestras de agua fortificadas con <i>P.aeruginosa</i>	89
Tabla A-VI. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	90
Tabla A- VII. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	90
Tabla A- VIII. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	92
Tabla A- IX. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	92
Tabla A- X. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	94
Tabla A- XI. Condiciones del tratamiento ozono combinado con dióxido de titanio e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	94
Tabla A- XII. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	96
Tabla A- XIII. Condiciones del tratamiento ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio e inactivación de <i>P.aeruginosa</i> a lo largo del tiempo.....	96

MEMORIA

Capítulo 1. Introducción y objetivos

El agua, además de ser el sustento de la vida en nuestro planeta es el compuesto químico más abundante en la biosfera. Sin embargo, se estima que la cantidad total de agua en nuestro planeta es de unos 1190 mil billones de m³ pero menos del 3% se encuentra como agua dulce y la mayor parte de esta se encuentra almacenada en forma de hielo en los cascos polares y glaciares, mientras que el resto se encuentra como agua subterránea o superficial. Por lo tanto se puede considerar que las cantidades de agua dulce son finitas (Marín, 2003).

En todo tipo de aguas los agentes biológicos son uno de los contaminantes más importantes. Las bacterias patógenas son un agente biológico que producen un gran riesgo para el hombre, ya que son la causa de enfermedades de origen hídrico. Por lo que es necesario el control microbiológico del agua para evitar que puedan desembocar en epidemias. En este trabajo se analiza la *Pseudomonas aeruginosa* que se considera como indicador de contaminación fecal, aunque de uso menos extendido que *E.coli* o *Enterococcus sp.*

La cloración, técnica convencional utilizada en la desinfección de aguas, resulta eficaz y económicamente rentable, aunque en presencia de materia orgánica produce trihalometanos, compuestos cancerígenos para el hombre (Black & Veatch Corporation, 2010). Ante la creciente necesidad de encontrar alternativas económica y medioambientalmente sostenibles, así como de evitar los inconvenientes de las técnicas convencionales, se están investigando y desarrollando nuevos métodos de tratamiento del agua, como son los procesos de oxidación avanzada (POAs). Estos procesos se basan en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre los que destaca el radical hidroxilo por su elevado poder oxidante, tan solo superado por el del flúor (Parsons, 2014). Los POAs más utilizados incluyen la ozonización a elevado pH, el sistema peroxona, la irradiación ultravioleta, la fotocatalisis y el proceso Fenton.

De los estudios publicados hasta la fecha sobre desinfección mediante POAs en agua, la mayoría se centran en la inactivación de *Escherichia coli*, una bacteria gram-negativa comúnmente utilizada como indicador de contaminación fecal (Rincón y Pulgarín, 2003; Cho et al., 2004; Diao et al., 2004; Spuhler et al., 2010;...). En el presente trabajo de investigación se ha seleccionado *P.aeruginosa* como bacteria de estudio, a pesar de ser un indicador de contaminación fecal de uso menos extendido, se obtienen aislamientos de esta bacteria del al 2 y el 8% de las heces de personas sanas (Hardalo, 1997). Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar.

El objetivo principal del trabajo es el estudio de tratamientos de oxidación avanzada basados en el ozono como técnica de desinfección y eliminación del indicador bacteriano de contaminación fecal *Pseudomonas aeruginosa*, presente en las aguas naturales.

Dicho objetivo se basa en los siguientes objetivos complementarios:

1. Estudio de POAs en la desinfección y eliminación de *P.aeruginosa* basados en ozono (O_3), combinación de ozono y peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2), combinación de ozono y dióxido de titanio (O_3/TiO_2), y la combinación de ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$).
2. Estudio y aplicación de modelos matemáticos primarios sobre los resultados de la inactivación de *P.aeruginosa* obtenidos en los distintos procesos de desinfección.
3. Estudio de la influencia del tratamiento en función del germen patógeno a partir de los resultados obtenidos en el grupo de investigación, Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza.

Capítulo 2. Contaminación microbiológica del agua

Gérmenes patógenos de transmisión hídrica

Los principales microorganismos que existen en las aguas naturales y en las aguas residuales son las bacterias, hongos, algas, protozoos, gusanos, rotíferos, crustáceos y virus.

El número y desarrollo de bacterias y microorganismos depende de parámetros tales como pH, temperatura, materia orgánica incorporada y existencia de oxígeno. Todos los microorganismos requieren de un ambiente húmedo para su crecimiento.

Una clasificación básica es si el organismo requiere o no de una fuente externa de materia orgánica. (Tebbutt, 1999). Se puede distinguir dentro de este grupo los organismos autótrofos y los heterótrofos:

- Los organismos autótrofos son capaces de sintetizar sus requerimientos orgánicos a partir de materia inorgánica y pueden crecer independientemente de las sustancias orgánicas externas. Emplean dos métodos para poder alcanzar dicho fin, la fotosíntesis y la quimiosíntesis.
- Los organismos heterótrofos requieren una fuente externa de materia orgánica, se pueden distinguir tres tipos principales: los saprófobos, los fagótrofos y paratófos. Los saprófobos obtienen la materia orgánica soluble directamente del ambiente circundante o por la digestión extracelular de compuestos insolubles. Los fagótrofos, también llamados holozoicas, utilizan partículas orgánicas sólidas. Los paratófos obtienen la materia orgánica a partir de los tejidos de otros organismos, por lo que se denominan parásitos.

Los organismos difieren además en sus requerimientos de oxígeno: los aerobios que requieren de la presencia de oxígeno libre, mientras que los anaerobios existen en ausencia del mismo. Las formas facultativas viven por lo general en ambiente con oxígeno, pero pueden vivir en ambientes sin él si las circunstancias lo requieren. En lo referente a la temperatura existen tres tipos principales de organismos: los psicrófilos, que viven a una temperatura cercana a los 0°C; los mesófilos, que viven a temperaturas comprendidas entre los 15°C y 40°C; y los termófilos, que viven a temperaturas de 50°C a 70°C. En la práctica se pueden encontrar organismos que viven en condiciones de temperatura de 0°C a 70°C.

Los microorganismos son aquellos organismos de dimensiones microscópicas para poder ser vistos a simple vista. Dentro de este grupo se encuentran un gran número de organismos acuáticos. Los organismos superiores se identifican como plantas o animales. La aplicación de tal diferenciación para identificar a los microorganismos es difícil debido a las estructuras simples de sus células y se ha convenido denominar los protistas, los cuales se dividen a su vez en procariotas y eucariotas. Los procariotas, son estructuras celulares simples y pequeñas (<5µm) con núcleo rudimentario y un cromosoma. Su

reproducción es por fisión¹ binaria. Los eucariotas, son células más grandes (>20µm) con una estructura más compleja y que contienen varios cromosomas. Su reproducción puede ser asexual o sexual y tienen ciclos de vida muy complejos. En esta clasificación se incluyen los hongos, la mayoría de las algas y los protozoos.

Existe un grupo adicional de microorganismos, los virus, que no se pueden clasificar en ninguno de las dos clases anteriores y, por esta razón se consideran por separado.

Se puede por tanto distinguir tres grupos de microorganismos diferentes que se pueden transmitir a través del agua de abastecimiento: virus, bacterias y protozoos. Dicha transmisión se realiza por la vía fecal-oral y se tiene lugar por la contaminación, tanto directa como indirecta, de los recursos de agua por las aguas residuales o en ocasiones por desechos de animales.

Las características microbiológicas del agua vienen regidas por la población de microorganismos acuáticos que alberga y que afectan de un modo muy importante a su calidad. Algunos de estos microorganismos pueden dañar de forma más o menos grave la salud humana, tanto por sí mismos como mediante la producción de toxinas durante su ciclo vital, dando lugar a las denominadas enfermedades de transmisión hídrica. La forma más peligrosa de contaminación de agua es la que se produce, a través de la transmisión fecal-oral, mediante la cual un microorganismo patógeno eliminado en las heces humanas o de animales contamina el medio acuático y luego es ingerido. Los microorganismos más numerosos que pueden albergar las diferentes masas de agua existentes en nuestro planeta se pueden clasificar en bacterias, protozoos y virus (Guimaraes et al., 2001; Tortor, 1993).

Pseudomona aeruginosa

El grupo de Pseudomonas se incluye dentro del grupo general de microorganismos quimioheterótrofos aeróbicos gram-negativos. Se trata de bacilos flagelados, y actualmente se conocen 30 especies distintas de este grupo.

La *P.aeruginosa* es un organismos oxidasa positivo, que no forma esporas ni se encapsula y produce un pigmento azul verdoso característico denominado pionicianina².

En el tracto intestinal, tanto humano como animal, es uno de los microorganismos más comunes además de ser uno de los más estudiados (ANEXO II). En 1895, Smith sugirió una prueba para este microorganismo como índice de contaminación fecal, estableciendo que su presencia en agua indica contaminación reciente. Hay investigaciones que apoyan su uso sólo como indicador de origen exclusivamente bacteriano (Moriñigo et al., 1990; Casteel et al., 2000).

¹ Fisión: Forma de reproducción asexual que consiste en la división de una célula u organismo en dos o más partes.

² Pionicianina: Pigmento azul o verde azulado que puede ser extraído de *P.aeruginosa* con cloroformo.

Capítulo 3. Desinfección del agua

La desinfección del agua puede realizarse de diversas formas, la más antigua se basa en los mecanismos de desinfección naturales del agua. El agua que se filtra a través del suelo y las rocas, llega a los acuíferos subterráneos, está libre de microorganismos. Las aguas de manantial están libres de microorganismos patógenos. Sin embargo, si el agua subterránea está a poca profundidad o si el terreno cercano está muy cargado de desechos humanos y animales, la capacidad de filtración del suelo no resulta suficiente originando la contaminación de los manantiales. (*Spiro, 2004*)

La definición formal de desinfección del agua se refiere a la destrucción de los organismos causantes de enfermedades o patógenos presentes en ella. Los principales organismos son bacterias, virus y protozoos (*Arboleda, 2000*).

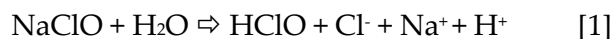
La efectividad de un proceso de desinfección se mide por el porcentaje de organismos muertos dentro de un tiempo, una temperatura y un pH fijados. La resistencia de estos microorganismos varía según sus características morfológicas.

Los sistemas más adecuados para la prevención de la contaminación de las aguas por microorganismos es mantener los suministros de agua alejados de vertidos de aguas residuales y la aplicación de procesos de desinfección. Los desinfectantes más habituales son el ozono, el dióxido de cloro y el cloro, siendo de todos ellos el cloro el más común.

3.1. Desinfección convencional

3.1.1. Cloro y derivados

La desinfección con cloro se ha utilizado desde finales del siglo XIX para proteger los sistemas de abastecimiento y sigue utilizándose en nuestros días con el mismo fin. El cloro se puede aplicar en forma de cloro gas, hipoclorito sódico e hipoclorito cálcico. El hipoclorito sódico, comúnmente conocido como lejía, se disocia muy bien en el agua formando ácido hipocloroso según la [Ecuación 1]. El ácido hipocloroso, a su vez, se disocia en ión hipoclorito conforme a la [Ecuación 2].



Si hay presencia de amoníaco en las aguas que se van a clorar, se formarán cloraminas. Las cloraminas también tienen acción desinfectante, aunque inferior al cloro. En el ANEXO III se presenta, de forma desarrollada, la desinfección convencional utilizando cloro y derivados.

3.1.2. Ozono

A principios del siglo XX se empezó a utilizar el ozono como desinfectante del agua del río Vesubio, en Niza. A lo largo de este siglo se extiende su uso no sólo a

tratamientos de potabilización de aguas, sino también en tratamientos de regeneración, desinfección de equipos e instalaciones y aplicaciones en el sector farmacéutico, alimentario y hospitalario (*Etron Ecology, 2001; Guzel-Seydim et al., 2004*).

El ozono es un gas de tonalidad azul muy inestable que se descompone rápidamente produciendo oxígeno y que presenta un olor característico. Es un desinfectante muy eficiente y un potente oxidante. Actúa sobre todo tipo de bacterias, virus y protozoos y se estima que su eficacia de inactivación microbiana es alrededor de 3.000 veces superior a la del cloro. Su potencial de oxidación es 2,07 V y es diez veces más soluble en agua que el oxígeno.

Se genera “in situ” mediante un equipo denominado ozonizador a partir de aire u oxígeno, introduciéndose en el agua a través de difusores porosos, hidroyectores o torres de contacto.

En el ANEXO III se presenta, de forma desarrollada, la desinfección convencional utilizando ozono.

3.2. Desinfección basada en POAs

Los procesos de oxidación avanzada agrupan a un conjunto de procesos capaces de generar especies reactivas de oxígeno. Dichas especies transitorias dentro de las que se encuentran los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) poseen un alto poder oxidante y un ataque poco selectivo, capaces de mineralizar o formar compuestos intermedios más biodegradables que los iniciales e inactivar gérmenes. (*Glaze, 1987*)

Dentro de los POAs basados en ozono se encuentran los siguientes procesos:

Ozonización a alto pH

El ozono, en medio acuoso y bajo condiciones de pH elevado es capaz de generar especies reactivas de oxígeno a través de lo que se conoce como “reacciones por vía indirecta” (*Hoigné y Bader, 1977; Lanao, 2012*). Estas reacciones se traducen en la producción de radicales libres hidroxilo por descomposición del ozono (*Hoigné y Bader, 1983; Lanao, 2012*).

El mecanismo de ataque de los radicales OH sobre los microorganismos se traduce en una oxidación de los componentes estructurales de la pared y membrana celular, similar a como actúa el ozono (*Maness et al., 1999; Huang et al., 2000; Lanao, 2012*). Los radicales ($\cdot\text{OH}$) pueden ser más nocivos sobre los componentes de la superficie celular que el ozono ya que su potencial de oxidación (2,70 V) es superior al del ozono molecular (2,07 V) y pueden reaccionar no selectivamente con los componentes de la estructura externa de la célula, que en ocasiones se resisten a la acción del ozono (*Cho y Yoon, 2006*).

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

El peróxido de hidrogeno es el oxidante más comúnmente utilizado en combinación con el ozono. Su combinación se denomina sistema peroxona. La formación de radicales hidroxilo se ve favorecido por el peróxido de hidrógeno, ya que es un iniciador del mecanismo radicalario del ozono (*Glaze et al., 1987; Staehelin y Hoigné, 1982*).

La efectividad microbicida de la peroxona depende en gran medida de varios factores, entre los que destacan la relación H_2O_2/O_3 , la dosis de ozono aplicada, la concentración de ozono residual, el tiempo de contacto, la calidad del agua y el tipo de microorganismo estudiado (*Wolfe, 1989*).

En el ANEXO III se presenta, de forma desarrollada, la desinfección basada en el sistema peroxona.

Ozonización catalítica (O_3/TiO_2)

Los catalizadores metálicos favorecen el mecanismo radicalario del ozono. Se utilizan óxidos de metales de transición en fase sólida que muestran una alta actividad catalítica (MnO_2 , TiO_2 , Al_2O_3) (*Gracia et al., 1999; Oppenländer, 2003*). Entre ellos, el dióxido de titanio presenta la ventaja de no producir disolución de titanio en el agua ozonizada, ya que con un pH mayor que 6, el titanio que se disuelve está por debajo del límite de detección (*Paillard et al., 1991*).

Las propiedades químicas de los catalizadores se deben a la existencia de centros activos en su superficie. En el caso concreto del dióxido de titanio, contiene sitios ácidos de Lewis. En medio acuoso, este catalizador es capaz de intercambiar cationes o aniones, generándose una carga positiva o negativa en su superficie, en función del pH de la disolución (*Rincón y Pulgarin, 2004; Miguel, 2010*).

El proceso de ozonización catalítica requiere menos dosificación de ozono y se ve menos afectado por atrapadores o “scavengers” de radicales presentes de manera natural en el agua, como los hidrogenocarbonatos. (*Lanao, 2012*).

En el ANEXO III se presenta, de forma desarrollada, la desinfección basada en la ozonización catalítica.

Capítulo 4. Procedimiento experimental

4.1. Metodología analítica

4.1.1. Análisis físico-químico

La Tabla 1 muestra la metodología normalizada de análisis de los parámetros físico-químicos utilizados en la caracterización de las muestras analizadas durante los tratamientos estudiados, así como la instrumentación relacionada, el rango de medida y el error de dicha instrumentación.

Tabla 1. Instrumentación, metodología, rango de medida y error de cada uno de los instrumentos para la caracterización físico-química de las muestras. (Eaton et al., 2005)

Parámetro	Instrumento	Marca	Modelo	Rango medida	Error	Método Normalizado
pH Temperatura	pH-metro	Crison	GLP 21	2 a 16 -20 a 150 °C	≤ 0,02 ≤ 0,3 °C	Método estándar ¹ 4500- HB
Conductividad	Conductímetro	Crison	Basic 30	0,01 a 19.999 µs cm ⁻¹	≤ 0,5 µs cm ⁻¹	Norma UNE 27888:1994
Turbidez	Turbidímetro	Hanna	LP 2000	00 a 50 NTU 50 a 10 ³ NTU	0,2 NTU	Norma ISO 7027: 1999
Sólidos en suspensión	Espectrofotómetro	Hach Lange	DR 2800		± 0,1 mg L ⁻¹	2540D Standard methods
Absorbancia	Espectrofotómetro UV/Visible	Thermospectronic	Helios α	-3 a 6 A	± 0,005 A	-----
Peróxido de hidrógeno residual	Test indicador de peróxidos (tiras reactivas)	Merck	Mercko quant®	0,5 a 25 mg L ⁻¹	-----	-----
Ozono residual	Test colorimétrico	Merck	Microquant®	0,05 a 4,00 mg L ⁻¹	± 0,1 mg L ⁻¹	-----

En el ANEXO IV se desarrolla la metodología analítica y la instrumentación utilizada en este trabajo.

4.1.2. Análisis microbiológico *P.aeruginosa*

La bacteria oportunista para animales y plantas objeto de estudio en el presente trabajo de investigación es *P.aeruginosa*.

Procedimiento normalizado

El cultivo y recuento de esta bacteria se realiza siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Europea EN ISO 16266:2008, que se adopta a la Norma Internacional ISO 16266:2006.

Equipos de laboratorio

Los equipos utilizados en el análisis microbiológico de *P.aeruginosa* se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos.

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

Medios de cultivo

El medio que se utiliza para el crecimiento microbiano de *P.aeruginosa* es el agar Centrimide. Las colonias de *P.aeruginosa* adquieren un color azul verdoso en este tipo de agar. La composición y preparación de este medio de cultivo se detalla en el ANEXO V.

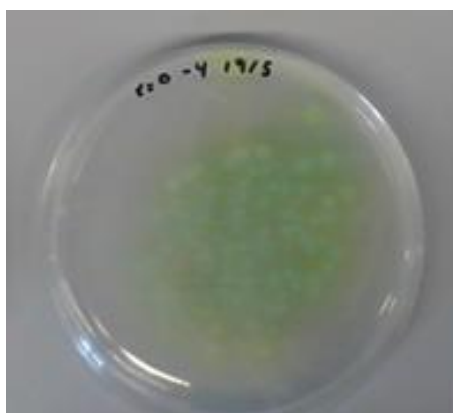


Figura 1. Apariencia de las colonias de *P.aeruginosa* en el agar de selectivo Centrimide . Método de siembra superficie.

Se utiliza el método de siembra superficie (Standard Methods 9215.C [Clesceri et al., 2005]) y el método de filtración por membrana (*Norma Europea EN ISO 16266-2008*) para el cultivo de *P.aeruginosa*. El método de siembra superficie se utiliza cuando la población bacteriana es mayor, mientras que el método de filtración por membrana se utiliza cuando la población no es muy elevada. Para poder analizar volúmenes de muestra que permitan un recuento adecuado de colonias de *P.aeruginosa* por el método de siembra superficie se recurre a las diluciones decimales seriadas. En el ANEXO V se describen los métodos de siembra superficie, filtración por membrana y el método de las diluciones decimales seriadas.

Incubación

Las placas de Petri se invierten y se introducen en la estufa de incubación durante (44 ± 4) horas a una temperatura de (36 ± 2) °C según establece la norma (*UNE EN ISO 16266-2006*).

Recuento e inactivación

Transcurrido el tiempo de incubación, se procede al recuento de las placas de Petri. Para facilitar la labor del recuento se utiliza un contador de colonias (Interscience Scan 100) provisto de una luz que retroilumina la placa y permite una mejor visualización de las colonias y de esta forma poderse contar con más exactitud.

El recuento en placa 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 cadena o agrupadas. Por consiguiente, a menudo una colonia no se produce como resultado de una única bacteria. Para reflejar esta realidad los recuentos en placa se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) (*Tortora et al., 2007*). Los datos de cada experimento realizado se expresan en UFC·100 mL⁻¹.

Es importante que el número de colonias que aparecen en las placas no sea demasiado grande, pues algunas colonias se pueden fusionar dando estimaciones erróneas. También se debe evitar que el número de colonias sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. Cuando no se detecta ningún microorganismo en la placa sembrada, el valor que se toma es 1 UFC·100 mL⁻¹ para permitir el cálculo posterior con logaritmos (*Madigan et al., 2003*). Para obtener el número apropiado de colonias se diluye la muestra, tal y como se explica en el ANEXO V.

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la [Ecuación 3], donde F_d es el factor de dilución, es decir, la inversa de la dilución seleccionada.

$$\frac{\text{UFC}}{100 \text{ mL}} = \frac{\text{UFC}}{\text{mL muestra filtrado}} \cdot 100 \text{ mL} \cdot F_d \quad [3]$$

4.2. Muestras

Las muestras utilizadas proceden de las aguas superficiales del canal imperial de Aragón. El canal imperial canaliza las aguas a partir de una derivación del río Ebro a la altura del término municipal de Fontellas (Navarra), y abastece a varios municipios que se encuentran a ambos lados del canal antes de llegar a Zaragoza.

La toma de muestras se lleva a cabo en Rosales del Canal antes de la captación de la potabilizadora de Casablanca, instalación que abastece de agua potable a la ciudad de Zaragoza. Se utilizan garrafas de 5 litros que han sido tratadas con hipoclorito sódico y una vez en el laboratorio se procede a la conservación de las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Para poder estudiar la influencia de los tratamientos de desinfección objeto de estudio se debe aumentar de manera artificial la concentración bacteriana originaria presente en el agua natural, partiendo así de una muestra fortificada. Para obtener dichas muestras fortificadas, se debe en primer lugar esterilizar las botellas de vidrio de Pyrex de 1L y todo aquel material que va estar en contacto con el agua natural para eliminar las bacterias presentes. Posteriormente, a partir de cultivos puros de *P. aeruginosas* que se encuentran en el laboratorio y tras la preparación de suspensiones bacterianas concentradas se añaden a las muestras de agua natural (Lanao, 2012). Las concentraciones iniciales de *P. aeruginosa* de la muestras fortificadas objeto de estudio van desde 10^8 UFC·100mL⁻¹ hasta $1,72 \cdot 10^9$ UFC·100mL⁻¹.

4.3. Descripción de experimentos. Materiales y reactivos

4.3.1. Ozono

El ozono se genera “in situ” en el laboratorio mediante un ozonizador Fischer modelo 500. El equipo consta de dos electrodos entre los que se establece un alto voltaje y por los que fluye una corriente de oxígeno puro. En la descarga eléctrica que se produce, se genera oxígeno atómico que al combinarse con el molecular produce una molécula de ozono.

En la Figura 2 se muestra un esquema de la instalación de ozonización y en el ANEXO VI se describe la instalación de ozonización.

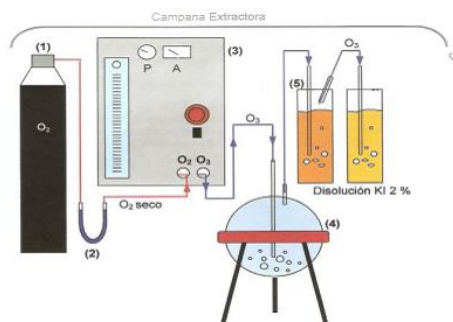


Figura 2. Descripción de la instalación de ozonización.

4.3.2. Dióxido de titanio

El TiO₂ utilizado en los tratamientos de ozonización es el comercial Degussa P25. La concentración que se utiliza en los tratamientos en los que interviene es de 1g·L⁻¹.

4.3.3. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno comercial utilizado en los experimentos es de la marca Carlo Erba con una concentración del 30% (v/v). La concentración que se utiliza en los tratamientos en los que interviene es de 4,55·10⁻³ mL_{H₂O₂}·L⁻¹_{muestra}.

4.4. Condiciones de operación de los ensayos propuestos

El caudal de oxígeno seleccionado para los ensayos es 50 L·h⁻¹ y la dosis de ozono generada con este caudal de oxígeno es de 894 mgO₃·h⁻¹.

El volumen de la muestra a tratar es 0,750 L y los ensayos se realizan a temperatura ambiente (23 °C).

En los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno (peroxona) y de ozono combinado con dióxido de titanio, las dosis de H₂O₂ y TiO₂ aplicadas son de 0,04 mM (1,365 mgH₂O₂·L⁻¹) y 1 g·L⁻¹, respectivamente.

El reactor utilizado para los distintos tratamientos es un reactor de vidrio de Pyrex con forma cilíndrica y una capacidad de 1L. Cada reactivo se adiciona directamente al reactor de vidrio instantes antes de comenzar la dosificación de ozono. Para evitar que el TiO₂ se deposite en el fondo del reactor a lo largo del experimento, se introduce un imán magnético en el reactor.

Cada experimento realizado corresponde con un tiempo de muestreo hasta un máximo de 15 minutos con el fin minimizar el error que se produce al tomar volúmenes de muestra. De cada experimento se toman muestras con el fin de evaluar la efectividad de los tratamientos sobre la población bacteriana a tratar. El ozono residual en las muestras tomadas se neutraliza con tiosulfato sódico 1N para evitar que estas dosis residuales sigan ejerciendo su efecto bactericida sobre las poblaciones supervivientes. Del mismo modo en los tratamientos en los que interviene el peróxido de hidrogeno se utiliza catalasa³ con una concentración de 0,1g·L⁻¹ para descomponerlo.

Cada tratamiento consta de 7 ensayos, cada ensayo corresponde a un tiempo y se realizan por duplicado.

En la Tabla 3 se muestran los experimentos realizados así como las condiciones de operación.

³ Catalasa: Enzima oxidante que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno atómico.

Tabla 3. Condiciones de operación de los tratamientos estudiados.

	Desinfección convencional	POAs basados en O ₃		
Tratamientos	Ozonización	O ₃ /H ₂ O ₂	O ₃ /TiO ₂	O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂
Numero de experimentos	14	14	14	14
Intervalos de tiempo	0,4-1-5-8-11-15	0,4-1-5-8-11-15	0,4-1-5-8-11-15	0,4-1-5-8-11-15
Concentración de H ₂ O ₂	-	4,55·10 ⁻³ mL _{H₂O₂} ·L ⁻¹ muestra	-	4,55·10 ⁻³ mL _{H₂O₂} ·L ⁻¹ muestra
Concentración de TiO ₂	-	-	1g _{TiO₂} ·L ⁻¹ muestra	1g _{TiO₂} ·L ⁻¹ muestra

4.5. Modelos cinéticos de inactivación microbiana. Ajuste de datos experimentales e índices de error

4.5.1. Modelos cinéticos

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. Las curvas de inactivación microbiana presentan una de las formas que se presentan en la Figura 3.

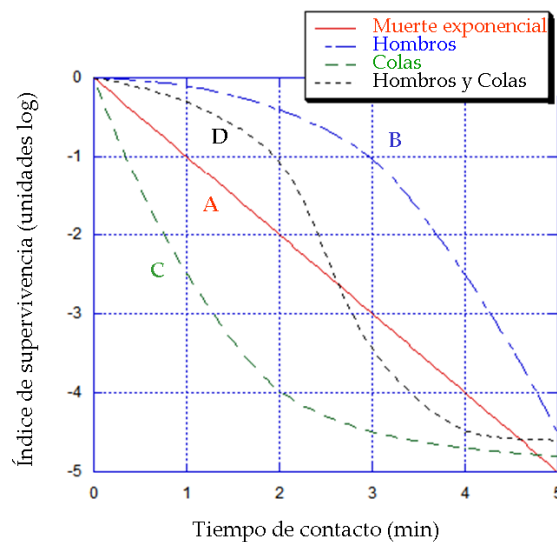


Figura 3. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: Gyürék and Finch, 1998).

Los distintos modelos de inactivación bacteriana son modelos matemáticos primarios que estudian la mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso de desinfección. Se utiliza la modelización cinética con la finalidad de simplificar e idealizar fenómenos complejos (Lee y Nam, 2002), obteniéndose expresiones matemáticas que faciliten el diseño de un sistema de desinfección.

La Tabla 4 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. La selección de estos modelos se realiza en base al principio de parsimonia según el cual los modelos han de ser tan simples como sea posible, es decir, con el menor número de parámetros posible (Gómez, 2005). 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. En el ANEXO VII se desarrollan los modelos matemáticos con más detalle.

Tabla 4. Modelos cinéticos de estudio aplicados.

Modelo cinético	Ecuación integrada	Coefficientes cinéticos	Referencias
Modelo de Hom	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -K_{ap} \cdot t^m$	K_{ap}, n, m	Hom, 1972
Modelo bifásico	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} [P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1-P) e^{-k_2 \cdot t}]$	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 et al., 2002
Modelo de Geeraerd	$N_t = (N_0 - N_{res}) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot SI}}{1 + (e^{k_{max} \cdot SI} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}} \right) + N_{res}$	K_{max}, SI	Geeraerd et al., 2000

4.5.2. 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 los mínimos cuadrados (Pernistky et al., 1995; Cho et al., 2003). En la actualidad, muchos programas informáticos estadísticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utiliza la herramienta Solver y la herramienta de GInaFiT del programa Microsoft Excel (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool).

Para evaluar la calidad de los ajustes de los modelos a los datos experimentales obtenidos se utilizan dos índices: el coeficiente de determinación (R^2) expresado en la [Ecuación 4] y el error cuadrático medio (ECM) determinado en la [Ecuación 5]. También se utiliza con este propósito la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente que se encuentra en el ANEXO IX.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad [4]$$

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y)^2}{n}} \quad [5]$$

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 será mayor cuanto más próximos estén los puntos a dicha línea (Gómez, 2005).

4.6. Tratamiento de los datos

Los experimentos que se realizan en este trabajo de investigación se llevan a cabo por duplicado. Se debe tener en cuenta que se trabaja con técnicas de desinfección basadas en ozono y por tanto, dependen de la concentración de ozono consumida por la muestra, no han podido contar con réplicas.

Se seleccionan las placas que albergan un intervalo de colonias entre 20 y 200 en el método de siembra en superficie, mientras que en el método de filtración por membrana se selección las placas que poseen un intervalo de colonias entre 30 y 300 (Clesceri et al., 2005). Por debajo de ese límite inferior, el error es elevado y hay peligro de dar resultados ajenos a la realidad. Por encima del límite superior, las colonias presentan problemas de fusión.

Los resultados de inactivación bacteriana que se obtienen en los diferentes ensayos se expresan a partir de la media [Ecuación 6]. En las gráficas con barras de error se representa la media de los diferentes ensayos más menos su desviación estándar [Ecuación 7].

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{N_r} X_i}{N_r} \quad [6]$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_r} (X_i - \bar{X})^2}{N_r - 1}} \quad [7]$$

Capítulo 5. Resultados

5.1. Resultados inactivación *P.aeruginosa*

5.1.1. Ozonización

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *P.aeruginosa* antes y después del tratamiento de ozonización.

Tabla 5. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra de agua fortificada con *P.aeruginosa*.

	Condiciones Físico-Químicas			
	pH	Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)(20°C)	Turbidez (U.N.T)	S.S.T ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Iniciales	7,83	544	5,49	9
Finales	8,38	699	32,5	22

Se observan como el pH varía ligeramente respecto al valor inicial, mientras que los valores finales de conductividad, turbidez y sólidos en suspensión aumentan ligeramente respecto a los valores iniciales.

En la Tabla 6 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *P.aeruginosa* y el O_3 consumido, expresado en $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para cada tiempo de muestreo. Esta cantidad de ozono consumido por la muestra se calcula por la diferencia entre el ozono introducido y el ozono en exceso, tal y como se detalla en el ANEXO IX.

Las reducciones logarítmicas describen el nivel de rendimiento que un tratamiento deberá lograr para cumplir los requisitos exigidos para ese tratamiento. Una reducción de 1 unidad logarítmica equivale al 90%, 2 unidades logarítmicas al 99% y así sucesivamente. Es decir, una reducción de 4 unidades logarítmicas, o 99,99%, es mucho mayor que una reducción de 1 unidad logarítmica.

Se observa una caída inicial brusca de las poblaciones, seguida de un periodo de inactivación más lento que finaliza con una reducción bacteriana de aproximadamente 6,5 unidades logarítmicas.

Tabla 6. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
Log(N_t/N₀)	0	-2,16	-2,68	-4,04	-5,51	-5,93	-6,41
mg O₃·L⁻¹ consumido	0	1,13	4,87	14,31	27,48	69,89	104,57

La Figura 4 muestra los resultados gráficos del tratamiento de ozonización en el que se representa la inactivación de *P.aeruginosa* en función del ozono ($\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos realizados. La mayor desviación obtenida en este tratamiento corresponde a un valor de $\pm 0,57$ unidades.

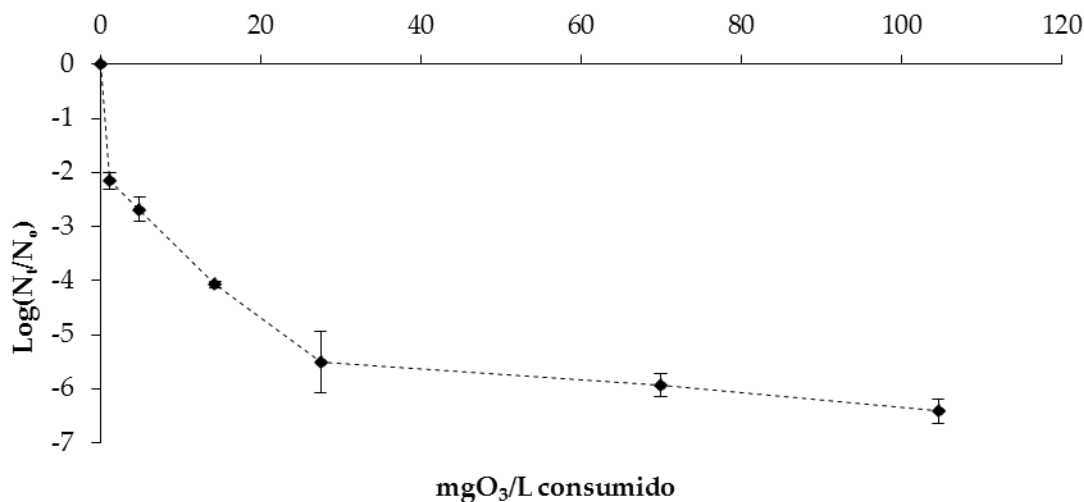


Figura 4. Inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización. $N_0 \approx 7,2 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100\text{mL}^{-1}$.

Para alcanzar 4 unidades logarítmicas de inactivación (o una reducción del 99,99%) la dosis de ozono necesaria es de $13,7 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos recomienda una reducción de 1 logaritmo para el control de la bacterias (USEPA, 2004), sin embargo, la elección de tomar como referencia 4 unidades logarítmicas de inactivación está relacionada con ciertos resultados de la investigación desarrollada dentro del grupo de investigación (Lanao, 2012).

El ozono en las muestras, además de reaccionar con las bacterias, oxida los sólidos en suspensión y los compuestos orgánicos e inorgánicos que el agua normalmente contiene. La materia orgánica que se encuentra en el medio reduce las cinéticas de inactivación de *P.aeruginosa* al competir con las bacterias sobre las especies oxidantes generadas durante el tratamiento de desinfección (Ireland, 1993). La formación de agregados de microorganismos entre sí y con el material particulado puede afectar a la eficiencia del tratamiento fortaleciéndose frente al ataque del desinfectante (Lanao, 2012).

Si se establece como referencia una dosis de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ozono, dosis utilizada habitualmente en ETAPs en España (Mosteo et al., 2009), la eliminación logarítmica alcanzada de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización es de 2,4 unidades logarítmicas, valor inferior al establecido como necesario para inactivar *P.aeruginosa*.

Si se considera una desinfección total de la muestra tras los 15 minutos de tratamiento, la ozonización consigue recuentos bacterianos finales bajos debidos principalmente a la presencia de materia orgánica (Lanao, 2012).

La Figura 5 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozonización llevados a cabo por el grupo de investigación para la

inactivación de *Enterococcus sp.*, *C. perfringens* y *E.coli* con los obtenidos en este Trabajo Fin de Grado para *P.aeruginosa*.

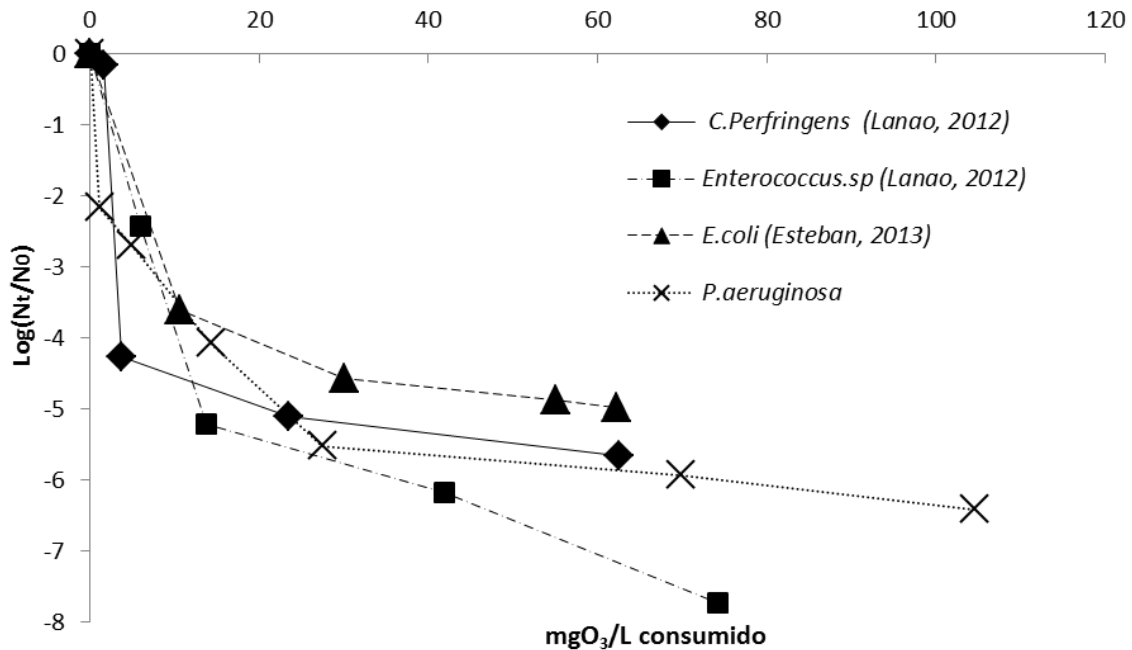


Figura 5. Comparativa en la inactivación de *Enterococcus sp.* ($N_0 \approx 3,2 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹), *C. perfringens* ($N_0 \approx 2,7 \cdot 10^6$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹) y *E.coli* ($N_0 \approx 3,5 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹) con la obtenida para *P.aeruginosa* ($N_0 \approx 7,2 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹) en los tratamientos de ozonización.

La comparación de los resultados obtenidos en este tratamiento con los obtenidos por el grupo de investigación, Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza, para la eliminación de *Enterococcus sp.*, células vegetativas de *C. perfringens* y *E.coli* indican que para un nivel de inactivación de 4 órdenes de magnitud, la dosis de ozono necesaria para la eliminación de *P.aeruginosa* es superior respecto a la dosis requerida para la eliminación de *Enterococcus sp.* y células vegetativas de *C. perfringens*, sin embargo es inferior a la requerida para *E.coli*. Las dosis requeridas para este nivel de inactivación son aproximadamente 13,7 mg·L⁻¹ de ozono, 18,4 mg·L⁻¹ de ozono, 10,4 mg·L⁻¹ de ozono y 3,6 mg·L⁻¹ de ozono para *P.aeruginosa*, *E.coli*, *Enterococcus sp.* y células vegetativas de *C. perfringens* respectivamente. Si se comparan con la dosis de referencia de 3 mg·L⁻¹ de ozono, se observa que se produce una desinfección menor en el tratamiento con la *P.aeruginosa* respecto a células vegetativas de *C. perfringens*, pero superior respecto a *E.coli* y *Enterococcus sp.* Esta conclusión se sostiene con los reducciones logarítmicas obtenidas para *P.aeruginosa*, *E.coli*, *Enterococcus sp.* y células vegetativas de *C. perfringens* que son 2,4 unidades logarítmicas, 1 unidad logarítmica, 1,2 unidades logarítmicas y 2,8 unidades logarítmicas respectivamente.

Se debe tener en cuenta que tanto *Enterococcus sp.* como las células vegetativas de *C. perfringens* son bacterias gram-positivas, y poseen mayor resistencia a los tratamientos desinfectantes. La capa de peptidoglucano que poseen estas bacterias presenta condiciones de mayor resistencia que en bacterias gram-negativas motivo por el cual no resulta más fácil de romper. Las bacterias *P.aeruginosa* y *E.coli* son bacterias gram-negativas y poseen una capa de peptidoglucano más débil. *E.coli*, *Enterococcus sp.* y células vegetativas de *C. perfringens* son anaerobios, además *E.coli*, *Enterococcus sp.* son

anaerobios facultativos (pueden utilizar oxígeno diatómico si lo hay). Y *P.aeruginosa* es aerobia por lo que pueden vivir y desarrollarse en presencia de oxígeno diatómico.

Se puede afirmar por tanto que la resistencia de *P.aeruginosa* para una misma dosis de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ozono, es inferior respecto a células vegetativas de *C. perfringens*. Mientras que para lograr un mismo nivel de inactivación de 4 unidades logarítmicas para la eliminación de *P.aeruginosa* se requiere una dosis de ozono mayor a la requerido tanto por *Enterococcus* sp. como por células vegetativas de *C. perfringens*. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las condiciones en que tienen lugar dichos tratamientos no son las mismas, tanto el volumen tratado, como el caudal de oxígeno y la dosis de ozono generada son distintos. La Tabla 7 resume las condiciones en que tienen lugar los distintos tratamientos.

Tabla 7. Resumen de las condiciones en los tratamientos para la eliminación de *P.aeruginosa*, *Enterococcus* sp., células vegetativas de *C. perfringens* y *E.coli*.

Condiciones	Microorganismo			
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	Células vegetativas de <i>C. perfringens</i>	<i>E.coli</i>
Volumen de muestra (L)	0,75	1,5	1,5	0,75
Caudal de O ₂ (L·h ⁻¹)	50	100	100	50
Potencia de ozonización	1,5	1,5	1,5	1,5
Presión de oxígeno	1	0,5	0,5	1
Dosis de O ₃ generado (mgO ₃ ·h ⁻¹)	897,88	578	578	846

5.1.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂)

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *P.aeruginosa* antes y después del tratamiento con peroxona.

Tabla 8. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con *P.aeruginosa*.

	Condiciones Físico-Químicas			
	pH	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)	Turbidez (U.N.T)	S.S.T (mg·L ⁻¹)
Iniciales	8,19	656	148	62
Finales	8,66	754	15	10

Se observan que, igual que el tratamiento de ozonización, el pH varía ligeramente respecto al valor inicial, de mientras que los valores finales de conductividad, turbidez y sólidos en suspensión aumentan significativamente respecto a los valores iniciales.

En la Tabla 9 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *P.aeruginosa* y el O_3 consumido, expresado en $mgO_3 \cdot L^{-1}$ para cada tiempo de muestreo. Se observa que al finalizar el tratamiento no se consigue una inactivación total de la población inicial.

Tabla 9. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
Log(N_t/N_0)	0	-2,43	-2,90	-4,43	-6,37	-6,73	-7,33
mg $O_3 \cdot L^{-1}$ consumido	0	1,5	5,25	12,05	30,85	56,40	71,46

La Figura 6 muestra los resultados gráficos del tratamiento de O_3 combinado con H_2O_2 en el que se representa la inactivación de *P.aeruginosa* en función del ozono ($mgO_3 \cdot L^{-1}$) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos realizados. Se observa que las mayores desviaciones de los datos obtenidos en este tratamiento se encuentran entorno a $\pm 0,50$ unidades. Se obtiene por tanto, una desviación mayor que en el caso del ozono, sin embargo, las mayores desviaciones corresponden a los últimos datos, no así en el caso del ozono, que la desviación es más o menos constante en los diferentes ensayos.

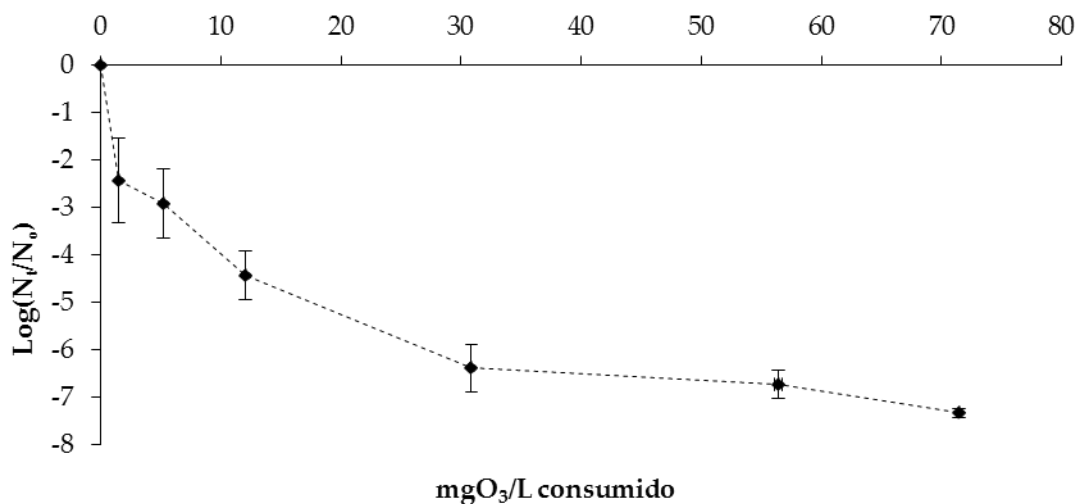


Figura 6. Inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con *P.aeruginosa*. $N_0 = 2,37 \cdot 10^9$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹. $[H_2O_2] = 0,04$ mM.

Se observa que la inactivación es mayor que en el caso de la ozonización. Se produce una continuada reducción logarítmica hasta llegar a una desinfección cercana a las 8 unidades logarítmicas.

El orden de inactivación fijado en el apartado 5.1 de 4 unidades logarítmicas de inactivación se alcanza cuando la dosis de ozono es de 10,1 mg O_3 L⁻¹. Esta dosis es

inferior a la necesaria para alcanzar la misma desinfección en el tratamiento de ozonización. Por lo tanto se pone de manifiesto el efecto positivo de la combinación de ozono y peróxido en la desinfección.

Si se toma como referencia una dosis de 3 mg O₃ · L⁻¹ la inactivación es de 2,6 unidades logarítmicas, es decir, se consigue una desinfección mayor para esta dosis respecto al tratamiento de ozonización. La desinfección final obtenida en este tratamiento, es muy superior en una unidad logarítmica al tratamiento basado en ozono. Por lo tanto se pone de manifiesto el efecto positivo de la combinación de ozono y peróxido en la desinfección.

La Figura 7 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno llevados a cabo por el grupo de investigación para la inactivación de *Enterococcus* sp., células vegetativas de *C. perfringens* y *E.coli* con los obtenidos en este Trabajo Fin de Grado para *P.aeruginosa*.

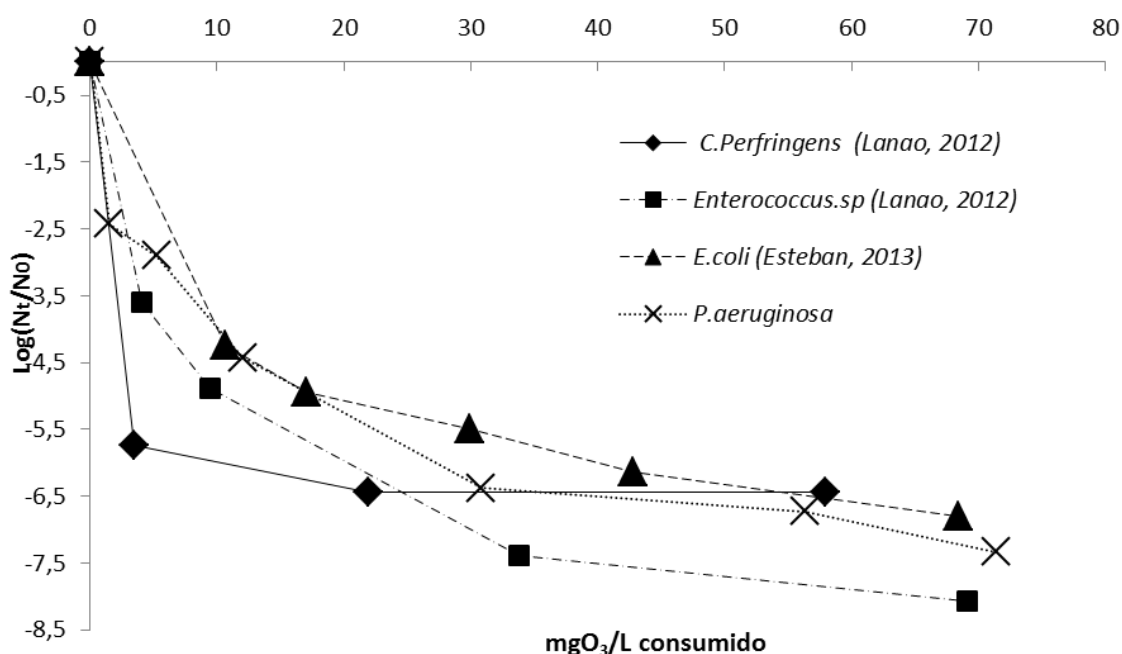


Figura 7. Comparativa en la inactivación de *Enterococcus* sp. (N₀ ≈ 4,7·10⁸ UFC· 100 mL⁻¹), *C. perfringens* (N₀ ≈ 9,8·10⁵ UFC· 100 mL⁻¹) y *E.coli* (N₀ ≈ 4,35·10⁸ UFC· 100 mL⁻¹) con la obtenida para *P.aeruginosa* (N₀ ≈ 2,37·10⁹ UFC· 100 mL⁻¹) en los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno.

La comparación de los resultados obtenidos en este tratamiento con los obtenidos por el grupo de investigación, Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza, para la eliminación de *Enterococcus* sp., células vegetativas de *C. perfringens* y *E.coli* indican que para un orden de inactivación fijado de 4 unidades logarítmicas para *P.aeruginosa* se alcanza cuando la dosis de ozono es el doble de la requerida para la inactivación de *Enterococcus* sp. , 4 veces mayor de la requerida para la inactivación de *C. perfringens*, y la misma que la requerida para la inactivación de *E.coli*. Si se comparan con la dosis de referencia de 3 mg·L⁻¹ de ozono, se observa que se produce una desinfección del mismo orden de magnitud en el tratamiento con la *P.aeruginosa* respecto a *Enterococcus* sp., una desinfección menor respecto a células vegetativas de *C. perfringens* y

una desinfección mayor respecto a *E.coli* ya que los resultados obtenidos de inactivación son para *P.aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *C. perfringens* y *E.coli* de 2,6 unidades logarítmicas, 2,6 unidades logarítmicas, 4,8 unidades logarítmicas y 1,2 unidad logarítmica respectivamente. Se debe tener en cuenta, tal y como se afirma en el apartado 5.1.1, que las condiciones en las que tienen lugar dichos tratamientos son diferentes, excepto para la desinfección de *E.coli* cuyas condiciones son las mismas.

5.1.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O₃/TiO₂)

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *P.aeruginosa* antes y después del tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

Tabla 10. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ sobre el agua fortificada con *P.aeruginosa*.

	Condiciones Físico-Químicas			
	pH	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)	Turbidez (U.N.T)	S.S.T (mg·L ⁻¹)
Iniciales	7,85	386	107	73
Finales	8,67	741	40,2	20

Se observa que el pH, la turbidez y los sólidos en suspensión varían del mismo modo que en los tratamientos anteriores. El pH aumenta ligeramente su valor final respecto del inicial, mientras que la turbidez y los sólidos en suspensión varían significativamente sus valores finales. Sin embargo se produce una disminución de la conductividad, hecho que en los tratamientos de ozonización y ozono combinado con peróxido de hidrógeno no se da.

En la Tabla 11 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *P.aeruginosa* y el O₃ consumido, expresado en mgO₃·L⁻¹ para cada experimento que corresponde con un tiempo. Se observa que al finalizar el tratamiento no se consigue una inactivación total de la población inicial.

Tabla 11. Condiciones del tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo. [TiO₂]= 1 g L⁻¹.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
Log(N_t/N₀)	0	-0,27	-1,78	-3,62	-4,80	-5,27	-6,49
mg O₃·L⁻¹ consumido	0	1,13	5,25	15,05	28,60	59,39	81,21

La Figura 8 muestra los resultados gráficos del tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ en el que se representa la inactivación de *P.aeruginosa* en función del ozono (mgO₃·L⁻¹) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en

los experimentos realizados. Se puede observar que las mayores desviaciones de los datos obtenidos en este tratamiento se encuentran entorno a $\pm 0,90$ unidades. Se obtiene por tanto, una desviación mucho mayor que en los tratamientos con ozono y ozono combinado con peróxido de hidrógeno.

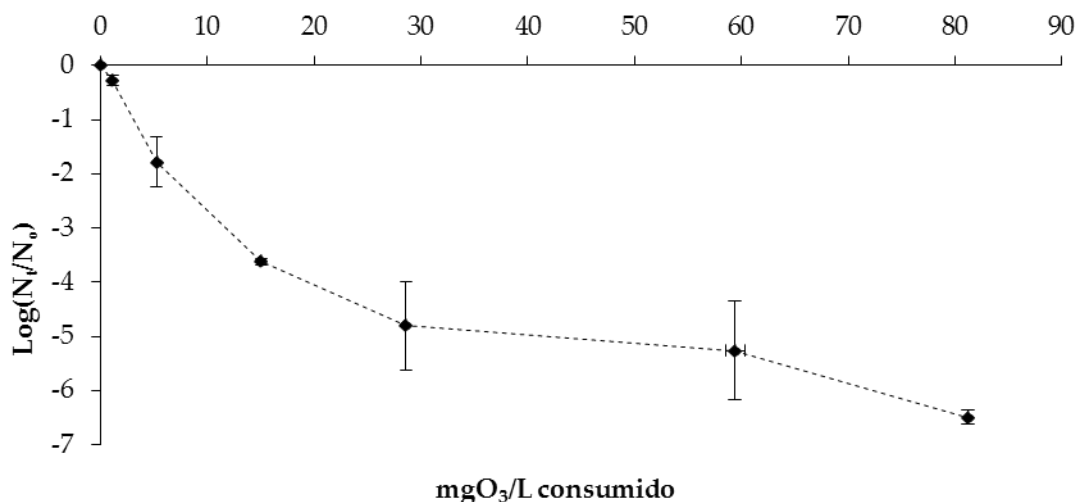


Figura 8. Inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con TiO₂ sobre la muestra agua fortificada. N₀ = 2,1·10⁹ UFC· 100 mL⁻¹. [TiO₂]= 1 g·L⁻¹.

Para alcanzar un nivel de inactivación de 4 unidades logarítmicas, la dosis de ozono necesaria es 19,4 mg·L⁻¹, dosis superior a la necesaria en los tratamientos de ozonización y ozono combinado con peróxido de hidrógeno. Si se compara la inactivación para una dosis de 3 mgO₃·L⁻¹ con la obtenida en los otros tratamientos se obtiene una desinfección de 1 unidad logarítmica mientras que en los anteriores tratamientos se obtienen desinfecciones próximas a las 3 unidades logarítmicas.

La comparación de los resultados obtenidos en este tratamiento con los obtenidos por el grupo de investigación, se observa que el orden de inactivación fijado de 4 unidades logarítmicas para la *P.aeruginosa* se alcanza cuando la dosis de ozono es superior a la requerida para la inactivación de *Enterococcus* sp., *C. perfringens* y *E.coli*, siendo las dosis de ozono de 19,4 mgO₃·L⁻¹, 6,5 mgO₃·L⁻¹, 4,15 mgO₃·L⁻¹ y 4 mgO₃·L⁻¹ para la *P.aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *C. perfringens* y *E.coli* respectivamente. Sin embargo al comparar la inactivación para una dosis de referencia de 3 mgO₃·L⁻¹, se obtiene una inactivación menor para la *P.aeruginosa* respecto a los *Enterococcus* sp., *C. perfringens* y *E.coli* siendo sus valores de inactivación de 1 unidad logarítmica, 2,7 unidades logarítmicas, 3,1 unidades logarítmicas y 3 unidades logarítmicas respectivamente.

La Figura 9 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozono combinado con dióxido de titanio llevados a cabo por el grupo de investigación para la inactivación de *Enterococcus* sp., *C. perfringens* y *E.coli* con los obtenidos en este Trabajo Fin de Grado para *P.aeruginosa*.

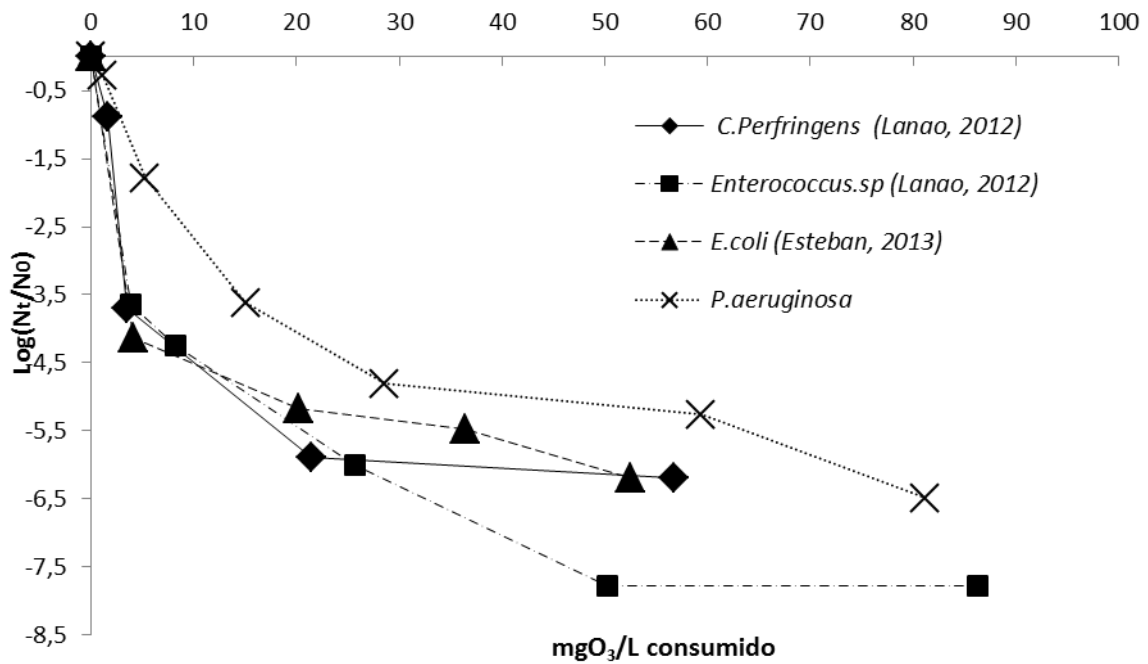


Figura 9. Comparativa en la inactivación de *Enterococcus sp.* ($N_0 \approx 6,2 \cdot 10^7$ UFC \cdot 100 mL⁻¹), *C. perfringens* ($N_0 \approx 1,6 \cdot 10^6$ UFC \cdot 100 mL⁻¹) y *E.coli* ($N_0 \approx 4,14 \cdot 10^8$ UFC \cdot 100 mL⁻¹) con la obtenida para *P.aeruginosa* ($N_0 \approx 2,1 \cdot 10^9$ UFC \cdot 100 mL⁻¹) en los tratamientos de ozono combinado con dióxido de titanio.

5.1.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio (O₃/H₂O₂/TiO₂)

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *P.aeruginosa* antes y después del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

Tabla 12. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂ sobre la muestra agua fortificada con *P.aeruginosa*. [H₂O₂]=0,04mM. [TiO₂]=1 g \cdot L⁻¹.

	Condiciones Físico-Químicas			
	pH	Conductividad (μ S \cdot cm ⁻¹)(20°C)	Turbidez (U.N.T)	S.S.T (mg \cdot L ⁻¹)
Iniciales	7,83	766	76	71
Finales	8,38	842	63	53

Se observa que el pH, la conductividad, la turbidez y los sólidos en suspensión varían del mismo modo que en los tratamientos de ozonización y ozono combinado con peróxido de hidrógeno. El pH aumenta ligeramente su valor final respecto del inicial, mientras que la conductividad, turbidez y los sólidos en suspensión varían significativamente sus valores finales.

La presencia de peróxido de hidrógeno tras este tratamiento es prácticamente nula ya que se neutraliza, de igual forma que en el apartado 5.1.2, con catalasa.

En la Tabla 13 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *P.aeruginosa* y el O₃ consumido, expresado en mgO₃·L⁻¹ para cada tiempo de muestreo. Se observa que al finalizar el tratamiento no se consigue una inactivación total de la población inicial.

Tabla 13. Condiciones del tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ y H₂O₂ sobre la muestra agua fortificada con *P.aeruginosa*. [H₂O₂]=0,04mM. [TiO₂]=1 g·L⁻¹.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
Log(N _t /N ₀)	0	-1,15	-3,66	-4,95	-5,84	-6,73	-6,86
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	1,51	6,32	16,08	34,93	56,78	76,67

La Figura 10 muestra los resultados gráficos del tratamiento de O₃ combinado con H₂O₂ y TiO₂ en el que se representa la inactivación de *P.aeruginosa* en función del ozono (mgO₃·L⁻¹) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos realizados. Se puede observar que las mayores desviaciones de los datos obtenidos en este tratamiento se encuentran entorno a ± 0,95 unidades. Se obtiene por tanto, en este tratamiento, la mayor desviación por lo que se puede afirmar que este ensayo posee un error mayor.

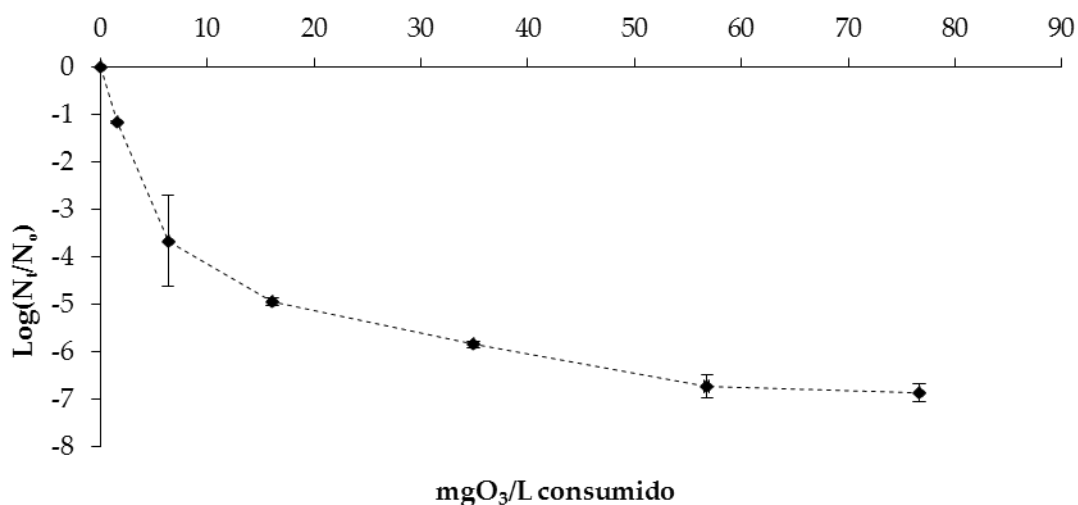


Figura 10. Inactivación de *P.aeruginosa*. en el tratamiento O₃/H₂O₂/TiO₂ sobre la muestra de agua fortificada. N₀= 1,72·10⁹ UFC·100mL⁻¹. [H₂O₂]=0,04mM. [TiO₂]=1 g·L⁻¹.

Se observa que para una inactivación de referencia de 4 unidades logarítmicas la dosis de ozono necesaria es 8,8 mgO₃·L⁻¹. Esta dosis de ozono es inferior a la que se obtiene para la misma inactivación en los tratamientos de ozonización, ozono combinado con peróxido de hidrógeno y ozono combinado con dióxido de titanio. Si se toma como referencia una dosis de ozono de 3 mgO₃·L⁻¹ la inactivación que se obtiene es de 1,9 unidades logarítmicas. Esta inactivación es inferior a la que se obtiene en el tratamiento de ozonización y ozono combinado con peróxido de hidrógeno, pero superior a la que se obtiene en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

Esta combinación supone una mejora sobre el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio tanto desde el punto de vista de inactivación como desde el punto de vista de dosis de ozono, pero no supone una mejora sobre el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno. Además, se debe destacar que los resultados de inactivación final que se obtienen en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno son más altos que en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

Si comparamos la dosis de ozono necesaria en este tratamiento para una inactivación de 4 unidades logarítmicas respecto al tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno se obtiene conclusiones semejantes a las obtenidas por Dña. Munia Lanao ya que en ambos casos la dosis de ozono requerida es superior en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. Además, no existe mejora en este tratamiento respecto al tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno ya que para una dosis de $3 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ es superior la inactivación lograda el tratamiento de combinación $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ que en el tratamiento de combinación de $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$, siendo las inactivaciones obtenidas de 1,9 unidades logarítmicas y 2,6 unidades logarítmicas para la combinación de $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ y la combinación de $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ respectivamente.

La Figura 11 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozonización, ozono combinado con peróxido de hidrógeno, ozono combinado con dióxido de titanio y combinación de ozono con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno.

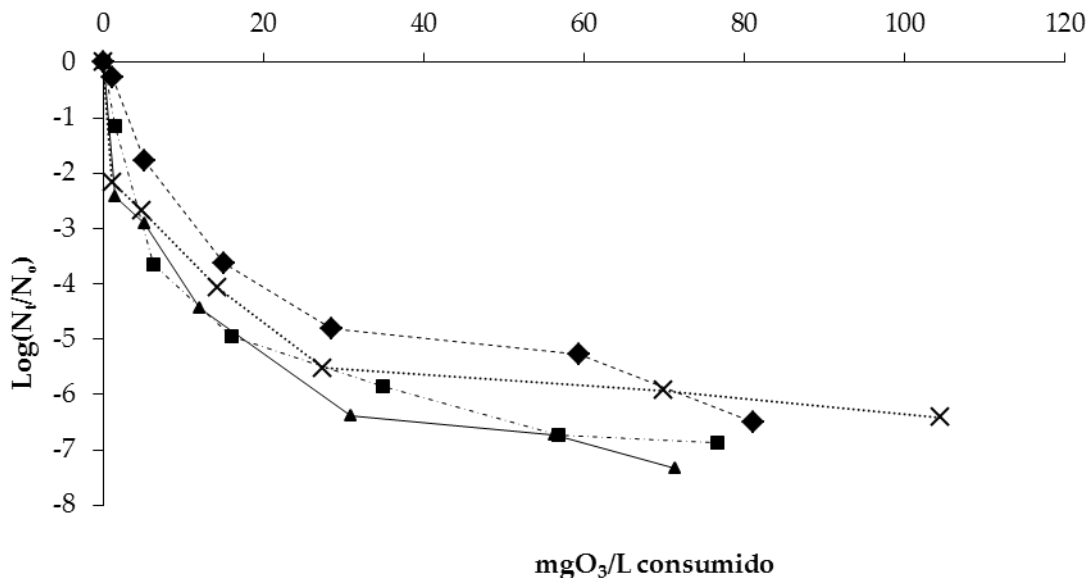


Figura 11. Inactivación de *P.aeruginosa* tras los tratamiento con O_3 (×), $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (▲), O_3/TiO_2 (◆), $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2/\text{O}_3$ (■). $N_0 \approx 10^9 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,04 \text{ mM}$. $[\text{TiO}_2]=1 \text{ g L}^{-1}$.

La Figura 12 muestra los una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozono y ozono combinado con peróxido de hidrógeno para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de $3 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$.

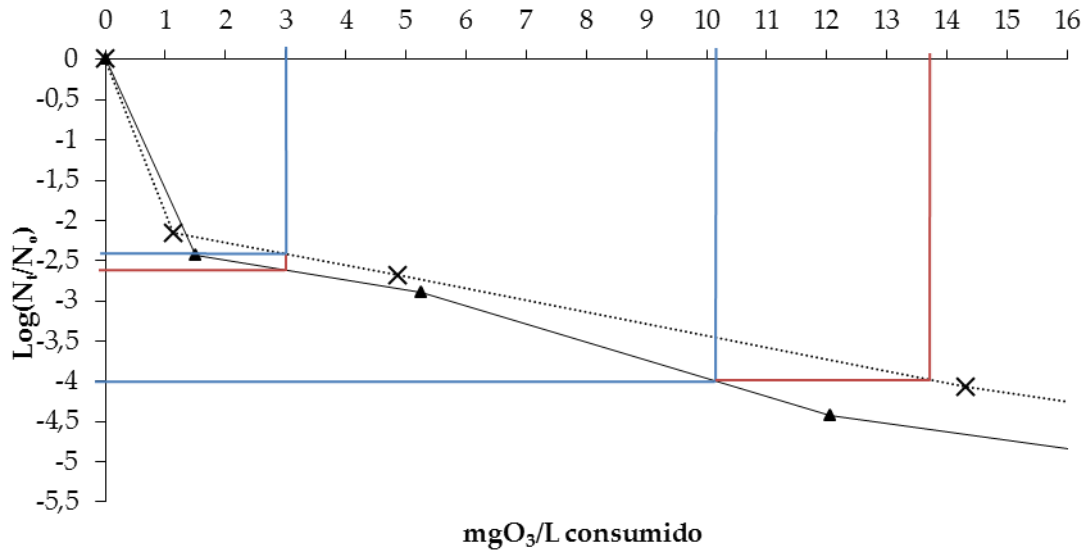


Figura 12. Inactivación de *P.aeruginosa* tras los tratamiento con O₃ (×), O₃/H₂O₂ (▲).

$N_0 \approx 10^9$ UFC·100 mL⁻¹. [H₂O₂]=0,04 mM.

La Figura 13 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozono combinado con dióxido de titanio y ozono combinado con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de 3 mgO₃·L⁻¹.

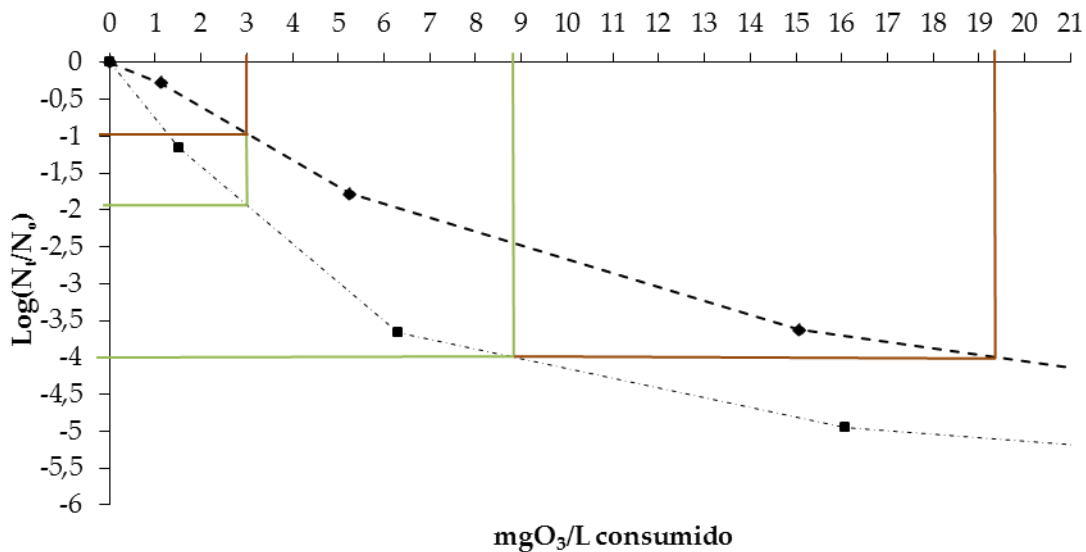


Figura 13. Inactivación de *P.aeruginosa* tras los tratamiento con O₃/TiO₂ (◆), H₂O₂/TiO₂/O₃ (■).

$N_0 \approx 10^9$ UFC· 100 mL⁻¹. [H₂O₂]=0,04 mM. [TiO₂]=1 g L⁻¹.

Mediante la comparación de los resultados obtenidos en este tratamiento con los obtenidos por el grupo de investigación se llega a la conclusión que el orden de inactivación fijado de 4 unidades logarítmicas para la *P.aeruginosa* se alcanza cuando la dosis de ozono es menor que requerida para la inactivación de *Enterococcus* sp. y *E.coli*,

siendo dichas dosis de $8,8 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, $15 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ y $10,1 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para *P.aeruginosa*, *E.coli* y *Enterococcus* sp. respectivamente. Si se compara la inactivación para una dosis de referencia de $3 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, se obtiene una inactivación menor para *P.aeruginosa* respecto a *Enterococcus* sp. y *E.coli*, siendo sus valores de activación de 1,8 para *P.aeruginosa* y 2,2 unidades logarítmicas tanto para *E.coli* como para *Enterococcus* sp.

La Figura 14 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozono combinado con dióxido de titanio llevados a cabo por el grupo de investigación para la inactivación de *Enterococcus* sp., *C. perfringens* y *E.coli* con los obtenidos en este Trabajo Fin de Grado para *P.aeruginosa*.

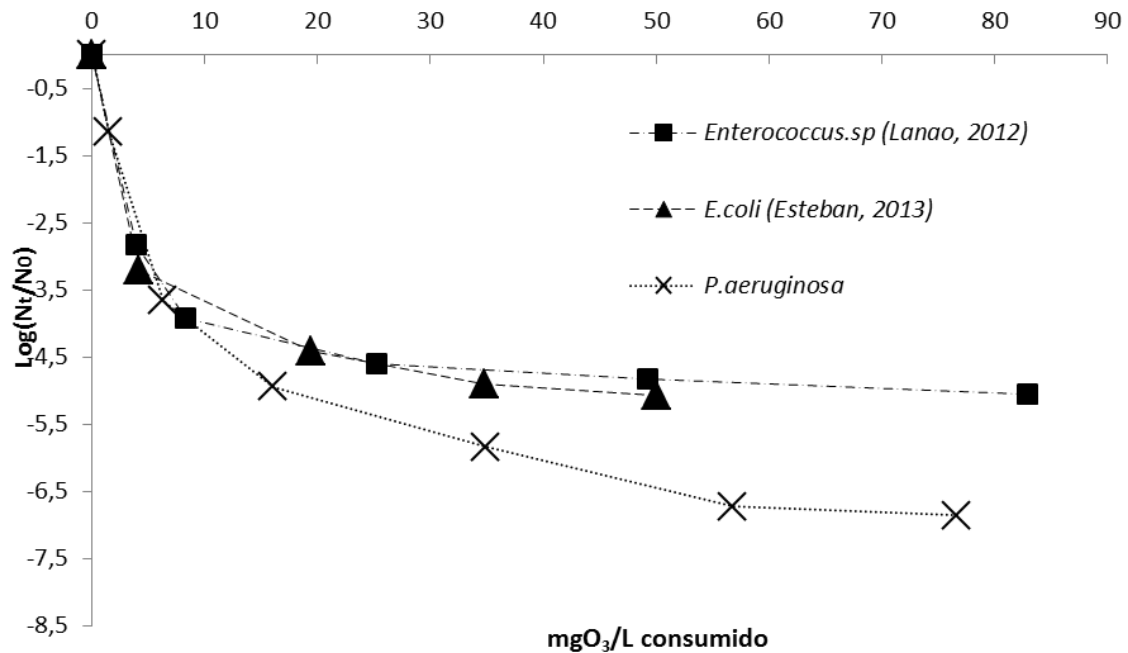


Figura 14. Comparativa en la inactivación de *Enterococcus* sp. ($N_0 \approx 7,5 \cdot 10^7 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) y *E.coli* ($N_0 \approx 4,35 \cdot 10^8 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) con la obtenida para *P.aeruginosa* ($N_0 \approx 1,72 \cdot 10^9 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) en los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

En la Tabla 14 se muestran un resumen de los resultados, utilizando como indicadores de la desinfección 4 unidades logarítmicas de inactivación y $3 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Además se incluyen los resultados obtenidos en estudios previos para *Enterococcus* sp., células vegetativas de *C. perfringens* y *E.coli* (Lanao, 2012; Esteban, 2013).

Tabla 14. Resumen de los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección estudiados para *P.aeruginosa* en comparación con *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*.

Tratamiento	Microorganismo	Dosis de Ozono necesario para la inactivación de 4 unidades logarítmicas ($\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	Inactivación para una dosis de $3 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ (unidades logarítmicas)
Ozonización	<i>P.aeruginosa</i>	13,7	2,4
	<i>E.coli</i>	18,4	1
	<i>Enterococcus sp.</i>	10,4	1,2
	<i>C. perfringens</i>	3,6	2,8
$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$	<i>P.aeruginosa</i>	10,1	2,6
	<i>E.coli</i>	10	1,2
	<i>Enterococcus sp.</i>	5,9	2,6
	<i>C. perfringens</i>	2,5	4,8
O_3/TiO_2	<i>P.aeruginosa</i>	19,4	1
	<i>E.coli</i>	3,7	3,1
	<i>Enterococcus sp.</i>	5,9	2,7
	<i>C. perfringens</i>	6,5	3
$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$	<i>P.aeruginosa</i>	8,8	1,9
	<i>E.coli</i>	14,2	2,4
	<i>Enterococcus sp.</i>	10,5	2,2

En el ANEXO IX se compara gráficamente los $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ obtenidos para una desinfección de referencia de 4 unidades logarítmicas, y la inactivación conseguida para una dosis de $3 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Se compara los resultados obtenidos para *P.aeruginosa* con los obtenidos en estudios previos en el grupo de investigación para *Enterococcus sp.*, células vegetativas de *C. perfringens* y *E.coli* (Lanao, 2012; Esteban, 2013).

5.2. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *P.aeruginosa* obtenidos durante los tratamientos de ozonización, peroxona, ozono combinado con dióxido de titanio y ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$, se analizan a través de 4 modelos matemáticos, el modelo de Hom, el modelo bifásico, el modelo de Mafart y modelo de Geereard.

5.2.1. Ozonización

Las Tablas 15, 16, 17 y 18 recogen los valores de los parámetros cinéticos obtenidos tras aplicar los modelos matemáticos seleccionados sobre las curvas de inactivación de la *P.aeruginosa* durante los tratamientos de ozonización, peroxona, ozono combinado con dióxido de titanio y ozono combinado con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno, respectivamente.

Tabla 15. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización.

Modelo de Hom					
<i>P.aeruginosa</i>	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m		ECM	R ²
	2,9	0,33		0,5029	0,99
Modelo bifásico					
<i>P.aeruginosa</i>	f	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R ²
	0,9982	12,96	0,63	0,4719	0,9796
Modelo de Mafart					
<i>P.aeruginosa</i>	p	δ (min)		ECM	R ²
	0,33	0,05		0,2730	0,99
Modelo de Geereard					
<i>P.aeruginosa</i>	SI	k_{max} (min^{-1})		ECM	R ²
	-7,40	0,80		0,1975	0,9964

Se obtienen valores de los índices de ajuste, error cuadrático medio y coeficiente de correlación bastante aceptables por las siguientes razones. En primer lugar, los valores del coeficiente de correlación (R²) son cercanos a 1. Y en segundo lugar, los resultados del error cuadráticos medio (ECM) son muy cercanos a 0 a excepción de los modelos de Hom y Bifásico.

5.2.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂)

Tabla 16. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de peroxona.

Modelo de Hom					
<i>P.aeruginosa</i>	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m	ECM	R ²	
	3,3	0,28	0,119	0,97	
Modelo bifásico					
<i>P.aeruginosa</i>	f	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	R ²
	0,999	1,55	0,28	1,055	0,92
Modelo de Mafart					
<i>P.aeruginosa</i>	p	δ (min)	ECM	R ²	
	0,51	0,54	1,018	0,90	
Modelo de Geereard					
<i>P.aeruginosa</i>	SI	k_{max} (min ⁻¹)	ECM	R ²	
	-6,32	0,97	0,3299	0,99	

Los valores de error cuadrático medio y coeficiente de correlación bastante buenos ya que los valores del coeficiente de correlación (R²) son cercanos a 1. Además los resultados del error cuadráticos medio (ECM) son muy cercanos a 0 a excepción de los modelos de Mafart y Bifásico.

5.2.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O₃/TiO₂)

Tabla 17. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de O₃/TiO₂.

Modelo de Hom					
<i>P.aeruginosa</i>	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m	ECM	R ²	
	2,8	0,29	0,146	0,9245	
Modelo bifásico					
<i>P.aeruginosa</i>	f	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	R ²
	0,9972	4,31	0,63	0,273	0,99
Modelo de Mafart					
<i>P.aeruginosa</i>	p	δ (min)	ECM	R ²	
	0,53	0,42	0,365	0,98	
Modelo de Geereard					
<i>P.aeruginosa</i>	SI	k_{max} (min ⁻¹)	ECM	R ²	
	-3,14	0,95	0,557	0,96	

Se obtienen valores de los índices de ajuste, error cuadrático medio y coeficiente de correlación bastante aceptables por las siguientes razones. En primer lugar, los valores del coeficiente de correlación (R^2) son cercanos a 1. Y en segundo lugar, los resultados del error cuadráticos medio (ECM) son muy cercanos a 0 a excepción del modelo de Geereard.

5.2.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$)

Tabla 18. Parámetros cinéticos del modelo de Hom, modelo bifásico y modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de $O_3/TiO_2/H_2O_2$.

Modelo de Hom					
<i>P.aeruginosa</i>	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m	ECM	R^2	
	3,1	0,31	0,518	0,961	
Modelo bifásico					
<i>P.aeruginosa</i>	f	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R^2
	1	8,64	0,45	0,341	0,992
Modelo de Mafart					
<i>P.aeruginosa</i>	p	δ (min)	ECM	R^2	
	0,40	0,13	0,546	0,95	
Modelo de Geereard					
<i>P.aeruginosa</i>	SI	k_{max} (min^{-1})	ECM	R^2	
	0,13	9,71	0,888	0,946	

Los valores de las constantes de velocidad de inactivación (k_{ap} en el modelo de Hom y k_1 y k_2 en el modelo bifásico) son similares en los tratamiento de ozonización peroxona y O_3/TiO_2 excepto el valor de K_1 en el bifásico del tratamiento de ozonización que muy superior. El valor del parámetro δ del modelo de Mafart es inferior en el tratamiento de ozonización por lo que alcanzan la unidad logarítmica de inactivación en menor tiempo.

A partir de los resultados del R^2 (explicado en el apartado 4.5.2) se puede afirmar que la precisión predictiva de la mayoría de los modelos es buena, ya que se obtienen valores muy cercanos a 1. Sin embargo, la precisión predictiva del modelo Mafart, excepto para el tratamiento con ozono combinado con peróxido de hidrógeno, no es buena en comparación con los otros modelos.

Se puede afirmar a partir los valores obtenidos del ECM (explicado en el apartado 4.5.2) que los resultados predichos se asemejan a los resultados reales. Sin embargo, no se puede afirmar que exista un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los valores reales en todos los modelos ya que los valores del ECM para algunos modelos son más cercanos a 1 que a 0. Los valores del ECM del modelo Mafart y Bifásico para los tratamientos con peroxona son un perfecto ejemplo.

En el ANEXO IX se muestra de manera gráfica los ajustes de los modelos aplicados sobre la curva de inactivación de *P.aeruginosa* frente a los distintos tratamientos estudiados.

Se puede afirmar que no todos los resultados observados se ajustan a los modelos cinéticos aunque si se aproximan a éstos. Los resultados del tratamiento de ozonización se ajustan bien con el modelo bifásico pero no con el modelo de Mafart. Del mismo modo, en el tratamiento con peroxona, la nube de puntos que corresponde con los resultados observados se ajusta mejor con el modelo bifásico y con el modelo Hom que con el modelo Geereard. En el tratamiento de combinación de ozono con dióxido de titanio los modelos cinéticos, a los que se les aproxima más los datos experimentales, son los modelos bifásicos y Mafart. Y Finalmente, en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno se obtiene que los resultados observados se ajustan bien a los modelos cinéticos Hom y bifásico.

5.3. Análisis de los modelos cinéticos

En la Tablas 20, 21, 22 y 23 se comparan los parámetros obtenidos en los modelos cinéticos para *P.aeruginosa* con los parámetros obtenidos en el grupo de investigación para *Enterococcus sp.*, *C. perfringens* y *E.coli* (Lanao, 2012; Esteban, 2013).

5.3.1. Ozonización

Tabla 19. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento de ozonización.

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} (min ⁻¹ ·mg L ⁻¹)	m		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	2,9	0,33		0,50	0,99
<i>E.coli</i>	3,268	0,20		0,24	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	3,001	0,26		0,69	0,94
<i>C. perfringens</i>	2,623	0,36		1,13	0,78
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	0,9982	12,96	0,63	0,4719	0,98
<i>E.coli</i>	0,99997	8,48	0,15	0,044	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,999993	3,862	0,185	0,49	0,98
<i>C. perfringens</i>	0,99997	7,990	0,226	0,77	0,91
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	0,33	0,05		0,27	0,99
<i>E.coli</i>	0,30	0,08		0,61	0,95
<i>Enterococcus sp.</i>	0,23	0,002		0,74	0,93
<i>C. perfringens</i>	0,36	0,07		1,14	0,78

Modelo de Geereard				
Microorganismo	SL	K_{max} (min^{-1})	ECM	R^2
<i>P.aeruginosa</i>	-7,40	0,80	0,19	0,99
<i>C. perfringens</i>	0,53	20,83	0,36	0,98

La constante de velocidad aparente (k_{ap}) del modelo de Hom para *P.aeruginosa* es menor respecto a la obtenida para *E.coli* y *Enterococcus sp.*, y mayor respecto a *C. perfringens*. Lo que significa que se produce una inactivación bacteriana más rápida en la *E.coli* y *Enterococcus sp.* respecto *P.aeruginosa* y más lenta en *C. perfringens* que en *P.aeruginosa*. La constante empírica del modelo de Hom (m) es menor de 1 para todos los microorganismos, por lo que las curvas tienen forma convexa.

En el modelo bifásico aplicado a los datos de inactivación de *P.aeruginosa* mediante tratamientos basados en ozono respecto al obtenido para *E.coli* y *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*, se observa que este tratamiento es más efectivo para la eliminación de *P.aeruginosa* ya que el valor de la constante k_1 tiene un valor superior para este microorganismo.

Según indica el modelo de Mafart, el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población de *P.aeruginosa*, *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*, δ , es de tan solo décimas de segundo. El parámetro p indica que la forma de las curvas es cóncava en todos los modelos ya que p es menor de la unidad.

La constante de velocidad específica de inactivación (K_{max}) en el modelo de Geereard para *P.aeruginosa* es mucho menor que la correspondiente para *C. perfringens* por lo que la velocidad de inactivación para *P.aeruginosa* es más lenta que para *C. perfringens*. El parámetro SL, es decir, el tiempo inicial durante el que la población de bacterias disminuye más lentamente, de este modelo da un valor negativo para *P.aeruginosa* a diferencia del valor para *C. perfringens*.

Los índices de error, ECM y R^2 , de los distintos modelos para estos microorganismos indican que, en conjunto, existe una buena adecuación de los modelos a los valores experimentales. Sin embargo, los modelos Hom y Mafart para *C. perfringens* se adecuan peor a los valores experimentales.

5.3.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂)

Tabla 20. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento con peroxona.

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	3,3	0,28		0,12	0,98
<i>E.coli</i>	4,24	0,20		0,06	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	4,321	0,21		0,58	0,96
<i>C. perfringens</i>	5,346	0,05		0,08	0,99
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	0,99999	1,55	0,28	1,055	0,92
<i>E.coli</i>	0,999973	10,10	0,53	0,089	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,999998	5,98	0,24	0,94	0,95
<i>C. perfringens</i>	0,999996	12,83	0,17	0,27	0,99
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	0,51	0,54		1,02	0,90
<i>E.coli</i>	0,37	0,08		0,59	0,94
<i>Enterococcus sp.</i>	0,21	0,001		0,58	0,96
<i>C. perfringens</i>	0,07	5·10 ⁻¹¹		0,10	0,99
Modelo de Geereard					
Microorganismo	SL	K_{max} (min ⁻¹)		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	-6,32	0,97		0,33	0,99

En el modelo de Hom la constante de velocidad aparente (k_{ap}) del modelo para *P.aeruginosa* es menor respecto a la obtenida para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*. Lo que significa que se produce una inactivación bacteriana más rápida en *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* respecto *P.aeruginosa*. La constante empírica del modelo de Hom (m) es menor de 1 para todos los microorganismos, por lo que las curvas tienen forma convexa.

El valor k_1 del modelo bifásico en este tratamiento, indica que este tratamiento es más efectivo para la eliminación de *E.coli* y *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*, mientras que para la eliminación de *P.aeruginosa* no es tan efectivo ya que su valor es muy inferior al obtenido para los otros microorganismos.

En el modelo de Mafart, δ , el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población de *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* es inferior

en comparación con *P.aeruginosa*. El parámetro p indica que la forma de las curvas es cóncava en todos los modelos para los distintos microorganismos ya que p es menor de la unidad.

A partir de los índices de error, ECM y R^2 , se puede afirmar que existe una buena adecuación de los modelos a los valores experimentales. Sin embargo, los índices de error en los modelos Hom y Mafart para *P.aeruginosa*, indican que no existe una buena adecuación de los modelos a los valores experimentales.

5.3.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O_3/TiO_2)

Tabla 21. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento de O_3/TiO_2 .

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m	ECM	R^2	
<i>P.aeruginosa</i>	2,8	0,29	0,15	0,92	
<i>E.coli</i>	4,10	0,17	0,13	0,99	
<i>Enterococcus sp.</i>	4,072	0,22	0,58	0,95	
<i>C. perfringens</i>	2,77	0,36	0,90	0,86	
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R^2
<i>P.aeruginosa</i>	0,9972	4,31	0,63	0,27	0,99
<i>E.coli</i>	0,999914	20,32	0,50	0,15	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,9999991	6,04	0,19	0,94	0,94
<i>C. perfringens</i>	0,999995	8,78	0,25	1,05	0,96
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)	ECM	R^2	
<i>P.aeruginosa</i>	0,53	0,42	0,36	0,98	
<i>E.coli</i>	0,17	$2,22 \cdot 10^{-4}$	0,13	0,99	
<i>Enterococcus sp.</i>	0,22	0,001	0,58	0,95	
<i>C. perfringens</i>	0,37	0,06	0,90	0,86	
Modelo de Geereard					
Microorganismo	SL	K_{max} (min^{-1})	ECM	R^2	
<i>P.aeruginosa</i>	-3,14	0,95	0,56	0,96	
<i>C. perfringens</i>	0,41	15,33	0,21	0,99	

La constante de velocidad aparente (k_{ap}) del modelo de Hom para *P.aeruginosa* es menor respecto a la obtenida para *E.coli* y *Enterococcus sp.*, y mayor respecto a *C. perfringens*. Lo que significa que se produce una inactivación bacteriana más rápida en la

E.coli y *Enterococcus sp.* respecto *P.aeruginosa* y más lenta en *C. perfringens* que en *P.aeruginosa*. La constante empírica del modelo de Hom (m) es menor de 1 para todos los microorganismos, por lo que las curvas tienen forma convexa.

En el modelo bifásico, aplicado a los datos de inactivación de *P.aeruginosa* mediante tratamientos basados en ozono combinado con dióxido de titanio respecto al obtenido para *E.coli* y *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*, se observa que este tratamiento es menos efectivo para la eliminación de *P.aeruginosa* ya que el valor de la constante k_1 tiene un valor inferior para este microorganismo.

Según indica el modelo de Mafart, el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población de *P.aeruginosa*, *E.coli*, *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*, δ , es de tan solo décimas de segundo. Sin embargo, a partir del valor de δ se puede afirmar que se requiere un tiempo mayor para reducir el primer ciclo logarítmico para *P.aeruginosa* que para el resto de microorganismos. El parámetro p indica que la forma de las curvas es cóncava en todos los modelos ya que p es menor de la unidad.

La constante de velocidad específica de inactivación (K_{max}) en el modelo de Geereard para *P.aeruginosa* es mucho menor que la correspondiente para *C. perfringens* por lo que la velocidad de inactivación para *P.aeruginosa* es más lenta que para *C. perfringens*. El parámetro SL , es decir el tiempo inicial durante el que la población de bacterias disminuye más lentamente, da un valor negativo para *P.aeruginosa* a diferencia del valor para *C. perfringens*.

Los índices de error, ECM y R^2 , de los distintos modelos para estos microorganismos indican que, en conjunto, existe una buena adecuación de los modelos a los valores experimentales.

5.3.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio (O₃/H₂O₂/TiO₂)

Tabla 22. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *P.aeruginosa* con los obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* en el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂.

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	3,1	0,31		0,552	0,96
<i>E.coli</i>	3,27	0,20		0,085	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	3,18	0,19		0,26	0,97
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	1	8,64	0,45	0,341	0,992
<i>E.coli</i>	0,999901	7,51	0,26	0,07	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,99991	5,93	0,18	0,16	0,99
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	0,40	0,13		0,546	0,95
<i>E.coli</i>	1,13	0,65		0,95	0,81
<i>Enterococcus sp.</i>	0,19	0,002		0,26	0,97
Modelo de Geereard					
Microorganismo	SL	K_{max} (min ⁻¹)		ECM	R ²
<i>P.aeruginosa</i>	0,13	9,71		0,13	0,946

La constante de velocidad aparente (k_{ap}) del modelo de Hom para *P.aeruginosa* es similar para los otros dos microorganismos, sin embargo se puede afirmar su valor es menor para *P.aeruginosa* que para *E.coli* y *Enterococcus sp.*, lo que significa que se produce una inactivación bacteriana más rápida en la *E.coli* y *Enterococcus sp.* respecto *P.aeruginosa*. La constante empírica del modelo de Hom (m) es menor de 1 para todos los microorganismos, por lo que las curvas tienen forma convexa.

En el modelo bifásico, aplicado a los datos de inactivación de *P.aeruginosa* mediante tratamientos basados en ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio respecto al obtenido para *E.coli* y *Enterococcus sp.*, se observa que este tratamiento es más efectivo para la eliminación de *P.aeruginosa* ya el valor de la constante k_1 tiene un valor superior para este microorganismo.

En el modelo de Mafart, δ , el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población de *P.aeruginosa*. es inferior en comparación con la de *E.coli* y superior en comparación con la de *Enterococcus sp.* El parámetro p indica que la

forma de las curvas es cóncava en todos los modelos para los distintos microorganismos ya que p es menor de la unidad.

A partir de los índices de error, ECM y R^2 , se puede afirmar que existe una buena adecuación de los modelos a los valores experimentales.

5.4 Estudio económico

La Tabla 23 muestra los tiempos de tratamiento calculados para inactivar un ciclo logarítmico decimal de *P.aeruginosa* y el coste asociado a cada tratamiento. En el ANEXO VIII se presenta, de forma desarrollada, el estudio económico realizado.

Tabla 23. Coste de los tratamientos estudiados para la inactivación de 1 unidad logarítmica de *P.aeruginosa*.

	Ozonización	O ₃ /H ₂ O ₂	O ₃ /TiO ₂	O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂
Tiempo inactivación 1 unidad log(min)	0,031	0,0199	0,45	0,36
Coste electricidad (€/m ³)	0,000828	0,000532	0,0120	0,00962
Coste O ₃ (€/m ³)	0,00167	0,00107	0,0242	0,0194
Coste H ₂ O ₂ (€/m ³)	-----	0,00105	-----	0,00105
Coste TiO ₂ (€/m ³)	-----	-----	1,55	1,55
Coste total(€/m ³)	0,00167	0,00212	1,5742	1,57045

De los resultados obtenidos se deduce que el tratamiento de ozonización y peroxona resultan más económicos, a pesar de que el tratamiento de peroxona tiene el coste añadido del peróxido de hidrógeno.

Capítulo 6. Conclusiones

A partir de los resultados de inactivación de *P.aeruginosa* obtenidos en los distintos tratamientos de desinfección aplicados se concluye que:

- Se puede conseguir eliminar de las aguas *P.aeruginosa* de manera eficaz usando POAs de manera alternativa a los procesos convencionales.
- Las características físico-químicas de las muestras estudiadas tras los distintos tratamientos varían de la siguiente forma. El pH aumenta ligeramente su valor mientras que la turbidez y los sólidos en suspensión disminuyen en menor o mayor medida sus valores respecto a los iniciales, excepto en el tratamiento de ozonización. La conductividad aumenta su valor en los tratamientos estudiados.
- Si se tiene en cuenta que la carga biológica de las aguas del Canal Imperial de Aragón, antes y después de su tratamiento de potabilización puede alcanzar niveles de hasta 10^4 UFC·100 mL⁻¹ (Lanao, 2012), se puede afirmar con los resultados que se han obtenido que la inactivación bacteriana en todos los tratamientos es equivalente a una eliminación superior del 99,99%.
- La adición al ozono de H₂O₂ mejora los resultados de inactivación respecto al tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la combinación ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio supone una mejora sobre el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio tanto desde el punto de vista de inactivación como desde el punto de vista de dosis de ozono.
- Si se utiliza ozono combinado con otros elementos como desinfectante del agua, se observa que la presencia de materia orgánica disminuye la acción bactericida del ozono al competir las bacterias presentes en el agua con las especies reactivas generadas. Este fenómeno se observa dado que los valores de S.S.T y Turbidez disminuyen su valor en estos tratamientos.
- Los mejores resultados finales de inactivación de *P.aeruginosa* se obtiene con el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno. Los tratamientos de ozonización y consiguen inactivar de manera efectiva las poblaciones de *P.aeruginosa*.
- Las curvas de inactivación que presenta la bacteria objeto de este estudio responde a funciones que presentan cola y no a funciones lineales.
- En los tratamientos de ozonización y ozono combinado con peróxido de hidrógeno, la inactivación para dosis de ozono bajas es superior al obtenido en los otros dos tratamientos.
- De los resultados del estudio económico se deduce que los tratamientos de ozonización y peroxona resultan más económicos, que los tratamientos de ozono combinado con dióxido de titanio y al tratamiento de combinación de ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. En este último se puede destacar que el coste a pesar del coste asociado del peróxido de hidrógeno, resulta más rentable que el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio, siendo el dióxido de titanio el producto que eleva más el coste de estos tratamientos.

A partir de los resultados de la modelización cinética en la inactivación de *P.aeruginosa* y su comparación con los parámetros de los modelos cinéticos obtenidos en el grupo de investigación para *E.coli*, *Enterococcus sp.* y células vegetativas de *C. perfringens* se concluye que:

- Los resultados obtenidos en el laboratorio se ajustan bien a los modelos matemáticos Hom, Mafart, Bifásico y Geereard.
- Los índices de error, ECM y R^2 , de los distintos modelos para estos microorganismos indican que, en conjunto, existe una buena adecuación de los modelos a los valores experimentales obtenidos.
- Los resultados del tratamiento de ozonización se ajustan bien con el modelo bifásico pero no con el modelo de Mafart. Del mismo modo, en el tratamiento con peroxona, la nube de puntos que corresponde con los resultados observados se ajusta mejor con el modelo bifásico y con el modelo Hom que con el modelo Geereard. En el tratamiento de combinación de ozono con dióxido de titanio los modelos cinéticos, a los que se les aproxima más los datos experimentales, son los modelos bifásicos y Mafart. Y Finalmente, en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno se obtiene que los resultados observados se ajustan bien a los modelos cinéticos Hom y bifásico.
- La sensibilidad y velocidad de inactivación de *P.aeruginosa* en comparación con *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* para los tratamientos estudiados es mayor. Sin embargo es inferior en comparación con *E.coli*, ya que es, a pesar de ser gramnegativa, igual que *P.aeruginosa*, una bacteria más débil.
- Se puede afirmar que las curvas de inactivación del modelo de Hom en todos los tratamientos para los microorganismos estudiados tiene forma convexa ($m < 1$). Además, según este modelo, se produce una inactivación más rápida en *E.coli* y *Enterococcus sp.* que en *P.aeruginosa*.
- A partir de los parámetros del modelo bifásico se puede afirmar que los tratamientos de ozonización y combinación de $O_3/H_2O_2/TiO_2$ son más efectivos para la eliminación de *P.aeruginosa* mientras que los otros tratamientos estudiados son más efectivos para la eliminación de *E.coli* y *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*.
- Los parámetros obtenidos en el modelo Mafart indican que para reducir el primer ciclo logarítmico decimal se requieren décimas de segundo para los microorganismos estudiados en la ozonización. Un mayor tiempo para *P.aeruginosa* en los tratamientos de combinación de ozono con peróxido de hidrógeno y ozono con dióxido de titanio. Y un tiempo inferior para reducir el primer ciclo logarítmico para *P.aeruginosa* que para *E.coli*, pero superior en comparación con *Enterococcus sp.*
- Los parámetros del modelo de Geereard indican que la velocidad de inactivación para *P.aeruginosa* es más lenta que para *C. perfringens* en los tratamientos de ozonización y ozono combinado con dióxido de titanio.

Capítulo 7. Bibliografía

Arboleda Valencia, J. 2000. Teoría y práctica de la purificación del agua Ed McGraw-Hill, ISBN: 958-41-0015-7.

Black & Veatch Corporation. "White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants". Ed. Wiley, Nueva Jersey, 5ª edición, 2010.

Casteel M.J., Sobsey M.D., Arrowood M.J. 2000. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and other microbes in water and wastewater by electrochemically generated mixed oxidants. *Water Science and Technology*, 41 (7), 127-134.

Cho M. y Yoon J. 2006. Enhanced bactericidal effect of O₃/H₂O₂ followed by Cl₂. *Ozone: Science and Engineering*, 28, 335-340

Cho M., Chung H., Yoon J. 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone- initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 2284-2291.

Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. 2004. Linear correlation between inactivation of E.coli and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research* 38, 1069-1077.

Diao H.F., Li X.Y., Gu J.D., Shi H.C., Xie Z.M. "Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction". *Process Biochemistry* 39, 1421-1426, 2004.

Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W., Greenberg A.E., Franson M.A.H. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 Edition. APA-AWWA-WEF. ISBN 08-7553-047-8.

Esteban Finol, J. 2013. Eliminación de *Escherichia coli* en aguas naturales mediante técnicas de oxidación avanzada basadas en ozono, peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. Proyecto final de carrera. Universidad de Zaragoza.

Etron Ecology. 2001. El ozono como oxidante y desinfectante. *Tecnología del Agua*, 216, 56-64.

Glaze W.H., Kang J.W., Chapin D.H. 1987. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Science and Engineering*, 9 (4), 335-352.

Glaze, W.H. 1987. "Drinking water treatment with ozone". *Environmental Science and Technology*, 21, 224-230.

Gomes A.I., Santos J.C., Vilar V.J.P., Boaventura R.A.R. 2009. Inactivation of bacteria *E.coli* and photodegradation of humic acids using natural sunlight. *Applied Catalysis B: Environmental*, 88, 283-291.

Gómez N. 2005. Modelización de la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Gracia R., Cortés S., Sarasa J., Ormad P., Ovelleiro J.L. 1999. Tratamientos oxidativos en la potabilización del agua. La ozonización catalítica como técnica complementaria a la cloración. *Tecnología del Agua*, 188, 34-44.

Guimaraes, J.R.; Ibanez, J.; Litter, M.I.; Pizarro, R.; "Desinfección de agua. Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea". 2001. Libro colectivo CYTED. Editado por Miguel A. Blesa. ISBN: 987-43-3809-1.

Guzel-Seydim Z.B., Greene A.K., Seydim A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 37, 453-460.

Gyürék L.L. y Finch G.R. 1998. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering*, 124 (9), 783-793.

Hardalo, C. & S. C. Edberg 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.

Hoigné J. 1998. Chemistry of aqueous ozone, and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. En: *The handbook of environmental chemistry quality and treatment of drinking water*. Edición Springer.

Hoigné J. y Bader H. 1977. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Water Research*, 10, 377-386.

Hoigné J. y Bader H. 1983. Rate constant of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-II. Dissociating organic compounds. *Water Research*, 17,185-194.

Hom L.W. 1972. Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. *Journal of Sanitary Engineering Division*, 98 (1), 183-193.

Ireland J.C., Klostermann P., Rice E.W., Clark R.M. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (5), 1668-1670.

Lanao Maldonado, M. 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus sp.* en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Lee Y. y Nam S. 2002. Reflection on kinetic models to the chlorine disinfection for drinking water production. *The Journal of Microbiology*, 40 (2), 119-124.

Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed. Pearson Educación S.A, 10ª Ed. ISBN: 84-205-3679-2.

Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113.

Marín Galvín, R. 2003. Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ed Díaz de Santos, ISBN: 84-7978-590-X.la

Moriñigo M.A, Córnaux R., Muñoz M.A., Romero P., Borrego J.J. 1990. Relationships between *Salmonella* spp. and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Water Research*, 24(1), 117-120.

Mosteo R., Miguel N., Martín-Muniesa S., Ormad M.P., Ovelleiro J. L. 2009. Evaluation of trihalomethane formation potential in function of oxidation processes used during the drinking water production process. *Hazardous Materials*, 172, 661-666.

Oppenländer T. 2003. Photochemical Purification of Water and Air. Edición Wiley-VCH, Germany. ISBN 35-2730-563-7.

Paillard H., Doré M., Bourbigot M.M. 1991. Prospects concerning applications of catalytic ozonation in drinking water treatment. 10th Ozone World Congress Proceeding. Mónaco, 313-329.

Parsons S. "Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment". IWA Publishing, Londres, Reino Unido, 2004.

Pernitsky D.J., Finch G.R., Huck P.M. 1995. Disinfection kinetics of heterotrophic plate-count bacteria in biologically treated potable water. *Water Research*, 29 (5), 1235-1241.

Pruitt K.M. y Kamau D.N. 1993. Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 221-231.

Rincón A.G. y Pulgarin C. 2004c. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂. Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 51 (4), 283-302.

Staehelin J. y Hoigné, J. 1982. Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology*, 16 (10), 676-681.

T.H.Y. Tebbutt. 1999. Fundamentos del control de la calidad del agua. Ed Limusa, S.A. ISBN 968-18-3317-1, Microbiología acuática y ecológica páginas 43-53.

Thomas G. Spiro, William M. Stigliani. 2004. Química medioambiental. Ed Pearson Educación, S.A, ISBN 84-205-3905-8, páginas 339, 348.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case C.L.; "Introducción a la microbiología". 1993. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza.

Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Paramericana, 9ª Ed. ISBN: 978-95-0060-740-7.

UNE-EN ISO 16266:2006. Calidad del agua. Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa*. Método por filtración en membrana.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2004. Guidelines for Water Reuse. EPA/625/R-04/108.

Watson H.E. 1908. A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *Journal of Hygiene*, 8, 536-542.

Wolfe R.L., Stewart M.H., Liang S., McGuire M.J. 1989. Disinfection of model indicator organisms in a drinking water pilot plant by using peroxona. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2230-2241.

ANEXOS

ANEXO I. Normas de calidad microbiológica en aguas

La Ley 14/1986 General de Sanidad establece la obligación de las Administraciones públicas sanitarias de orientar sus actuaciones prioritariamente a la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades. Es por ello que las actividades y productos que, directa o indirectamente, puedan tener consecuencias negativas para la salud deben ser sometidos a un control sanitario. En lo que respecta al uso al cual va a ir destinado un suministro de agua, las normas de calidad microbiológica exigidas son más o menos estrictas.

La Orden del 11 Mayo de 1988 relativa a las aguas prepotables establece la obligatoriedad de controlar coliformes fecales y totales, estreptococos fecales y *Salmonella* spp. para clasificar las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en categoría A1, A2, A3 o peor que A3. Salvo el parámetro *Salmonella*, que tiene asociado un valor imperativo, el resto de parámetros microbiológicos cuentan con valores indicativos deseables.

La Directiva 2006/7/CE relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño establece obligatorio realizar el recuento de *E.coli* y *Enterococcus* sp. En función de los resultados, el agua posee una calidad suficiente, buena o excelente.

En lo referente a la calidad exigida en las aguas aptas para peces, la Directiva 2006/44/CE no indica ningún parámetro microbiológico a controlar.

En el Real Decreto 140/2003, transposición al marco legislativo español de la Directiva 98/83/CE, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, se establecen como parámetros microbiológicos de obligado análisis *E.coli*, *Enterococcus* sp. y *Clostridium perfringens* (incluidos los esporos). El recuento de colonias a 22 °C y de coliformes son sólo parámetros indicadores. En el caso de incumplimiento de estos parámetros indicadores, la autoridad sanitaria valora la calificación del agua como “apta o no para el consumo humano” en función del riesgo para la salud.

Finalmente, el RD 1620/2007 establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Los parámetros microbiológicos que se deben analizar en este tipo de aguas, en función del uso al cual van a ir destinadas. *E.coli* y nemátodos (al menos los géneros *Ancylostoma*, *Trichuris* y *Ascaris*) deben ser analizados para todos los usos establecidos. El análisis de *Legionella* también es obligatorio para todos los usos de agua establecidos salvo para el uso ambiental, que no contempla su control. *Salmonella* spp. únicamente es contemplada en las aguas regeneradas con fines agrícolas e industriales. Por último, controlar *Taenia saginata* y *Taenia solium* es obligatorio si el agua se destina a regar pastos para consumo de animales productores de carne, ya que son los hospedadores intermediarios de estos parásitos.

El RD 742/2013 de 27 de Septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas y aguas de baño. Los parámetros microbiológicos que se deben analizar en este tipo de aguas son *E. coli*, *P.aeruginosa* y *Legionella* spp.

Bibliografía

Directiva 2006/113/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de diciembre de 2006 relativa a la calidad exigida a las aguas para cría de moluscos.

Directiva 2006/44/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de septiembre de 2006 relativa a la calidad de las aguas continentales que requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces.

Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de febrero de 2006 relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño y por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE.

RD 1620/2007 de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE 294 de 8 de diciembre de 2007.

Orden de 11 Mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de aguas superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable. BOE 124 de 24 de mayo de 1988.

ANEXO II. Terminología microbiológica

Las características biológicas y microbiológicas del agua vienen regidas por la población de microorganismos acuáticos que alberga y que afectan de un modo muy importante a su calidad. Algunos de estos microorganismos pueden dañar de forma más o menos grave la salud humana, tanto por sí mismos como mediante la producción de toxinas durante su ciclo vital, dando lugar a las denominadas enfermedades de transmisión hídrica. Estas tienen una incidencia especialmente acusada en los países en vías de desarrollo, e incluso cada vez más frecuentemente en los desarrollados. En los países en vías de desarrollo se estima que el 80% de las enfermedades y más de un tercio de las muertes están asociadas a la utilización y consumo de aguas contaminadas (Guimaraes et al, 2001).

Las enfermedades de transmisión hídrica componen un grupo importante de enfermedades que suelen aparecer en brotes epidémicos, algunos de ellos de graves consecuencias para amplios grupos poblacionales, y cuya común particularidad es que se transmiten a través de aguas contaminadas por distintos agentes biológicos (microorganismos patógenos) y se manifiestan por cuadros importantes de diarreas agudas.

La forma más peligrosa de contaminación de agua es la que se produce, a través de la transmisión fecal-oral, mediante la cual un microorganismo patógeno eliminado en las heces humanas o de animales contamina el medio acuático y luego es ingerido.

En términos globales se estima que las enfermedades transmitidas por el agua son responsables de más de 2 millones de muertes anuales, en especial en niños menores de 5 años. Esto equivale a un choque de 20 aviones por día y representa un 15% de todas las muertes en el grupo de edad mencionado (Tortor et al, 1993). Los microorganismos patógenos se transmiten sobre todo por la ingestión del agua que los contenga, aunque también se pueden transmitir por contacto con personas o animales infectados, o por exposición a aerosoles ricos en estos patógenos. Por otro lado, el contenido microbiológico de un agua puede afectar al desarrollo posterior de olores y sabores en esa agua, incluso después de su correcta potabilización.

Los microorganismos más numerosos que pueden albergar las diferentes masas de agua existentes en nuestro planeta se pueden clasificar en bacterias, protozoos y virus (EPA, 1999).

II.1. Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que pueden vivir como autótrofos o como heterótrofos y aprovechar el alimento soluble. Varían en tamaño de 0,5 a 5 μm . Sus formas también son variadas, lo que permite su identificación y clasificación. Algunas bacterias tienen la capacidad de formar esporos como por ejemplo el *Clostridium perfringens*. El espora es un elemento de protección frente a radiaciones, desecación, temperatura, altas presiones y frente a la entrada de sustancias químicas. El fenómeno de

esporulación bacteriana está codificado a nivel genético y representa una etapa inactiva cuya durabilidad permite a la célula sobrevivir largos periodos de tiempo hasta que de nuevo encuentra un medio idóneo que le permita activarse de nuevo.

Existen dos grupos principales en los que la mayoría de las bacterias se pueden dividir de acuerdo a su respuesta a la tinción de Gram⁴. Estos dos grupos son: bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas. La pared de las bacterias grampositivas consisten en una única capa homogénea, de 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglicano situada externamente a la membrana plasmática. En cambio, la pared de las bacterias gramnegativas contienen una capa de peptidoglicano de 2 a 7 nm cubierta por una membrana externa de 7 a 8 nm de grosor. Puesto que su pared de peptidoglicano es más gruesa, las paredes de las células grampositivas son más resistentes a la presión osmótica que las gramnegativas. En la Figura A- I se observa la diferencia en la envoltura celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas.

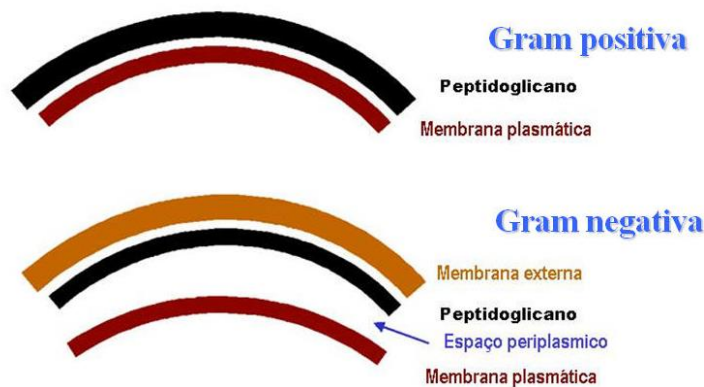


Figura A- I. Diagrama simplificado de la envoltura celular de bacterias grampositivas y gramnegativas

II.2. Protozoos

Los protozoos son microorganismos unicelulares. La mayoría son de vida libre y pueden encontrarse en el agua de manera natural; sin embargo, varias especies son parásitas y viven de sus hospedadores. En condiciones difíciles se encuentran en forma de quistes⁵ o huevos. Los huevos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* son los más comunes en aguas con presencia de contaminación fecal. Ambos protozoos son muy persistentes en el medio ambiente y muy resistentes a los tratamientos convencionales de desinfección. (Venczel *et al.*, 1997; EPA, 1999).

⁴ Tinción de Gram: 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.

⁵ Quiste: Formación patológica en forma de bolsa o cavidad limitada por una membrana y que contiene algún fluido de diversa naturaleza desde normal hasta neoplásica.

II.3. Virus

Los virus son macromoléculas de ácido nucleico (desoxirribonucleico (DNA) o ribonucleico (RNA)) rodeadas por una cubierta protectora proteica. Se consideran formas vivas sólo cuando infectan a una célula y adquieren la capacidad de reproducirse, atributo clave de los sistemas vivos. Su tamaño oscila desde 20nm a 300nm, siendo necesaria microscopía electrónica para su visualización y estudio. Pueden atravesar filtros que permiten la retención de bacterias e infectar a personas, animales, plantas o incluso bacterias (bacteriófagos) (*Madigan et al., 2003*). Al contrario que las bacterias, los virus no están presentes en el ser humano de manera natural. Cuando las personas enferman por causa de un virus, generalmente se eliminan del cuerpo humano en grandes cantidades mediante las heces.

Los virus se clasifican atendiendo al tipo de ácido nucleico que los conforma y a su morfología, la cual responde a tres formas principales: simetría icosaédrica, helicoidal y compleja.

Muchas especies de virus se transmiten vía aguas naturales, ríos, arroyos, lagos y embalses. En concreto, los virus acuáticos suelen ser parásitos de organismos superiores, de organismos o microorganismos típicamente encontrados en aguas.

A diferencia de las bacterias, los virus son siempre nocivos y provocan enfermedades a todo organismo al que atacan. Enfermedades tan comunes como la gripe, el catarro, el sarampión o la viruela, son debidas a virus.

II.4. Indicadores microbiológicos de contaminación fecal

La variedad de microorganismos de un agua es tan elevada que se hace prácticamente imposible verificar mediante análisis rutinarios y rápidos la ausencia de toda esta potencial flora microbiana de un agua de consumo humano. Por ello, se recurre a la investigación de organismos normalmente presentes en las deyecciones humanas y animales, que de este modo actúan de organismos indicadores de una contaminación fecal, lo que posibilita el asegurar la eficacia de la potabilización y depuración de un agua. La presencia de estos microorganismos (que no tienen que ser patógenos por sí mismos) indicará la probable presencia de otros claramente patógenos.

El examen bacteriológico es un medio útil para detectar contaminaciones fecales (potencialmente peligrosas) en un agua y garantizar o no la calidad de un agua desde el punto de vista sanitario. Plantea los inconvenientes de indicar, en realidad, una contaminación en el tiempo y lugar de muestras solamente, por lo que no es totalmente determinante. En este sentido, para aguas de consumo distribuidas por redes en deficiente estado de conservación, la contaminación bacteriológica puede indicar defectos en la red de distribución más que en el proceso anterior de potabilización misma del agua en la estación de tratamiento.

En relación al tipo de microorganismos a investigar, deben cumplir un número mínimo de exigencias:

- Presencia siempre de una elevada cantidad de ellos en el residuo fecal humano (o en su caso, en residuos fecales a animales domésticos).
- Facilidad en su detección utilizando métodos analíticos microbiológicos simples y rápidos.
- Periodo de supervivencia de, al menos, el mismo que el de los organismos claramente patógenos.

Estos requerimientos son cumplidos por las bacterias entéricas, y de ahí su aplicación rutinaria, efectiva y universal a fin de chequear la inocuidad de un agua en general, y de aguas de consumo público en particular.

En este sentido, indicadores típicos de polución fecal son *Coliformes totales*, y especialmente fecales, así como los *Streptococos fecales*, estos últimos que también pueden acceder al medio hídrico a través de insectos o vegetales. Además, han de considerarse en cierta medida como indicadores fecales a los *Clostridium*, si bien, dado que estos microorganismos anaerobios se acumulan especialmente en los lodos y sedimentos de los cauces de agua, su utilidad debe pasar por una toma de muestras cuidadosa que no altere el fondo del cauce de agua muestreado. Finalmente, también cabe incluir si no como microorganismos indicadores fecales, sí al menos por su posible incidencia en el uso del agua por el ser humano a pseudomonas y estafilococos.

La investigación de *virus entéricos* y *colifagos* es otro indicador a tener en consideración, especialmente si se tiene en cuenta que la potencialidad patógeno asociada a los virus puede ser mayor que la respectiva de las bacterias.

La aceptación de una serie de microorganismos indicadores de contaminación fecal no exime en ningún caso la investigación de otros microorganismos probables. Así, en situaciones epidémicas extremas, el criterio de detección de unos microorganismos habituales puede y debe acomodarse en la práctica a lo que realmente requiera el momento. Este supone el análisis de unos parámetros microbiológicos atípicos, pero que pueden informar más acertadamente acerca de las circunstancias concretas de una fuente de agua específica en una situación dada. (Marín, 2003)

II.4.1. *Escherichia coli*

Pertenece al grupo de los coliformes que se definen como bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas, Gram-negativas, que no crean endosporas, con forma de bacilo y que fermentan la lactosa formando gas a las 48 horas de ser cultivadas en caldo lactosado a 35°C. Es uno de los habitantes más comunes del tracto intestinal humano y animal, y el más estudiado en microbiología. De hecho, la concentración de esta bacteria en las heces de origen humano y animal es muy elevada, del orden de 10⁹ por gramo (OMS, 1995). Esta bacteria es una herramienta importante en la investigación biológica básica. En 1895 se propuso una prueba *E.coli* para determinar la potabilidad del agua de bebida (Gesche et al., 2003).

No suele ser un organismo patógeno pero puede causar infecciones urinarias y ciertas cepas segregan enterotoxinas que producen diarreas y en ocasiones enfermedades muy graves transmitidas por los alimentos.

II.4.2. *Clostridium perfringens*

El género *Clostridium* se define como bacteria Gram-positiva, de forma bacilar y anaerobia estricta, aunque puede resistir concentraciones más o menos fuertes de oxígeno. Todos los *Clostridium* forman una spora, circular u oval, a menudo deformante. El hecho de formar esporas es lo que les confiere una mayor resistencia ante las condiciones adversas del medio, como la resistencia al calor y a varias sustancias químicas. Pueden ser móviles (debido a la presencia de cilios periticos) o inmóviles.

Las enfermedades relacionadas con esta bacteria son el tétanos, el botulismo y la gangrena gaseosa. Estas bacterias también son causa frecuente de diarrea transmitida por los alimentos.

II.4.3. *Enterococcus sp.*

El género *Enterococcus* está formado por bacterias esféricas u ovoides (cocos), que se encuentran aisladas, formando pares (diplococos) o cadenas cortas. Son Gram-positivos, no formadores de esporas, catalasa negativa e inmóvil, y tienen complejos y variables requerimientos nutricionales. Son organismos facultativos anaerobios, por lo que sobreviven bien en ausencia de oxígeno.

Son causantes en la mayoría de los casos de infecciones endógenas, entre ellas, infección del tracto urinario, endocarditis infecciosa, diverticulitis, meningitis, bacteremias e infecciones intrahospitalarias asociadas a procedimientos como instalación de catéteres vasculares, urinarios y neuroquirúrgicos entre otros.

Finalmente, los resultados indican que realmente son un indicador más estable que *E.coli* y que los coliformes fecales. Además son un indicador conservador bajo condiciones de agua salobre.

II.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (o *Pseudomonas pyocyanea*) es una bacteria Gram -negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas.

Como otras *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo).

P. aeruginosa es a menudo identificada, de modo preliminar, por su apariencia perlada y olor a uvas *in vitro*. La identificación definitiva de *P. aeruginosa* frecuentemente incluye, tanto identificar la producción de piocianina y fluoresceína como determinar su habilidad de crecer a 42°C. *P. aeruginosa* es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga.

Etimológicamente, "*Pseudomonas*" significa "falsa unidad", del griego *pseudo*, que significa "falso", y "*monas*", que significa unidad simple. El nombre fue usado

inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes. *Aeruginosa* es el nombre latino para el cardenillo⁶. Esto describe el pigmento azul verdoso bacteriano, visto en los cultivos de laboratorio “de *P.aeruginosa*”. La biosíntesis de piocianina es regulada por mecanismos homeostáticos⁷, como un biofilm⁸ asociada a la colonización de *P.aeruginosa* en los pacientes con fibrosis quística.

Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos⁹ infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de la sangre como por ejemplo sepsis¹⁰. *P.aeruginosa* es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua de bebida. También se relaciona con foliculitis de tinas de agua caliente, en especial aquellas sin un control higiénico continuo.

Bibliografía

Drasar B.S., Hill M.J. 1974. Human Intestinal Flora. Ed. Academic Press Inc., ISBN-10 0122217500.

EPA, Environmental Protection Agency. 1999. Alternative Disinfectants and Oxidants. Guidance Manual. Office of Water. 815-R-99-014.

Gesche, E.; Vallejos, A.; Saez, M.; “Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria del agua. Método del número más probable (NMP)”. 2003. Arch. Med. Vet., 35(1), 99-107.

Guimaraes, J.R.; Ibanez, J.; Litter, M.I.; Pizarro, R.; “Desinfección de agua. Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea”. 2001. Libro colectivo CYTED. Editado por Miguel A. Blesa. ISBN: 987-43-3809-1.

Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock Biología de los Microorganismos. Ed. Pearson Educación S.A, 10ª Ed. ISBN: 84-205-3679-2.

Marín Galvín, R. 2003. Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ed Díaz de Santos, ISBN: 84-7978-590-X.la

⁶ Cardenillo: también conocido como verdigrís, es una pátina venenosa de color verdoso o azulado que se forma sobre superficies de cobre o de alguna de sus aleaciones, como bronce o latón.

⁷ Homeostasis: proceso por el cual un organismo o un sistema mantiene constantes sus propios parámetros independientemente de las condiciones del medio externo mediante mecanismos fisiológicos.

⁸ Biofilm: agregado de microorganismos con abundantes relaciones ecológicas entre ellos, frecuentemente dispuestos en capas, embebidos en una matriz extracelular, adheridos a una superficie viva o inerte.

⁹ Inmunocomprometido: los individuos inmunocomprometidos tienen defectos en sus mecanismos de defensa naturales que resultan en un mayor riesgo de infección.

¹⁰ Sepsis: Es una enfermedad en la cual el cuerpo tiene una respuesta grave a bacterias u otros microorganismos.

OMS. 1995. "Guías para la calidad del agua potable. Vol 1. Recomendaciones". ISBN: 92-4-354460-8.

Rahme, L. G., M-W. Tan, L. Le, S. M. Wong, R. G. Tompkins, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel, 1997, *Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13245-13250

Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.

Tortor, G.J.; Funke, B.R.; Case C.L.; "Introducción a la microbiología". 1993. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza.

Venczel L.V., Arrowood M., Hurd M., Sobsey M.D. 1997. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. Applied and Environmental Microbiology, 63 (4), 1598-1601.

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

ANEXO III. Técnicas convencionales y procesos de oxidación avanzada

La definición formal de desinfección del agua se refiere a la destrucción de los organismos causantes de enfermedades o patógenos presentes en ella. Los principales organismos son bacterias, virus y protozoos.

La efectividad de un proceso de desinfección se mide por el porcentaje de organismos muertos dentro de un tiempo, una temperatura y un pH fijados. La resistencia de estos microorganismos varía según sus características morfológicas.

El proceso de desinfección del agua no es instantáneo sino que se realiza progresivamente, con más o menos velocidad a través del tiempo y se considera terminado cuando el 100% (99,9%) de los organismos que se tratan de destruir han muerto. La forma con que se realiza este proceso puede describirse matemáticamente, considerando que se trata de una reacción de primer orden y que por tanto el número de organismos destruidos en la unidad de tiempo es proporcional al número de organismos remanentes en el tiempo t considerado. (Poyatos, 2010)

La eficacia de un desinfectante depende de varios factores, entre los que destacan el tipo y concentración de los organismos a destruir, por su diferente resistencia a la acción de los desinfectantes, las características físico-químicas y temperatura del agua.

De una forma resumida se puede decir que un desinfectante es adecuado si cumple las siguientes condiciones:

- Capacidad para destruir los organismos presentes en un tiempo de contacto razonable y en la gama de temperaturas habitual de las aguas naturales.
- Fácil disponibilidad del reactivo (coste razonable) y de aplicación segura y exacta.
- No comunicar al agua propiedades tóxicas o desagradables, o generar subproductos de reacción que puedan suponer un riesgo para la salud.
- Capacidad del desinfectante para permanecer en el agua en una concentración residual que evita posibles contaminaciones en la red de distribución.
- Disponer de técnicas de valoración rutinarias para el control de la desinfección.

Existe una gran variedad de procesos o reactivos utilizados en la desinfección de aguas. El cloro y sus derivados es el que se adapta en mejor medida a las condiciones anteriormente citadas aunque presenta un problema como es los subproductos de la desinfección.

La cloración puede efectuarse mediante cloro molecular o alguno de sus productos derivados.

- Cl_2 : es la forma de menor coste de explotación en instalaciones de gran demanda de producto, aunque por su toxicidad es necesario cumplir ciertos requisitos de seguridad en su almacenamiento y dosificación.
- Hipoclorito sódico "lejía" (NaClO), en forma líquida, e Hipoclorito cálcico ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) en forma sólida. Se utiliza en instalaciones más pequeñas.
- Dióxido de cloro (ClO_2). Este reactivo se genera in situ por reacción de cloro o ácido clorhídrico sobre clorito sódico, y su acción desinfectante es comparable a la del cloro molecular. Se suele utilizar en sustitución del cloro en agua que contienen fenoles, para evitar la formación de clorofenoles, de sabor desagradable.
- Las Cloraminas, producidas en la combinación del cloro con amoníaco u otras sustancias nitrogenadas. Son antisépticos muy estables, cuya acción es menos rápida que la del cloro, pero que subsisten en el agua durante un tiempo más prolongado.

Los principales problemas de la cloración son los siguientes: (Osorio *et al.*, 2010)

- Influencia de la concentración de sólidos en suspensión y turbidez en la efectividad del proceso.
- Influencia de la concentración de compuestos nitrogenados en la eficiencia del proceso
- Resistencia de determinados organismos a la cloración.
- Formación de subproductos de la cloración.
- Formación de cloraminas.
- Efecto negativo del cloro residual sobre cultivos.
- La necesidad de dechloración¹¹ aumenta los costes entre un 20-30%.

Además es necesario tener en cuenta los riesgos que conllevan el transporte y almacenaje de cloro. A continuación se exponen los riesgos del manejo y manipulación de cloro: (EPA 832-5-99-034)

- Irritación de las mucosas, tracto respiratorio y ojos.
- Una exposición prolongada puede provocar tos, irritación, incluso provocar un edema pulmonar y la muerte.
- El cloro en estado gaseoso tiende a hidrolizarse en presencia de humedad, formando ácido hidroclorehídrico, el cual irrita los ojos y la piel.

Si el oxidante utilizado en el proceso de desinfección es un derivado del cloro se genera un problema asociado a la formación de subproductos organoclorados.

¹¹ Dechloración: proceso por el que se elimina el cloro residual después de un proceso de cloración.

Los THMs son derivados del metano con sustituyentes halogenados. Los más comunes en aguas de bebida son: cloroformo (HCCl_3), bromodiclorometano (HCBBrCl_2), dibromoclorometano (HCBBr_2Cl) y bromoformo (CHBr_3), en este orden de importancia. Estos productos aparecen como subproductos de las reacciones de oxidación del cloro, que reaccionan con compuestos orgánicos precursores como los ácidos húmicos contenidos en la fracción orgánica de las aguas brutas superficiales. Se originan tras una compleja serie de reacciones químicas que conducen a la rotura de los anillos aromáticos y a generar compuestos mono y dicarbonados simples con sustituyentes halogenados, en especial, cloro, bromo y yodo.

En la formación de THMs colaboran todas las sustancias polifenólicas del agua, e incluso algas, especialmente en aguas superficiales con un alto grado de eutrofización. Incrementos de temperatura, pH, contenido en bromuros y yoduros, y la dosis de cloro aplicada en el tratamiento del agua conducen a la formación de cantidades importantes de THMs. Sin embargo otros reactivos oxidantes, como ozono, dióxido de cloro y cloraminas generan menos THMs.

Los THMs son depresores del sistema nervioso central y pueden afectar negativamente a las funciones hepáticas y renales. Se consideran potencialmente cancerígenos y el consumo de aguas con alto contenido de estos compuestos se relaciona con la aparición de episodios de cáncer hepático. A partir de enero del 2009 el RD 140/2003 reduce el límite permitido para la suma de THMs a $100\mu\text{g/l}$.

Otros subproductos de la desinfección de cloro son los ácidos haloacéticos (HAA: mono, di y tricloroacéticos, mono y dibromoacéticos,...), formados por reacción del cloro con la materia orgánica presente en agua bruta, y que pueden encontrarse en mayores proporciones que los THMs en función del pH. También se producen Haloacetónitrilos (HAN), haloaldehídos y halocetonas que son otros subproductos minoritarios. Como producto de la reacción del cloro con compuestos fenólicos aparecen los clorofenoles, siendo los más comunes: 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol.

En la Tabla A- I se muestran los subproductos más comunes que se pueden formar tras los tratamientos con cloro y con ozono.

Tabla A- I. Subproductos de desinfección del cloro y el ozono. (Rivera et al.,2010)

DESINFECTANTE	SUBPRODUCTOS	DESINFECTANTE	SUBPRODUCTOS
Cloro	Trihalometanos (THT)	Ozono	Bromato
	Ácidos Haloacéticos		Carbón orgánico disuelto biodegradable
	Halopiricina		Aldehídos y cetonas
	Halocetonas		Cetoácidos
	Clorofenoles		Bromoformo y compuestos bromados
	Cloruro y bromuro de cianógeno		Peróxidos
	Hidrato de cloral		Epóxidos
	Aldehídos de bajo peso molecular		Nitrosaminas

III.1. Desinfección convencional con ozono

La necesidad de adecuación a la norma sobre aguas de abastecimiento para cumplir con los límites establecidos en THMs está potenciando la utilización de oxidantes alternativos para sustituir a los derivados del cloro, entre los que destaca el ozono. (RD 140/2003)

El ozono (O₃) se utiliza en la entrada de las estaciones de tratamientos de agua potable (ETAP's) en la etapa de precloración y no origina THMs al lograr la oxidación completa de la materia orgánica. El ozono es un gas de color azul, olor picante e inestable, que debe generarse *in situ* durante el tratamiento.

En el tratamiento de aguas tiene unas aplicaciones similares al cloro y presenta algunas ventajas: (Osorio et al., 2010; Von Gunten, 2003)

- No se generan subproductos organohalogenados cancerígenos al reaccionar con la materia orgánica del agua, salvo si ésta contiene bromuros, formándose entonces compuestos organobromados también peligrosos para la salud humana.
- Reduce y elimina los problemas de color, olor y sabor de forma más eficaz que el cloro, especialmente los fenoles del agua, sin dejar los olores y sabores residuales característicos del cloro y sus derivados.
- Es un oxidante eficaz en la eliminación de hierro y manganeso y en la oxidación de materias orgánicas, con acción sobre los detergentes.
- Presenta una acción desinfectante muy eficaz, menos sensible a las variaciones de pH y temperatura, y muy rápida, por lo que requiere periodos de contacto muy cortos. Es más fuerte que el cloro frente a esporas y virus, y algo menor frente a bacterias vegetativas.

- Su manejo es menos peligroso que el del cloro, aunque sus costes de inversión y explotación son más elevados.

El ozono es una especie química caracterizada por ser un gas de tonalidad azul muy inestable que se descompone rápidamente produciendo oxígeno y que presenta un olor característico. El potencial de oxidación del ozono es de 2,07 V frente a 2,8 V del radical hidroxilo, por lo que es un potente oxidante y un desinfectante muy eficiente. Es diez veces más soluble en agua que el oxígeno y actúa sobre todo tipo de bacterias, virus y protozoos y se estima que su eficacia de inactivación microbiana es alrededor de 3000 veces superior a la del cloro.

En la Tabla A- II se muestran los valores de las principales características físicas del ozono.

Tabla A- II. Principales características físicas del ozono.

Características	Valor
Peso molecular	48 g·mol ⁻¹
Temperatura de ebullición	-111°C
Punto de congelación	-251°C
Temperatura crítica	-12,1°C
Presión crítica	54,6 atm
Densidad líquido	1,572 g·L ⁻¹
Densidad gas	2,144 g·L ⁻¹
Calor de formación	34,4 kcal·mol ⁻¹
Potencial de oxidación	2,07V

La corta vida de éste tanto en estado gaseoso como en disolución acuosa no permite su almacenamiento por lo que debe generarse *in situ* a partir de aire u oxígeno, introduciéndose en él agua a través de difusores porosos, hidroinyectores o torres de contacto (Lanao, 2012).

Sin embargo la ozonización presenta una serie de problemas como son: (Gracia et al., 1999; Hoigné, 1998)

- Uso como desinfectante primario en las etapas de preoxidación u oxidación intermedia ya que no tiene poder residual.
- La estabilidad del ozono depende en gran medida de la matriz acuosa, especialmente su pH y del tipo y contenido de materia orgánica del agua.
- Influencia de la concentración de sólidos en suspensión en la efectividad del proceso.
- Influencia de la concentración de materia orgánica en la resistencia de determinados organismos.
- Formación de subproductos.

- Debe ser completado el tratamiento con una etapa de cloración final con la finalidad de prevenir la contaminación microbiana y el desarrollo de biofilms. Ya que pH 8, el pH habitual del agua natural, la vida media del ozono es inferior a una hora, pasando rápidamente a oxígeno disuelto.

III.2. Procesos de oxidación avanzada

Los POA's, aunque utilizan sistemas reactantes diferentes, en los que se incluyen los procesos de degradación fotoquímica (UV/O₃, UV/H₂O₂), fotocatalisis (TiO₂/UV, reactivos foto-Fenton) y procesos de oxidación química (O₃, O₃/H₂O₂, H₂O₂/Fe²⁺), tienen la misma característica química, la producción de radicales hidroxilo (\cdot OH).

Los radicales hidroxilo (\cdot OH) son especies muy reactivas y atacan a la gran mayoría de las moléculas orgánicas, por lo que se caracterizan por su baja selectividad. Son especies más fuertes que otros oxidantes tradicionales como el ozono, peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro o cloro. Presentan por tanto un mayor potencial estándar de oxidación como se puede ver en la Tabla A- III. (Forero *et al.*, 2005)

Tabla A- III. Potenciales estándar de oxidación.

Especie	E _o (V,25°C)
F ₂	3,03
\cdot OH	2,80
O atómico	2,42
O ₃	2,07
H ₂ O ₂	1,76
MnO ₄ ²⁻	1,67
Cl ₂	1,36
ClO ₂	1,15

III.2.1. Clasificación de los procesos de oxidación avanzada

Estos procesos se pueden clasificar en procesos homogéneos y heterogéneos. Los procesos homogéneos se pueden llevar a cabo mediante la aplicación de energía o sin su aporte.

Los procesos homogéneos con aporte de energía se pueden clasificar en función de la procedencia de energía de la siguiente manera:

A. Energía procedente de la radiación ultravioleta (UV):

- Ozonización y radiación ultravioleta (O₃/UV).

- Peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta (H₂O₂/UV).
- Ozono, peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta (O₃/H₂O₂/UV).
- Foto-Fenton (Fe²⁺/H₂O₂/UV).

B. Energía procedente de ultrasonidos (US):

- Ozonización y ultrasonidos (O₃/US).
- Peróxido de hidrógeno y ultrasonidos (H₂O₂/US).

C. Electroquímica:

- Oxidación electroquímica.
- Oxidación anódica.
- Electro-Fenton.

Los procesos homogéneos sin aporte de energía son los siguientes:

- Ozonización en medio alcalino (O₃/OH⁻).
- Ozonización con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂) y (O₃/H₂O₂/ OH⁻).
- Peróxido de hidrógeno y catalizador (H₂O₂/Fe²⁺).

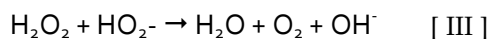
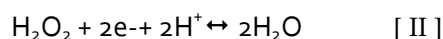
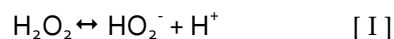
Por último, los procesos heterogéneos se clasifican en:

- Ozonización catalítica (O₃/Catalizador).
- Ozonización fotocatalítica (O₃/TiO₂/UV).
- Fotocatálisis heterogénea (H₂O₂/TiO₂/UV).

III.2.2. POAs utilizados

Ozonización con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂)

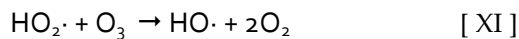
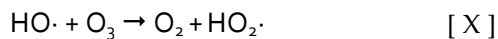
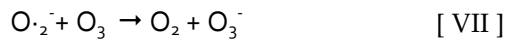
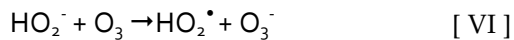
El peróxido de hidrógeno es un ácido débil, posee la característica que en disoluciones acuosas se disocia parcialmente en el ión hidroperóxido (HO₂⁻). Es un poderoso oxidante y un compuesto inestable que dismuta¹², con una velocidad máxima si se trabaja con el pH de su pK_a. Dismuta según las siguientes reacciones [Ecuación I-Ecuación III]:



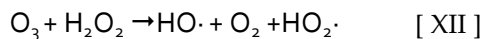
¹² Dismutación: reacción redox donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido cuando la suma de sus potenciales de los correspondientes pares redox es mayor de 0.

Se puede producir una destrucción adicional de la carga orgánica, si se combinan dos o más oxidantes, de tal manera que se aprovechen los efectos sinérgicos entre ellos.

La descomposición del ozono por transferencia de electrones es iniciada por el peróxido de hidrógeno. La reacción genera radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), de tal forma que se consumen ambos reactivos a través de un complejo mecanismo en cadena [Ecuación IV-Ecuación XI]:



La ecuación global del proceso es la siguiente [Ecuación XII]:



Es un tratamiento rápido que ha resultado efectivo para descomponer compuesto organoclorados como tricloroetileno y tetracloroetileno, por lo que resulta un excelente postratamiento en aguas sometidas a tratamientos de desinfección con cloro o dióxido de cloro. (Regalado, 2008)

Ozonización catalítica (O_3/TiO_2)

Gracia (1999) establece que en la ozonización catalítica se producen dos efectos simultáneamente. Por un lado tiene lugar una ozonización de los compuestos disueltos mediante la acción directa del ozono molecular y el ataque indirecto de las especies radicalarias generadas por la descomposición del ozono, y por otro se produce la ozonización de los compuestos adsorbidos en la superficie del catalizador, desarrollándose efectos simultáneos de ozonización y catálisis.

Logemann y Annee (1997) defienden que los fenómenos superficiales en el catalizador durante los procesos de oxidación catalítica son importantes para que se produzca con éxito la desinfección. Para ello, establecen tres acciones:

- En primer lugar se produce la adsorción simultánea del ozono y la materia orgánica o los subproductos de ozonización en la superficie del catalizador.

- Segundo, se produce la descomposición del ozono en los puntos activos del catalizador, generándose especies radicalarias más reactivas que el propio ozono. Estas especies oxidan los compuestos adsorbidos.
- Tercero, los productos finales de la oxidación son desorbidos¹³, pues su afinidad con el catalizador es menor.

Bibliografía

EPA 832-5-99-034. Combined sewer overflow technology fact sheet chlorine disinfection. 1999.

Forero, J. E.; Ortiz, O. P.; Rios, F. 2005. "Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de la refinería". CT&F Ciencia Tecnología y Futuro, 3, 97-109.

Gracia R., Cortés S., Sarasa J., Ormad P., Ovelleiro J.L. 1999. Tratamientos oxidativos en la potabilización del agua. La ozonización catalítica como técnica complementaria a la cloración. Tecnología del Agua, 188, 34-44.

Hoigné J. 1998. Chemistry of aqueous ozone, and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. En: The handbook of environmental chemistry quality and treatment of drinking water. Edición Springer.

Lanao Maldonado, M. 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus sp.* en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Logemann F.P. y Annee J.H.J. 1997. Water treatment with a fixed bed catalytic ozonation process. Water Science and Technology, 35(4) 353-360.

Osorio Robles, F; Torres Rojo, J.C; Sánchez Bas, M. 2010. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes. Aplicación de procesos industriales a la reutilización de aguas residuales. Métodos de desinfección de aguas residuales. Ed Díaz de Santos, ISBN: 978-84-7978-903-9.

Poyatos García, J.A. 2010. Nuevos materiales y tecnología para el tratamiento del agua. ETAP's, su funcionamiento y diferentes tipos. Los procesos convencionales Ed Universidad Internacional de Andalucía, ISBN: 978-84-7993-202-2.

RD 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 54 de 21 de febrero de 2003.

¹³ Desorber: un gas, un líquido o una sustancia disuelta de una superficie en la que esté adsorbido significa retirarlo de esa superficie.

Regalado Jardiel, M.E. 2008. Eliminación de *Enterococos* en aguas naturales mediante técnicas de oxidación avanzada basadas en ozono, peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Zaragoza.

Rivera-Utrilla, J; Sánchez-Polo, M; Méndez-Díaz, J.D. 2010. Nuevos materiales y tecnología para el tratamiento del agua. Nuevas tecnologías en el tratamiento de aguas. Procesos avanzados de oxidación. Ed Universidad Internacional de Andalucía, ISBN: 978-84-7993-202-2.

Von Gunten V. 2003. Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*, 37, 1469–1487.

ANEXO IV. Desarrollo de la metodología analítica físico-química

IV.1. Turbidez

La turbidez se entiende como la reducción de la transparencia de un líquido originada por la presencia de materias sin disolver. Se puede definir también, en términos más específicos, como la propiedad óptica de una muestra de dispersar o absorber la luz en lugar de transmitirla linealmente. Este parámetro se mide utilizando un turbidímetro marca Hanna Instruments LP 200 según la norma UNE-EN ISO 7027:1999. Este instrumento tiene un error ≤ 0.2 NTU, las unidades nefelométricas de turbidez (NTU) son los resultados en que se expresa esta propiedad.

IV.2. Conductividad

La conductividad indica la concentración total de iones en el agua. Se define como la expresión numérica de la capacidad del agua de transportar corriente eléctrica. Para su determinación se utiliza un conductímetro marca Crison modelo Basic 30 con un rango de medida de $0,01$ - $1999 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ y un error $\leq 0.02 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, según la norma UNE-EN ISO 2788:1994. Los resultados se expresan en $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

IV.3. pH

El pH se define como $-\log [\text{H}^+]$ y da la medida del grado de acidez o alcalinidad de un medio acuoso. Para la determinación de este parámetro se utiliza un pH-metro marca Crison modelo GLP calibrado previamente con disoluciones tampón de pH 7,00 y 4,01. Se utiliza el medidor 4500-HB del Standard Methods (Clesceri *et al.*, 2005).

IV.4. Sólidos en Suspensión Totales (S.S.T)

Los sólidos en suspensión totales se miden a 810nm y se determinan utilizando un fotómetro multiparamétrico Hach Lange DR 2800 según el método 2540D del Standard Methods (Clesceri *et al.*, 2005)

IV.5. Peróxido de Hidrógeno

El cálculo de la concentración de peróxidos se realiza de forma semicuantitativa por comparación colorimétrica. Se utiliza un test indicador de peróxidos marca Merckoquant®.

Bibliografía

Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W., Greenberg A.E., Franson M.A.H. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 Edition. APA-AWWA-WEF. ISBN 08-7553-047-8.

UNE-EN ISO 7027: Water Quality-Determination of turbidity (1999).

ANEXO V. Metodología microbiológica

V.1. Fortificación de muestras con *Pseudomona aeruginosa*

La cepa de *P.aeruginosa*. utilizada proviene del stock del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas. Al estar ya identificada y haber sido utilizada en otros estudios previos [Ibarz, 2008], no se considera necesario realizar ninguna prueba bioquímica de confirmación.

La fortificación de las muestras de agua del Canal Imperial de Aragón se realiza a partir de un vial congelado a -20 °C. Tras descongelarse, se toma un inóculo con el asa de siembra y se realiza un aislamiento en superficie por agotamiento en agar nutritivo, tal y como se muestra en la Figura A- II, incubándose las placas a 37 °C durante 48 horas en aerobiosis con el fin de disponer de un cultivo bacteriano joven y abundante.

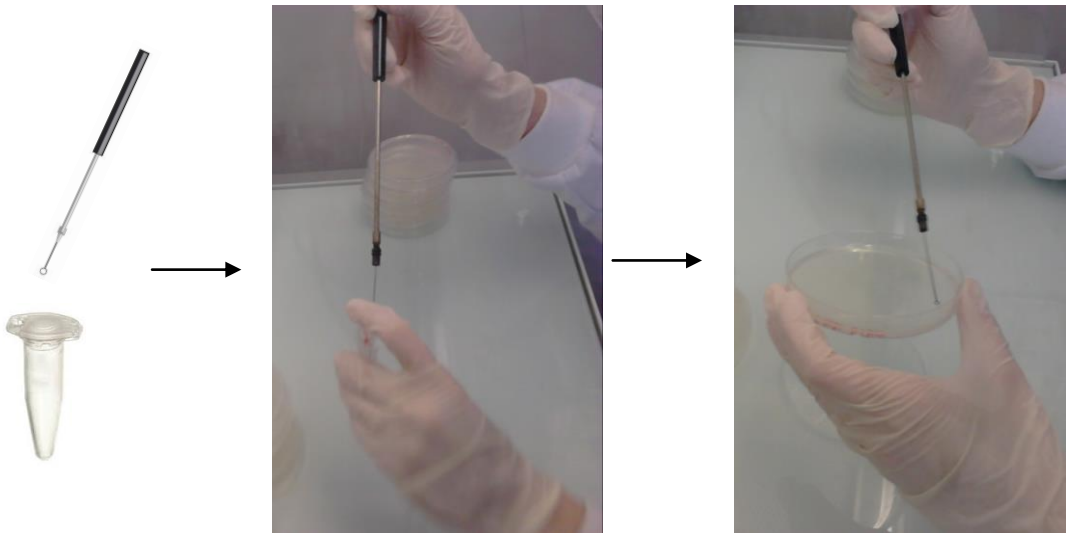


Figura A- II. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento.

V.2. Análisis de *Pseudomona aeruginosa*

Medios de cultivo

Los productos químicos que se utilizan en la preparación de los medios de cultivo son de calidad analítica reconocida. El material de vidrio, antes de su uso, se esteriliza en el autoclave mediante calor húmedo durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C para eliminar cualquier microorganismo o forma esporulada de resistencia y trabajar en condiciones estériles.

El medio de cultivo es un ambiente artificial diseñado por el hombre para proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano en el laboratorio. En función del tipo de medio, se encuentran en estado líquido, sólido o semisólido. El medio sólido, es el que se utilizan en esta investigación, se presentan de

manera diversa, pero la forma más común es desecada en forma de polvo fino o granular. Para su reconstitución, se suspende la cantidad precisa de polvo en agua destilada y se lleva a ebullición. Posteriormente, se esteriliza durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C en el autoclave. Tras finalizar el proceso de autoclavado, los frascos con el agar líquido se colocan en el baño termostático a 50 °C y se mantienen hasta su utilización. Si el medio de cultivo preparado no se utiliza inmediatamente, se guarda refrigerado y etiquetado durante un periodo no superior a un mes.

El medio que se utiliza para el crecimiento microbiano de *P.aeruginosa* es el agar Centrimide. Este es un medio selectivo que contiene centrimida y que produce pirocianina o 85. Se utiliza con frecuencia para el aislamiento de coliformes. En la Tabla A- IV se muestra la composición del agar Centrimide y en la Figura A- III el aspecto de colonias de *P.aeruginosa* en este agar.

Tabla A- IV. Composición del agar Centrimide.

Ingredientes	Concentración (g·L ⁻¹)
Pluripeptona	3,0
Lactosa	10,0
Mezcla de sales binarias	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Agar	13,5
Rojo Neutro	0,03
Cristal Violeta	0,001

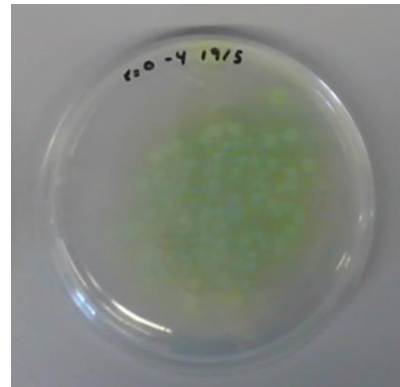


Figura A- III. Aspecto de colonias de *P.aeruginosa* en el agar centrimide

Diluciones decimales seriadas

El volumen de agua a filtrar depende de la concentración bacteriana de la muestra. El volumen recomendado por el RD 140/2003 es 100 mL, pero en aguas naturales sin tratar, el número de bacterias en este volumen puede variar desde pocas decenas hasta cientos de millares, lo que impediría en este último caso un recuento adecuado de las colonias. Por tanto, como no se conoce de antemano la concentración microbiológica presente en la muestra de agua a analizar, se realizan diluciones de la muestra inicial.

A partir del agua natural (dilución 0), se toma 1 mL de la muestra con micropipeta y se transfiere a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9 % NaCl, estéril. A continuación, se homogeneiza en un vortex, obteniéndose de esta forma la dilución 1:10 (o dilución -1). Para hacer las diluciones sucesivas, se toma 1 mL de la dilución precedente bien homogeneizada y se lleva a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9% NaCl, todo ello en ambiente de trabajo estéril, proporcionado con un mechero Bunsen. La Figura A- IV refleja el procedimiento de diluciones decimales seriadas de manera gráfica (Lanao, 2012).

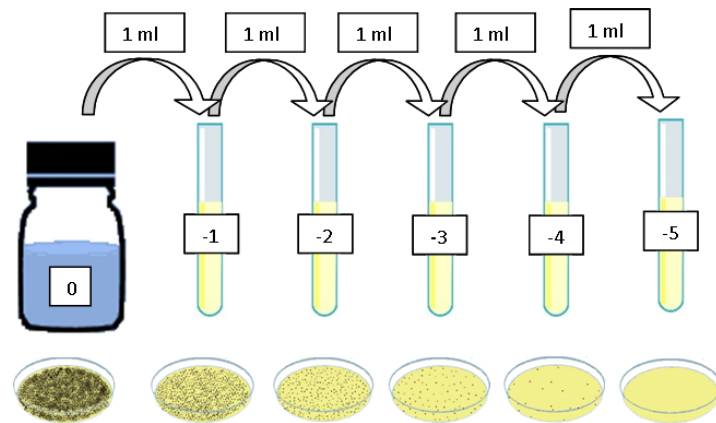


Figura A- IV. Esquema del método de diluciones decimales seriadas.

Método de siembra en superficie

Para llevar a cabo la siembra se pipetea sobre la superficie del agar dispuesto en la placa el volumen de muestra o de dilución deseada (20–500 μL) y a continuación se extiende de forma homogénea por toda la superficie de la placa con ayuda de un asa Drigalsky. Ante el desconocimiento de la concentración exacta de bacterias en la muestra de agua, se siembran varias placas con diferentes volúmenes y diluciones con el fin de asegurar una placa adecuada para el recuento final. Este modelo de análisis se utiliza cuando se espera una concentración de bacterias superior a $600 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. Una vez ya se ha extendido la muestra por el Agar uniformemente se procede a la incubación de las placas de Petri en la estufa durante (44 ± 4) horas a una temperatura de $(36 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ según establece la norma (UNE EN ISO 16266:2006).

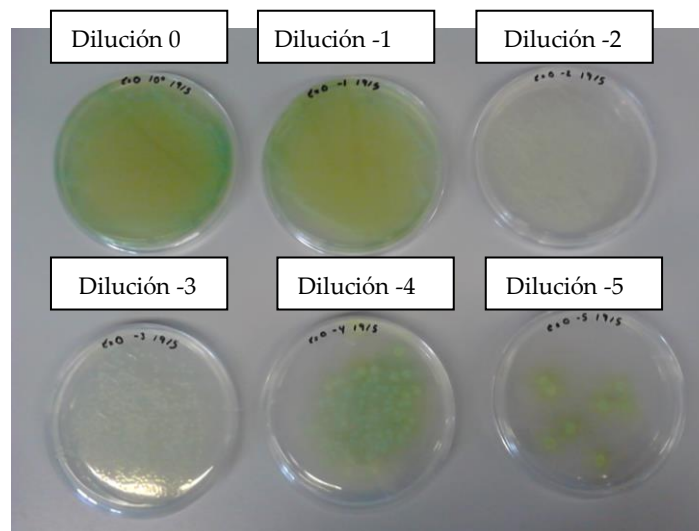


Figura A- V. Aspecto de las colonias de *P.aeruginosa* en las placas de Petri después de utilizar el método de diluciones decimales seriadas de una muestra de agua y su posterior análisis por el método de siembra en superficie.

Método de filtración de membrana

Se trata de una de las herramientas más versátiles en el análisis microbiológico del agua. El uso del método de filtración por membrana permite examinar grandes volúmenes de aguas en los que la concentración esperada de bacterias es inferior a 600 UFC·L⁻¹.

En primer lugar se realiza la limpieza del soporte de filtración, para ellos se flamea el soporte con ayuda de un mechero Bunsen. A continuación, con ayuda de unas pinzas estériles se coloca el filtro con un diámetro de poro de 0,45 µm en el soporte y se adapta el embudo. El siguiente paso es humedecer el filtro con suero fisiológico (NaCl 0,9 %) dejando pasar una cierta cantidad de suero a través del filtro y dejando el resto dentro del embudo para pasar a continuación la muestra original a filtrar. Por último se coge el filtro con las pinzas estériles y se transfiere a la placa Petri. Con el objetivo de asegurar la obtención de placas con un número apropiado de colonias para el recuento (entre 20 y 200 UFC·L⁻¹) se filtran varios volúmenes.

Cuando ya se ha depositado el filtro en la placa Petri se procede a incubar las placas de Petri en la estufa durante (44 ± 4) horas a una temperatura de (36 ± 2)°C según establece la norma (UNE EN ISO 16266-2006).

El método de filtración es un método más sensible ya que se filtra más cantidad de muestra y se detectan mejor las bacterias.

La metodología más idónea para el aislamiento bacteriano en muestras de agua es la “filtración por membrana” por presentar una mayor reproducibilidad, rapidez y versatilidad en cuanto a volumen utilizado, respecto a la “técnica de tubos múltiples” (*Eaton et al., 2005*).

Mediante el uso de pinzas previamente flameadas, y en presencia de una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, se coloca el filtro de membrana estéril (Millipore) de 0,45 µm de poro sobre el soporte de filtración (Figura A-VI.a y Figura A-VI.b). Una vez se haya adaptado el embudo (Figura A-VI.c), y tras humedecer el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada al 0,9% de NaCl estéril, se vierte la muestra previamente homogeneizada (Figura A-VI.d). Las muestras comprendidas entre 30 y 100 mL se añaden directamente al embudo de filtración, pero para las muestras entre 1 y 30 mL, se añaden primero al embudo entre 20-30 mL de agua destilada y a continuación, la muestra a filtrar.

Finalmente, se retira el embudo (Figura A-VI.e) y la membrana se transfiere al fondo de una placa de Petri pequeña (45 cm Ø) (Figura A-VI.f).

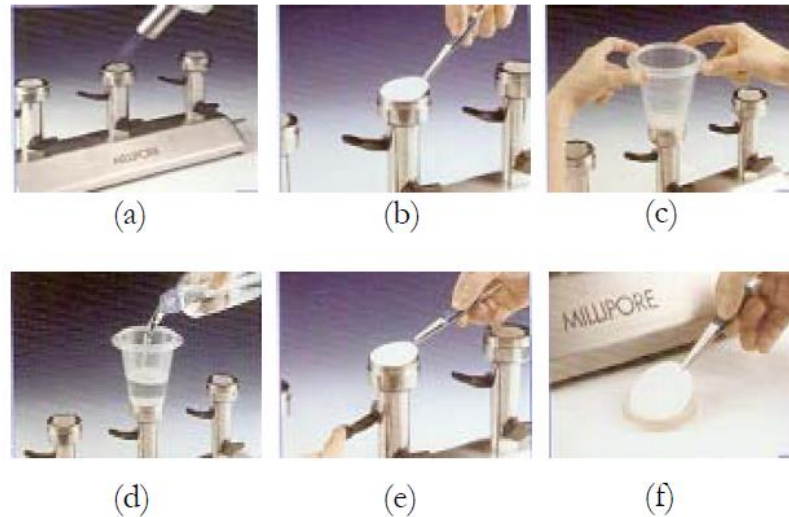


Figura A- VI. Método de filtración por membrana (*Millipore*).

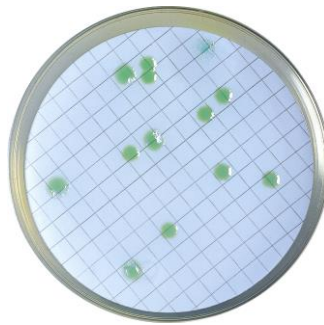


Figura A- VII. Aspecto de colonias de *P.aeruginosa*. Método de filtración de membrana.

Bibliografía

Ibarz C. 2008. Desactivación de enterococos en agua natural mediante fotocatalisis con dióxido de titanio y radiación solar. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

UNE-EN ISO 16266:2006. Calidad del agua. Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa*. Método por filtración en membrana.

Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W., Greenberg A.E., Franson M.A.H. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 Edition. APA-AWWA-WEF. ISBN 08-7553-047-8.

Lanao Maldonado, M. 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus sp.* en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

ANEXO VI. Tratamientos basados en Ozono

VI.1. Descripción detallada de la instalación de ozonización

El ozono se genera "in situ" en el laboratorio mediante un ozonizador Fischer modelo 500. El equipo consta de dos electrodos entre los que se establece un alto voltaje y por los que fluye una corriente de oxígeno puro. En la descarga eléctrica que se produce, se genera oxígeno atómico que al combinarse con el molecular produce una molécula de ozono Figura A- VIII.

La descripción completa de la instalación de ozonización se detalla a continuación y se completa con la Figura A- IX.

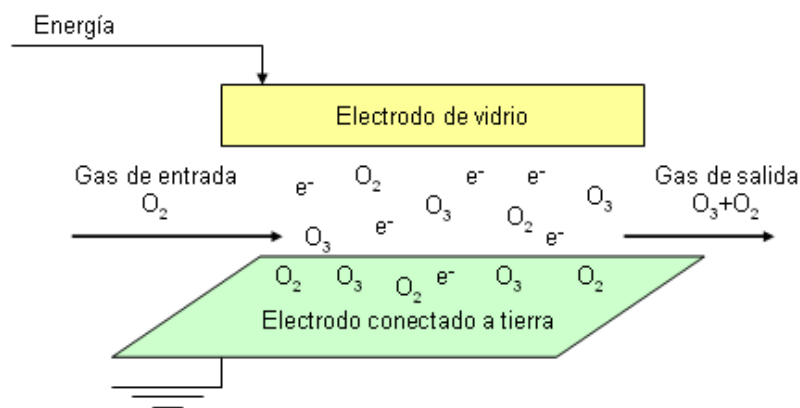


Figura A- VIII. Esquema de generación de ozono mediante descarga eléctrica.

El oxígeno se aporta desde una botella de gas comprimido conectada directamente al ozonizador (1). La generación de ozono aumenta con el caudal de oxígeno introducido, por lo que se regula el flujo mediante una válvula situada en el frontal del equipo. Entre la botella de gas y el ozonizador, se coloca un lecho de sílica gel (2) que debido a sus propiedades higroscópicas elimina la humedad de la corriente de O_2 antes de entrar en el ozonizador (3), ya que el gas de entrada siempre debe estar seco. El ozonizador se conecta a un reactor cerrado de vidrio (4) que funciona en régimen semicontinuo, continuo respecto al gas y discontinuo respecto al líquido. Este reactor es de vidrio Pyrex con forma cilíndrica y una capacidad de 0,750 L. El ozono gas se trasfiere a la muestra por la parte superior del reactor a través de un difusor poroso (O_3 introducido). La transferencia del ozono al agua produce un burbujeo que proporciona agitación a la muestra, favoreciendo el contacto ozono-agua. El ozono introducido se mantiene constante a lo largo de cada experimento.

Como todo el ozono producido no llega a consumirse en la reacción, el exceso debe destruirse (O_3 no consumido). Para ello se conectan en serie al reactor dos borboteadores (5) que contienen una disolución de yoduro potásico al 2%. El ozono reacciona con el yoduro reduciéndose a oxígeno y liberándose a la atmósfera. El experimento debe llevarse a cabo en una campana de extracción ya que el ozono es un elemento tóxico.

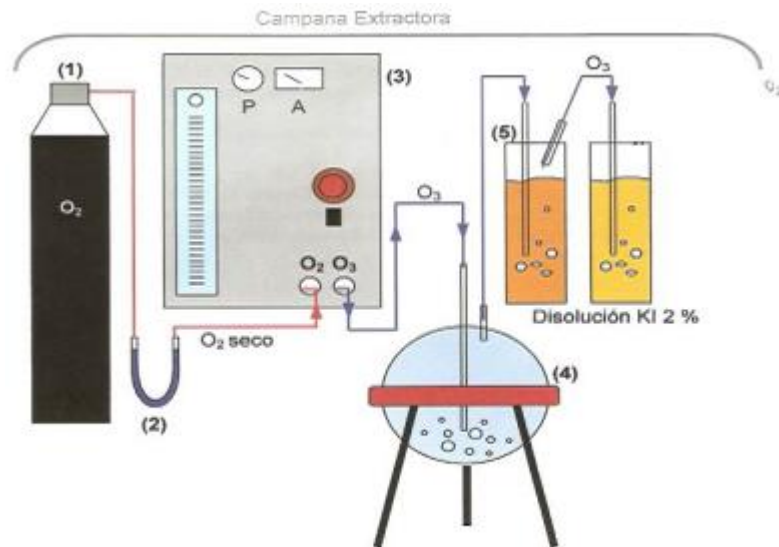


Figura A- IX. Descripción de la instalación de ozonización.

El O_3 consumido por la muestra se define por la [Ecuación XIII]. El ozono residual disuelto en el agua se mide siguiendo la metodología mostrada en el apartado 4.1 del presente proyecto.

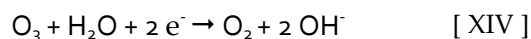
$$O_3 \text{ consumido} = O_3 \text{ introducido} - (O_3 \text{ no consumido} + O_3 \text{ residual disuelto}) \quad [\text{XIII}]$$

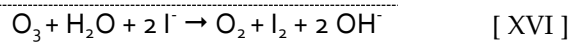
Para determinar la cantidad de ozono que se produce por unidad de oxígeno introducido, se realizan una serie de ensayos con caudales variables de oxígeno y con diferentes intervalos de tiempo, determinándose en cada caso la cantidad de ozono que se genera. Para ello se conectan dos borboteadores en serie directamente a la salida del ozonizador conteniendo cada uno 250 mL de KI al 2%. Durante un tiempo fijado, se hace pasar por el ozonizador un caudal de oxígeno de 50L. La potencia de ozonización utilizada es 1,5 W y la presión de oxígeno aplicada es 1 bar.

VI.2. Calibración del ozonizador

IV.2.1. Método Iodométrico

La cantidad de ozono producida se calcula por el método iodométrico (*Kolthoff y Belcher, 1957*). Este método consiste en tomar muestras de la disolución de KI de los borboteadores para cada uno de los caudales de oxígeno y de los intervalos de tiempo utilizados 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 [Ecuación XIV-Ecuación XVI]:





El procedimiento analítico consiste en la valoración del yodo formado con una disolución de tiosulfato sódico. Se añade 1ml de HCl 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 este momento se añade el indicador de almidón, puesto que si se añadiera a la muestra inicial, en la que la cantidad de yodo es muy superior, se formaría un complejo que impediría valorar el yodo correctamente. Al añadir el almidón, aparece un color morado que virará a incoloro tras haberse alcanzado el punto de equivalencia.

La cantidad de ozono generado, en $mg \cdot h^{-1}$, se calcula según la [Ecuación XVII] donde V es el volumen del agente valorante (tiosulfato sódico) consumido, N es la normalidad del tiosulfato, V' es el volumen de yoduro potásico utilizado en la valoración, t es el tiempo (en minutos) de funcionamiento del ozonizador y 24, el peso equivalente del ozono.

$$mgO_3h^{-1} = V \cdot N \cdot \left(\frac{250}{V'}\right) \cdot 24 \cdot \left(\frac{60}{t}\right) \quad [XVII]$$

Como se trabaja con dos borboteadotes en serie, los $mgO_3 \cdot h^{-1}$ totales son la suma de los $mgO_3 \cdot h^{-1}$ retenidos por cada borboteador.

El agente valorante, tiosulfato sódico, al no ser patrón primario, se debe estandarizar con dicromato potásico para determinar exactamente su concentración (Eaton et al., 2005). Para ello, se toman 80 ml de agua destilada a la que se añaden 1 mL de HCl 1N, 1 g de KI y 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,1N. 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 XVIII]. (Lanao, 2012)

$$N_{Na_2S_2O_3} = \frac{1}{mL Na_2S_2O_3} \quad [XVIII]$$

IV.2.2. Recta de calibrado

En la Figura A- X se representa la curva de calibrado del ozonizador para una un caudal de $50 L \cdot h^{-1}$. Se observa que el valor de R^2 de la recta de ajuste es próximo a 1 por lo que se utiliza la [Ecuación XIX] de la recta de calibrado para el cálculo del ozono generado (introducido).

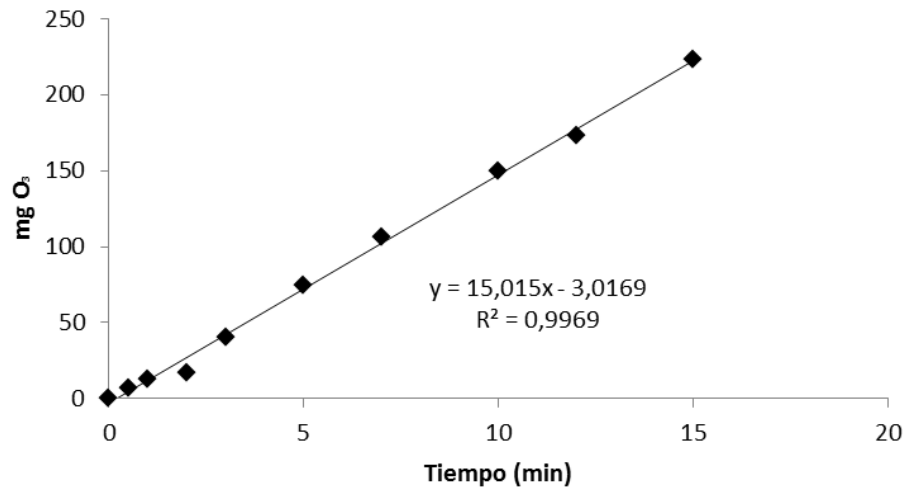


Figura A- X. Curva de calibrado del ozonizador para un caudal de 50 L·h⁻¹. Potencia de ozonización 1,5 W y presión de oxígeno 1 bar.

$$O_3 \text{ generado (mgO}_3) = 15,015 \cdot T(\text{min}) - 3,0169 \quad [\text{XIX}]$$

Bibliografía

Kolthoff I.M y Belcher R.1957. Volumetric Analysis III. Ed New York: Interscience.

Lanao Maldonado, M. 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus sp.* en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

ANEXO VII. Modelos cinéticos de inactivación microbiana

VII.1. 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. Combina conocimientos de diferentes disciplinas (matemáticas, microbiología, ingeniería y química) con el objetivo común de 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 (Gómez, 2005).

Dentro de los tipos modelos matemáticos existentes, este trabajo 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. La modelización cinética nace con la finalidad de simplificar e idealizar fenómenos complejos (Lee y Nam, 2002). Con ella 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, era práctica habitual el empleo de un exceso de desinfectante para cumplir así con los requisitos exigidos de calidad del agua. 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 tratan de representar la acción de un desinfectante y su particular modo de actuación sobre los microorganismos presentes en el agua, bajo las condiciones particulares del sistema que se estudia.

V.1.1. Modelo de Chick-Watson (1908)

Chick (1908) 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 XX] 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.

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad \Leftrightarrow \quad \ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot t \quad [XX]$$

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 XXI], donde C es la concentración del desinfectante y n es el número de moléculas de desinfectante necesarias para la inactivación microbiana o también descrito como coeficiente de dilución, un factor empírico que suele considerarse la unidad. (Pernitsky *et al.*, 1995; Li, 2004)

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot C \cdot N \quad \Rightarrow \quad \text{Ln} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t \quad [\text{XXI}]$$

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 A- XI.

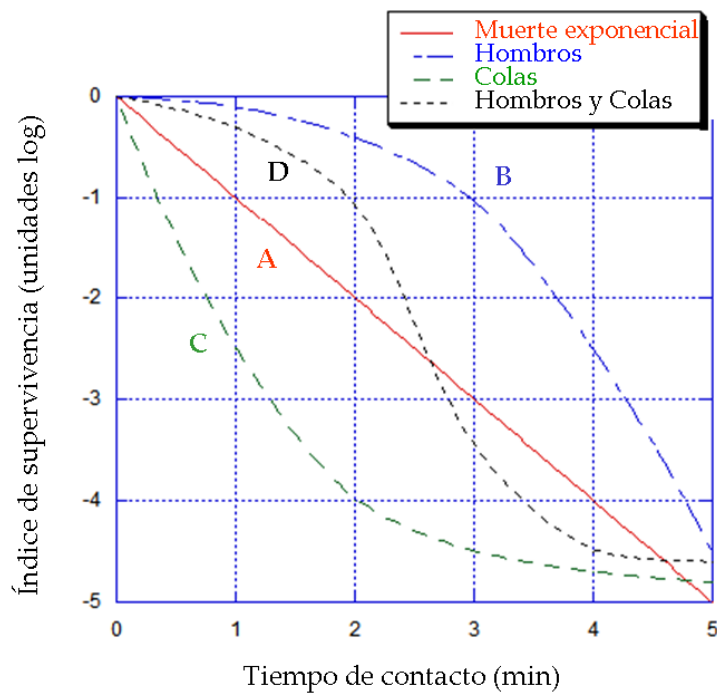


Figura A- XI. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: Gyürék and Finch, 1998).

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). Al igual 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).

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 (Cho et al., 2003; Boyle et al., 2008; Gomes et al., 2009; Azzellino et al., 2011).

La Tabla 12 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. La selección de estos modelos se realiza en base al principio de parsimonia según el cual los modelos han de ser tan simples como sea posible, es decir, con el menor número de parámetros posible (Gómez, 2005). 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.

VI.1.2. 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 XXII], 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 (Li, 2004; Méndez et al., 2008). 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 XXIII], 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 (Haas y Joffe, 1994).

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

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

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

VI.1.3. Modelo de 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 XXIV], 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.

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

VI.1.4. Modelo de Mafart (2002)

Peleg y Cole (1998) proponen el uso de distribuciones estadísticas tipo Weibull para desarrollar modelos que incluyan tanto cinéticas convexas, con un periodo inicial sin aparente inactivación, como cóncavas en las que no se consigue una inactivación completa. La distribución de Weibull es una distribución de probabilidades diseñada para describir el comportamiento de sistemas que tienen cierto grado de variabilidad.

El 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 morir. 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 XXV].

Mafart (2002) modifica la ecuación Weibull según la [Ecuación XXVI], 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.

Este modelo se fundamenta en modelos de inactivación termal, ya utilizado para describir perfiles de desinfección sobre diferentes tipos de microorganismos, fotorreactores y parámetros operacionales en fotocatalisis (Boyle et al., 2008; Gomes et al., 2009).

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

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

VI.1.5. Modelo de Geeraerd

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 (Cerf, 1977; Casolari, 1988; Geeraerd et al., 2000). La incorporación de cada fenómeno se engloba en la [Ecuación XXVII], donde N_{res} es la concentración de bacterias supervivientes, k_{max} es la velocidad específica de inactivación y S_1 es el parámetro que representa la duración del hombro.

$$N_t = (N_0 - N_{res}) e^{-k_{max}t} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot S_1}}{1 + (e^{k_{max} \cdot S_1} - 1) e^{-k_{max}t}} \right) + N_{res} \quad [XXVII]$$

VII.2. Ajuste 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 los mínimos cuadrados (Pernistky et al., 1995; Cho et al., 2003). En la actualidad, muchos programas informáticos estadísticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utiliza la herramienta Solver y la herramienta de GInaFiT del programa Microsoft Excel (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool).

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

El 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 determinada por la [Ecuación XXVIII], donde \tilde{y}_i son los valores estimados \bar{y} es la media de los valores reales (Gómez, 2005).

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

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 XXIX], 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.

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

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 será mayor cuanto más próximos estén los puntos a dicha línea (Gómez, 2005).

En este proyecto de investigación se aplican modelos matemáticos primarios, en los que se describe como varía el recuento de las poblaciones respecto al tiempo. Se aplican ecuaciones matemáticas en los que se describe el cambio de las unidades logarítmicas de inactivación a lo largo del tiempo y bajo unas condiciones determinadas. Se toman como base los modelos matemáticos primarios para describir los secundarios, que describen el comportamiento de los parámetros de los modelos primarios al modificarse las condiciones ambientales, como por ejemplo el pH del agua. Por último, los modelos terciarios integran los modelos primarios y secundarios para hacer predicciones en base a diversos factores medioambientales. A partir de las ecuaciones complejas que se obtiene, se calcula la respuesta de los microorganismos a condiciones diversas, se compara el comportamiento de diferentes microorganismos y se determina las condiciones adecuadas para alcanzar el grado de inactivación deseado.

Bibliografía

Azzellino A., Antonelli M., Canziani R., Malpei F., Marinetti M., Nurizzo C. 2011. Multivariate modelling of disinfection kinetics: A comparison among three different disinfectants. *Desalination and Water Treatment*, 29, 128-139.

Boyle M., Sichel C., Fernández-Ibañez P., Arias-Quiroz B., Iriarte-Puña M., Mercado A., Ubomba-Jaswa E., McGuigan K.G. 2008. Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (10), 2997-3001.

Casolari A. 1988. Microbial death. Physiological models in microbiology. Ed. Boca Raton, 1-44.

Cerf O. 1977. A review: tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 1-19.

Chick H. 1908. An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene*, 8, 92-158.

Cho M., Chung H., Yoon J. 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone- initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 2284-2291.

Geeraerd A.H., Herremans C.H., Van Impe J.F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 185-209.

Gomes A.I., Santos J.C., Vilar V.J.P., Boaventura R.A.R. 2009. Inactivation of bacteria *E.coli* and photodegradation of humic acids using natural sunlight. *Applied Catalysis B: Environmental*, 88, 283-291.

Gómez N. 2005. Modelización de la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Gyürék L.L. y Finch G.R. 1998. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering*, 124 (9), 783-793.

Haas C.N. y Joffe J. 1994. Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom's model for decay. *Environmental Science and Technology*, 28, 1367-1369.

Lee Y. y Nam S. 2002. Reflection on kinetic models to the chlorine disinfection for drinking water production. *The Journal of Microbiology*, 40 (2), 119-124.

Li L. 2004. Effects of initial microbial density on disinfection efficiency in a continuous flow system and validation of disinfection batch kinetics in a continuous flow system. Tesis Doctoral. Universidad de Drexel

Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113.

Malato S., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M.I., Blanco J., Gernjak W. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147, 1-59.

Peleg M. y Cole M.B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 3, 353-380.

Pernitsky D.J., Finch G.R., Huck P.M. 1995. Disinfection kinetics of heterotrophic plate-count bacteria in biologically treated potable water. *Water Research*, 29 (5), 1235-1241.

Pruitt K.M. y Kamau D.N. 1993. Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 221-231.

ANEXO VIII. Estudio económico

La elección de un tratamiento a escala real requiere de un análisis en profundidad del coste económico. En este trabajo se realiza un breve análisis del coste de cada tratamiento considerando tan solo los costes relativos a los agentes desinfectantes utilizados. Para poder comparar los resultados de cada uno de los tratamientos estudiados, se calcula el coste necesario para alcanzar una inactivación de una unidad logarítmica, es decir, un 90% de inactivación (Valero, 2013).

Los tratamientos estudiados en este trabajo de investigación incluyen la ozonización, ozono combinado con peróxido de hidrógeno, ozono combinado con dióxido de titanio y combinación de ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. En el tratamiento de ozonización se considera únicamente el coste del ozono generado. En los tratamientos en los que interviene el peróxido de hidrógeno se incluye el coste éste, con un precio de 0'21 €/kg H₂O₂ al 30% p/v, según la empresa suministradora FCM Foret Zaragoza (Lanao, 2012). Y en los tratamientos de en los que interviene el dióxido de titanio se incluye su coste, con un precio de 1,55 €/kg TiO₂. Para calcular el coste del ozono generado se tiene en cuenta el coste de la electricidad con un valor de 0'1488 €/KWh (www.iberdrola.es) y el consumo de oxígeno, siendo el caudal de oxígeno en el ozonizador de 50 L/h O₂, con un coste de 0'025 €/kg O₂ (Lucas et al., 2010). Además, se asume que el ozonizador consume 12 Wh/g O₃ producido (Lucas et al., 2010) y se tiene en cuenta el caudal de ozono generado, 894 mg/h O₃. Se estima el precio del tratamiento para un volumen de muestra de 1 m³. El cálculo de los costes del ozono generado, del peróxido de hidrógeno y de dióxido de titanio se detalla en las siguientes ecuaciones [Ecuación XXX- Ecuación XXXIV] (Valero, 2013):

$$\text{CosteO}_3 \text{ (€/m}^3\text{)} = \text{CosteO}_2 \text{ (€/m}^3\text{)} + \text{Coste electricidad (€/m}^3\text{)} \quad [\text{XXX}]$$

$$\text{CosteO}_2 \text{ (€/m}^3\text{)} = \frac{\text{Tiempo(min)}}{1\text{L}} \cdot \frac{1000\text{L}}{1\text{m}^3} \cdot \frac{50\text{L O}_2}{60\text{min}} \cdot \frac{0,0013\text{Kg O}_2}{1\text{L O}_2} \cdot \frac{0,025\text{€}}{1\text{Kg O}_2} \quad [\text{XXXI}]$$

$$\text{Coste electricidad (€/m}^3\text{)} = \frac{\text{Tiempo(min)}}{1\text{L}} \cdot \frac{1000\text{L}}{1\text{m}^3} \cdot \frac{0,894\text{g O}_2}{60\text{min}} \cdot \frac{12\text{Wh}}{1\text{gO}_3} \cdot \frac{0,1488\text{€}}{1000\text{Wh}} \quad [\text{XXXII}]$$

$$\text{CosteH}_2\text{O}_2 \text{ (€/m}^3\text{)} = \text{Dosis} \left(\frac{\text{mgH}_2\text{O}_2}{1\text{L}} \right) \cdot \frac{1000\text{L}}{1\text{m}^3} \cdot \frac{1\text{L H}_2\text{O}_2}{3 \cdot 10^5 \text{mg H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{1,1\text{KgH}_2\text{O}_2}{1\text{LH}_2\text{O}_2} \cdot \frac{0,21\text{€H}_2\text{O}_2}{1\text{Kg H}_2\text{O}_2} \quad [\text{XXXIII}]$$

$$\text{CosteTiO}_2 \text{ (€/m}^3\text{)} = \text{Dosis} \left(\frac{\text{gTiO}_2}{1\text{L}} \right) \cdot \frac{1000\text{L}}{1\text{m}^3} \cdot \frac{1\text{Kg TiO}_2}{1000\text{g TiO}_2} \cdot \frac{1,55\text{€ TiO}_2}{1\text{Kg TiO}_2} \quad [\text{XXXIV}]$$

Se utiliza el modelo de Geereard para calcular el tiempo necesario en inactivar una unidad logarítmica en los distintos tratamientos, ya que es este modelo uno de los que se ajusta mejor a los datos experimentalmente obtenidos.

Bibliografía

Lanao Maldonado, M. 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus sp.* en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Lucas M.S., Peres J.A, Puma G.L. "Treatment of winery wastewater by ozone-based oxidation processes (O₃, O₃/UV and O₃/UV/H₂O₂) in a pilot-scale bubble column reactor and process economics". Separation and Purification Technology 72, 235-241, 2010.

Valero Lázaro, P. 2013. Inactivación de *Enterococcus sp.* presentes en aguas de salida de depuradora, mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.

ANEXO IX. Resultados

IX.1.Resultados Físico-químicos

En la Tabla A-V. Tabla resumen de los resultados físico-químicos en los tratamientos estudiados sobre las muestras de agua fortificadas con *P.aeruginosa*.se muestran los resultados físico-químicos obtenidos en los distintos tratamientos realizados.

Tabla A-V. Tabla resumen de los resultados físico-químicos en los tratamientos estudiados sobre las muestras de agua fortificadas con *P.aeruginosa*.

		Condiciones Físico-Químicas			
		pH	Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)(20°C)	Turbidez (U.N.T)	S.S.T ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Ozonización	Iniciales	7,83	544	5,49	9
	Finales	8,38	699	32,5	22
O ₃ /H ₂ O ₂	Iniciales	8,19	656	148	62
	Finales	8,66	754	15	10
O ₃ /TiO ₂	Iniciales	7,85	386	107	73
	Finales	8,67	741	40,2	20
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	Iniciales	7,83	766	76	71
	Finales	8,38	842	63	53

IX.2.Resultados de inactivación

IX.2.1. Ozonización

La Tabla A-VI muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 1 de ozonización.

Tabla A-VI. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N_t (UFC 100mL ⁻¹)	$7,20 \cdot 10^8$	$3,55 \cdot 10^6$	$8,76 \cdot 10^5$	$5,40 \cdot 10^4$	$5,91 \cdot 10^2$	$5,20 \cdot 10^2$	$1,68 \cdot 10^2$
Log(N_t/N_0)	0	-2,31	-2,91	-4,12	-6,09	-6,14	-6,63
mg O ₃ introducido	0	3,00	11,99	72,06	117,10	162,14	222,21
mg O ₃ no consumido	0	1,5	7,5	55,5	90,75	91,5	120,02
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	1,50	4,49	16,56	26,36	70,65	102,19

La Tabla A- VII muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 2 de ozonización.

Tabla A- VII. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N_t (UFC 100mL ⁻¹)	$8,16 \cdot 10^8$	$8,01 \cdot 10^6$	$2,85 \cdot 10^6$	$7,76 \cdot 10^4$	$9,30 \cdot 10^3$	$1,56 \cdot 10^3$	$5,20 \cdot 10^2$
Log(N_t/N_0)	0	-2,01	-2,46	-4,02	-4,94	-5,72	-6,19
mg O ₃ introducido	0	3,00	11,99	72,06	117,10	162,14	222,21
mg O ₃ no consumido	0	2,25	6,75	60	88,5	93	115,26
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	0,75	5,25	12,06	28,60	69,15	106,95

La Figura A- XII muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en el tratamiento de ozonización para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de 3 mgO₃·L⁻¹ en células vegetativas de *C.Perfringens* y *Enterococcus sp.*(Lanao, 2012).

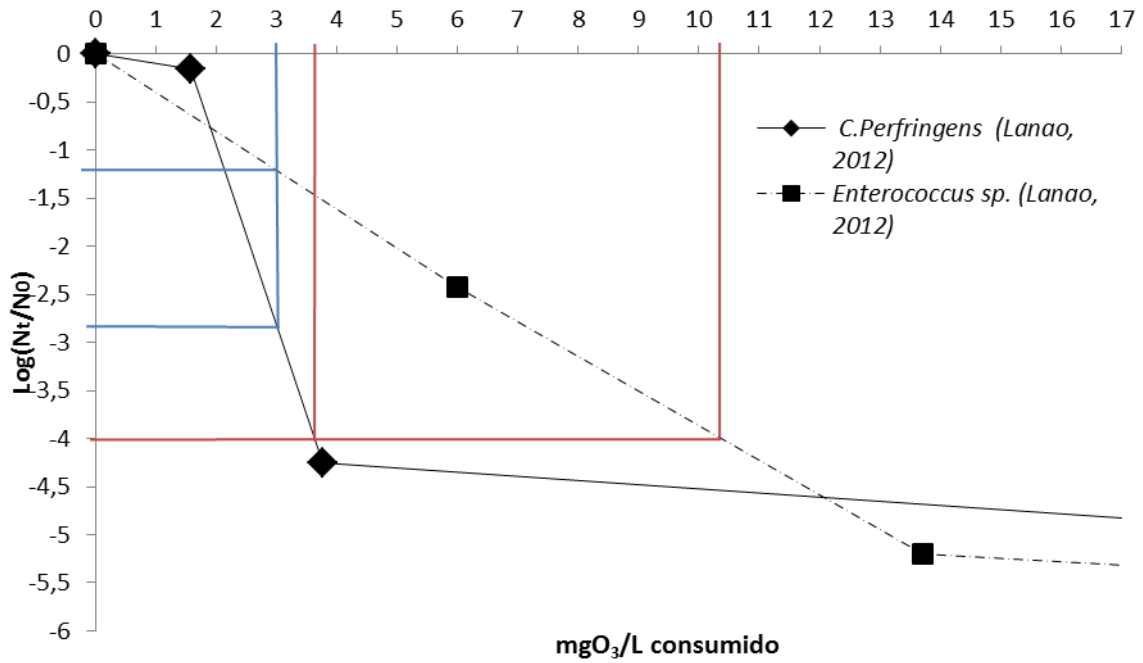


Figura A- XII. Inactivación de *C. Perfringens* y *Enterococcus sp.* tras el tratamiento de ozonización
 N_0 (*C. Perfringens*) $\approx 10^6$ UFC · 100 mL⁻¹, N_0 (*Enterococcus sp.*) $\approx 10^8$ UFC · 100 mL⁻¹.

La Figura A- XIII muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en el tratamiento de ozonización para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de 3 mgO₃·L⁻¹ en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Esteban, 2013).

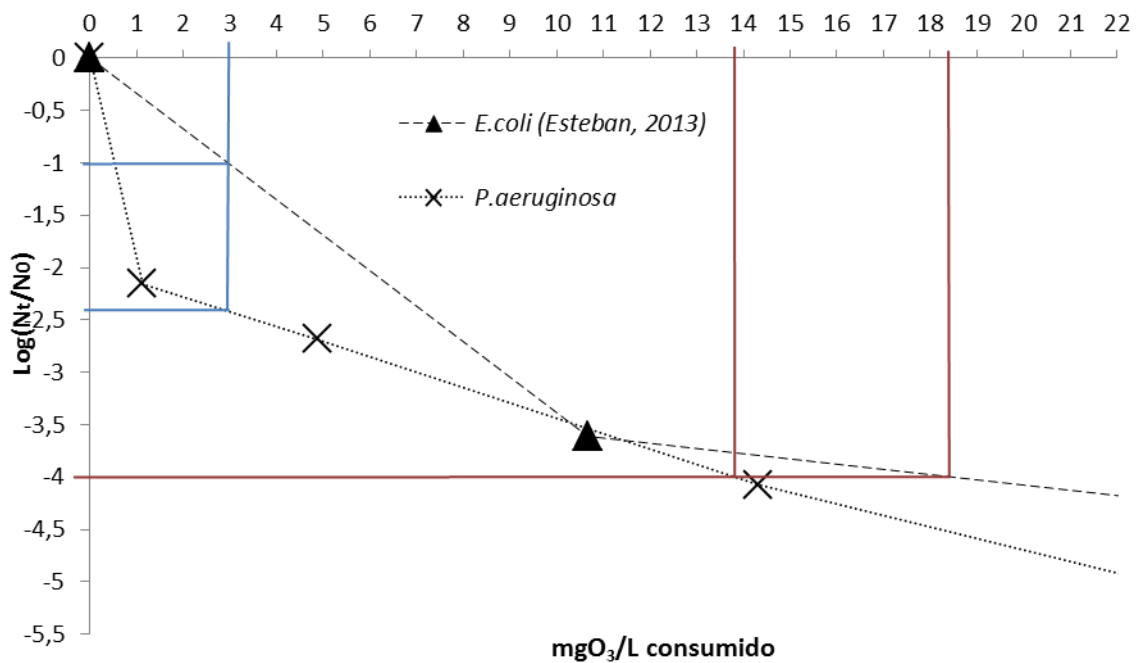


Figura A- XIII. Inactivación de *P. aeruginosa* y *E. coli* tras el tratamiento de ozonización.
 N_0 (*P. aeruginosa*) $\approx 10^9$ UFC · 100 mL⁻¹, N_0 (*E. coli*) $\approx 10^8$ UFC · 100 mL⁻¹.

IX.2.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂)

La Tabla A- VIII muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 1 de ozono combinado con peróxido de hidrógeno.

Tabla A- VIII. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N _t (UFC 100mL ⁻¹)	7,76·10 ⁸	2,30·10 ⁷	1,60·10 ⁷	8,10·10 ⁴	4,70·10 ¹	5,05·10 ¹	2,95·10 ¹
Log(N _t /N ₀)	0	-1,53	-2,17	-3,92	-6,88	-7,04	-7,43
mg O ₃ introducido	0	3,00	11,99	72,06	117,10	162,14	222,21
mg O ₃ no consumido	0	1,5	7,5	60	90	105	151,5
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	1,50	4,50	12,06	27,10	57,15	70,71

La Tabla A- IX muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 1 de ozonización.

Tabla A- IX. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N _t (UFC 100mL ⁻¹)	8,60·10 ⁸	4,01·10 ⁵	2,00·10 ⁵	1,00·10 ⁴	1,14·10 ³	3,22·10 ²	5,00·10 ¹
Log(N _t /N ₀)	0	-3,33	-3,63	-4,93	-5,88	-6,43	-7,23
mg O ₃ introducido	0	3,00	11,99	72,06	117,10	162,14	222,21
mg O ₃ no consumido	0	1,5	6	60	82,5	106,5	150
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	1,50	5,99	12,06	34,60	55,65	72,21

La Figura A- XIV muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de 3 mgO₃·L⁻¹ en células vegetativas de *C.Perfringens* y *Enterococcus sp.* (Lanao, 2012).

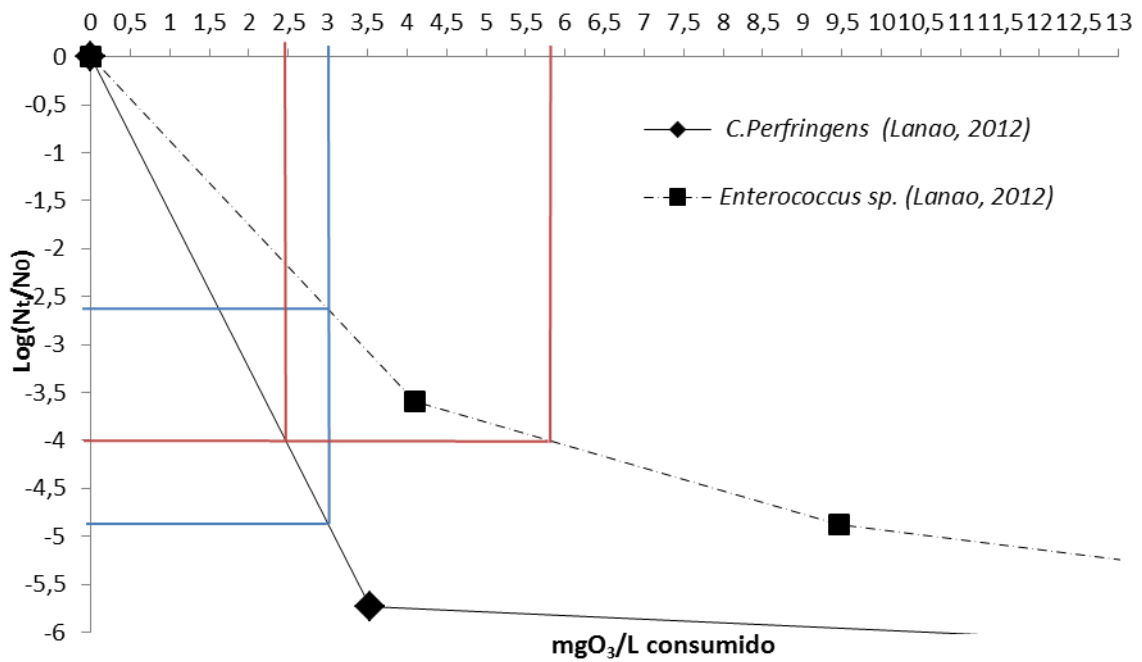


Figura A- XIV. Inactivación de *C. Perfringens* y *Enterococcus sp.* tras el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno. N_0 (*C. Perfringens*) $\approx 10^6$ UFC $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$
 N_0 (*Enterococcus sp.*) $\approx 10^8$ UFC $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,04\text{mM}$.

La Figura A- XV muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de 3 mgO₃·L⁻¹ en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Esteban, 2013).

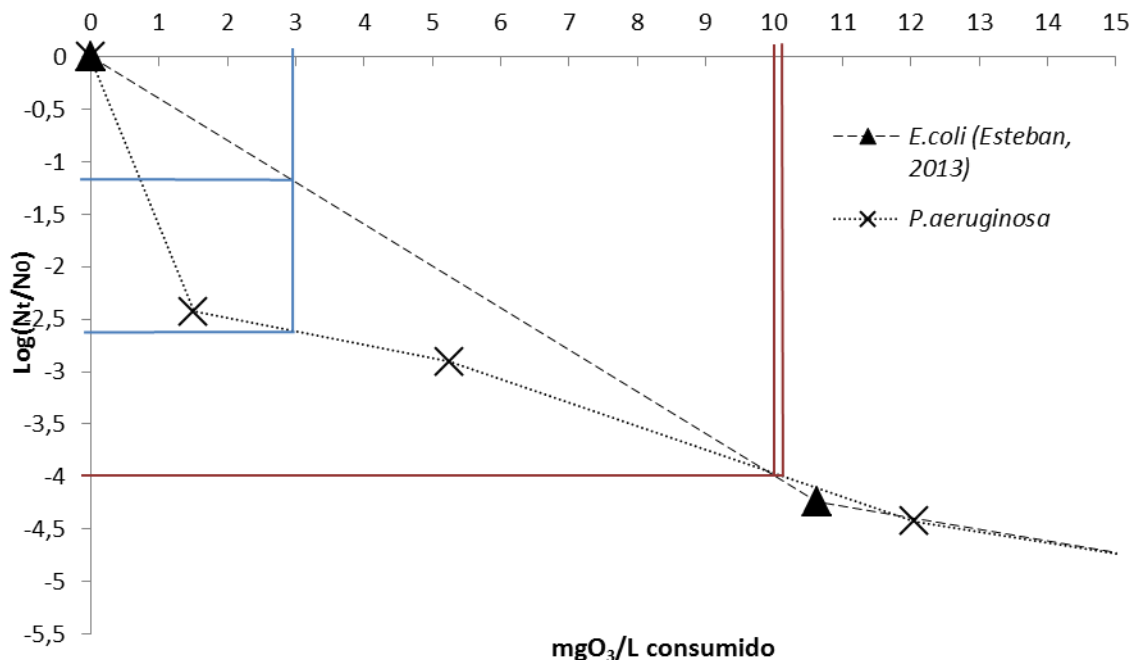


Figura A- XV. Inactivación de *P. aeruginosa* y *E. coli* tras el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno. N_0 (*P. aeruginosa*) $\approx 10^9$ UFC $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, N_0 (*E. coli*) $\approx 10^8$ UFC $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$.
 $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,04\text{mM}$.

IX.2.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O₃/TiO₂).

La Tabla A- X muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 1 de ozono combinado con dióxido de titanio.

Tabla A- X. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N _t (UFC 100mL ⁻¹)	1,40·10 ⁹	6,60·10 ⁷	1,00·10 ⁸	1,51·10 ⁵	2,06·10 ⁴	6,60·10 ³	3,30·10 ²
Log(N _t /N ₀)	0	-0,18	-1,32	-3,57	-3,99	-4,36	-6,63
mg O ₃ introducido	0	3,00	11,99	72,06	117,10	162,14	222,21
mg O ₃ no consumido	0	1,50	6	60	90	103,50	142,50
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	1,50	5,99	12,06	27,10	58,65	79,71

La Tabla A- XI muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 2 de ozono combinado con dióxido de titanio.

Tabla A- XI. Condiciones del tratamiento ozono combinado con dióxido de titanio e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N _t (UFC 100mL ⁻¹)	5,60·10 ⁹	4,20·10 ⁷	1,20·10 ⁷	1,18·10 ⁵	4,70·10 ²	1,00·10 ²	6,00·10 ²
Log(N _t /N ₀)	0	-0,376751	-2,24304	-3,67631	-5,62893	-6,17609	-6,36798
mg O ₃ introducido	0	3,00	11,99	72,06	117,10	162,14	222,21
mg O ₃ no consumido	0	2,25	7,5	54	87	102	139,5
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	0,754115	4,4981	18,0581	30,1031	60,1481	82,7081

La Figura A- XVI muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de 3 mgO₃·L⁻¹ en células vegetativas de *C.Perfringens* y *Enterococcus sp.* (Lanao, 2012).

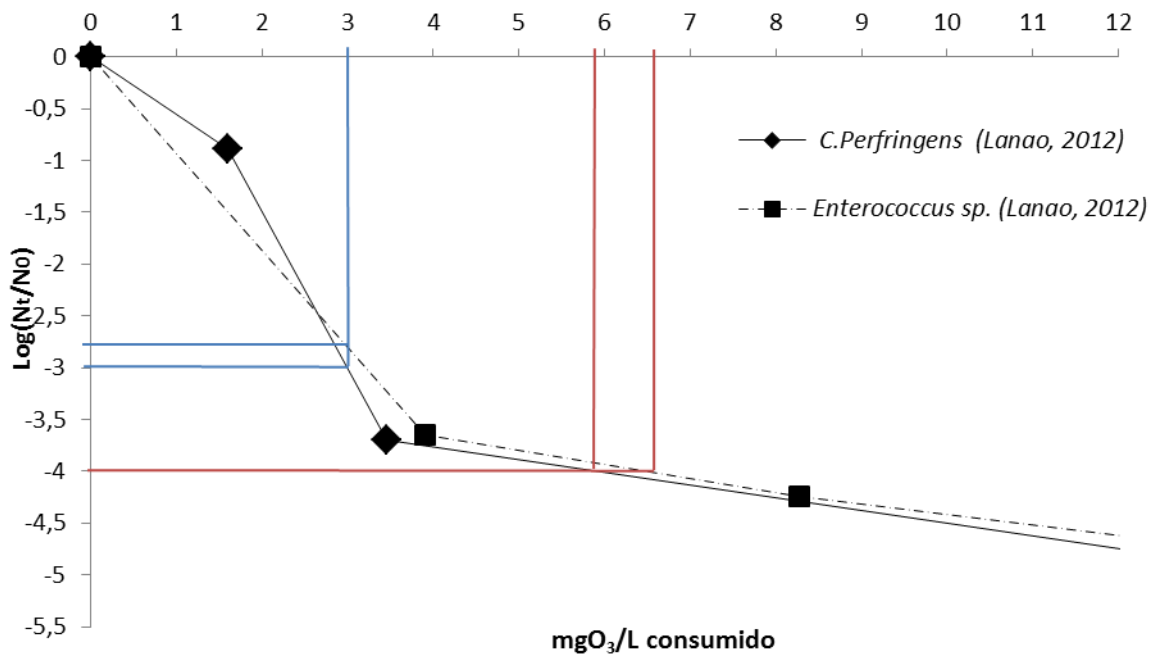


Figura A- XVI. Inactivación de *C. Perfringens* y *Enterococcus sp.* tras el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio . N_0 (*C. Perfringens*) $\approx 10^7$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹, N_0 (*Enterococcus sp.*) $\approx 10^7$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹. [TiO₂]=1 g \cdot L⁻¹.

La Figura A- XVII muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de 3 mgO₃ \cdot L⁻¹ en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Esteban, 2013).

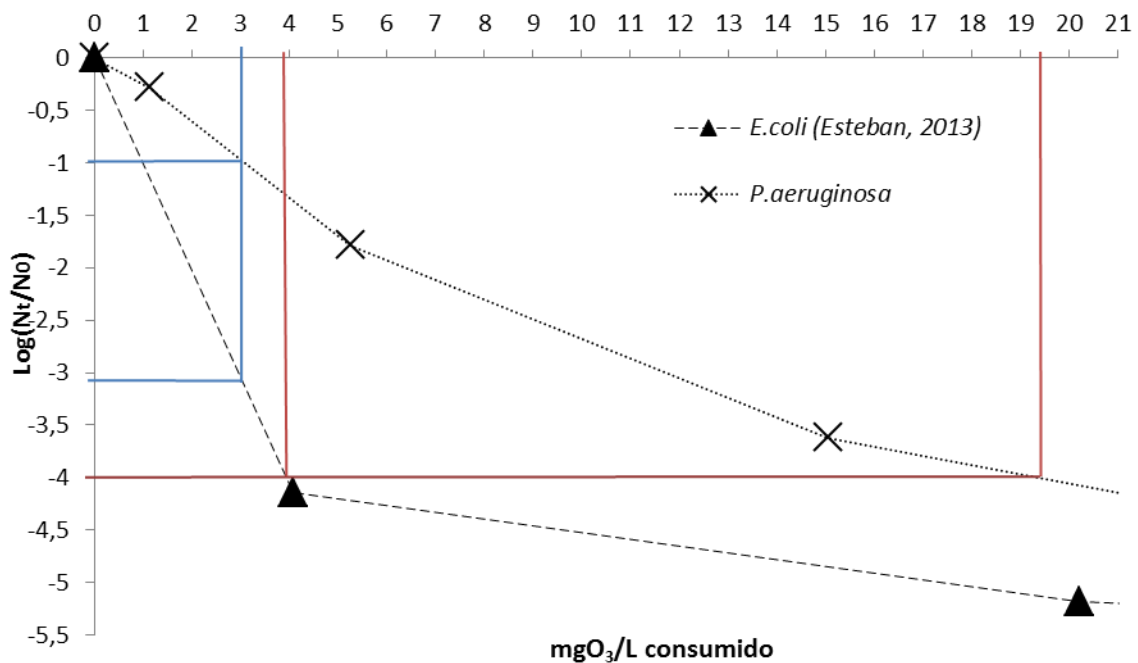


Figura A- XVII. Inactivación de *P. aeruginosa* y *E. coli* tras el tratamiento de ozonización. N_0 (*P. aeruginosa*) $\approx 10^9$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹, N_0 (*E. coli*) $\approx 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL⁻¹. [TiO₂]=1 g \cdot L⁻¹.

IX.2.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$).

La Tabla A- XII muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 1 de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

Tabla A- XII. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N_t (UFC 100mL ⁻¹)	$1,72 \cdot 10^9$	$1,30 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^4$	$2,52 \cdot 10^2$	$7,60 \cdot 10^1$	$1,43 \cdot 10^2$
Log(N_t/N_0)	0	-1,12	-2,70	-4,86	-5,78	-6,97	-7,05
mg O_3 introducido	0	4,07	13,38	75,59	122,25	168,91	231,12
mg O_3 no consumido	0	2,25	7,5	58,5	88,5	105	153
mg $O_3 \cdot L^{-1}$ consumido	0	1,82	5,88	17,09	33,75	63,91	78,12

La Tabla A- XIII muestra los resultados de inactivación y el ozono consumido por la muestra en el tratamiento 2 de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

Tabla A- XIII. Condiciones del tratamiento ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio e inactivación de *P.aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	0,4	1	5	8	11	15
N_t (UFC 100mL ⁻¹)	$1,38 \cdot 10^9$	$9,00 \cdot 10^7$	$1,04 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^4$	$2,00 \cdot 10^2$	$6,15 \cdot 10^1$	$4,75 \cdot 10^1$
Log(N_t/N_0)	0	-1,19	-4,61	-5,03	-5,90	-6,48	-6,67
mg O_3 introducido	0	3,00	11,99	72,06	117,10	162,15	222,21
mg O_3 no consumido	0	1,8	5,25	57	81	112,5	147
mg $O_3 \cdot L^{-1}$ consumido	0	1,20	6,75	15,06	36,10	49,65	75,21

La Figura A- XVIII muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio para una inactivación de 4 unidades logarítmicas y una dosis de ozono de $3 \text{ mgO}_3 \cdot L^{-1}$ en *Enterococcus sp.*, *P.aeruginosa* y *E.coli* (Lanao, 2012 ;Esteban, 2013).

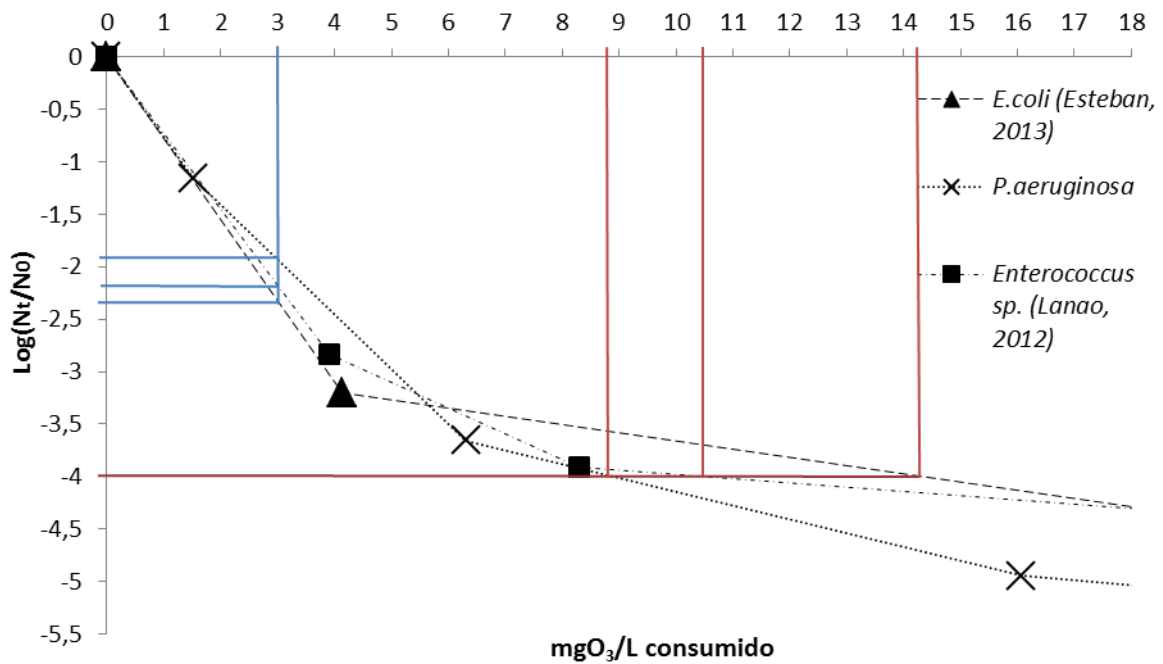


Figura A- XVIII. Inactivación de *P.aeruginosa* y *E.coli* tras el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. N_0 (*Enterococcus sp.*) $\approx 10^7$ UFC · 100 mL⁻¹, N_0 (*P.aeruginosa*) $\approx 10^9$ UFC · 100 mL⁻¹, N_0 (*E.coli*) $\approx 10^8$ UFC · 100 mL⁻¹. [H₂O₂]=0,04mM. [TiO₂]=1 g·L⁻¹.

IX.3.Cinéticas de inactivación

IX.3.1. Ozonización

En la Figura A- XIX se refleja de manera gráfica los ajustes de los modelos aplicados sobre la curva de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización.

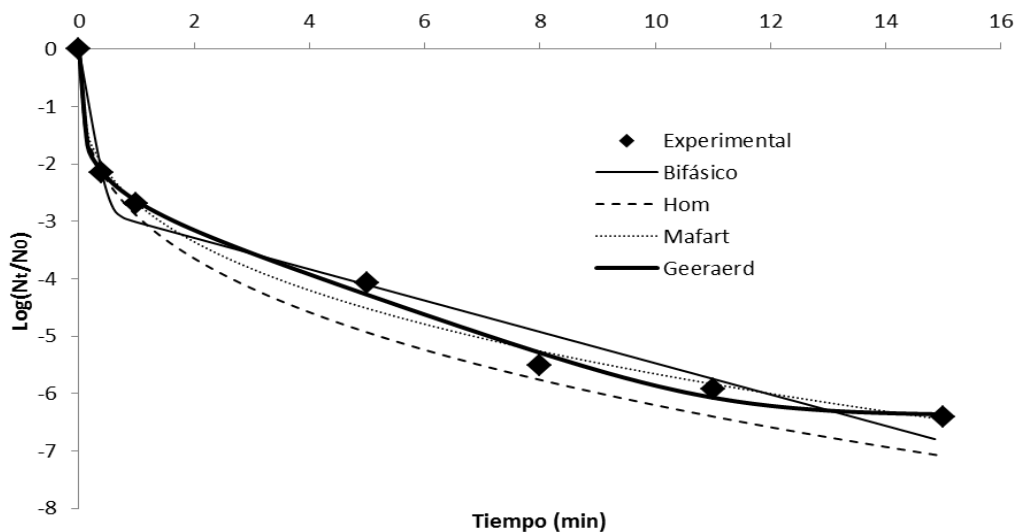


Figura A- XIX. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización.

En las Figuras A-XX, A-XXI, A-XXII, A-XXIII se muestra otra forma de poder observar los ajustes de los modelos aplicados sobre los resultados que se han obtenido

experimentalmente mediante la representación de los valores observados de inactivación y los estimados mediante los modelos cinéticos.

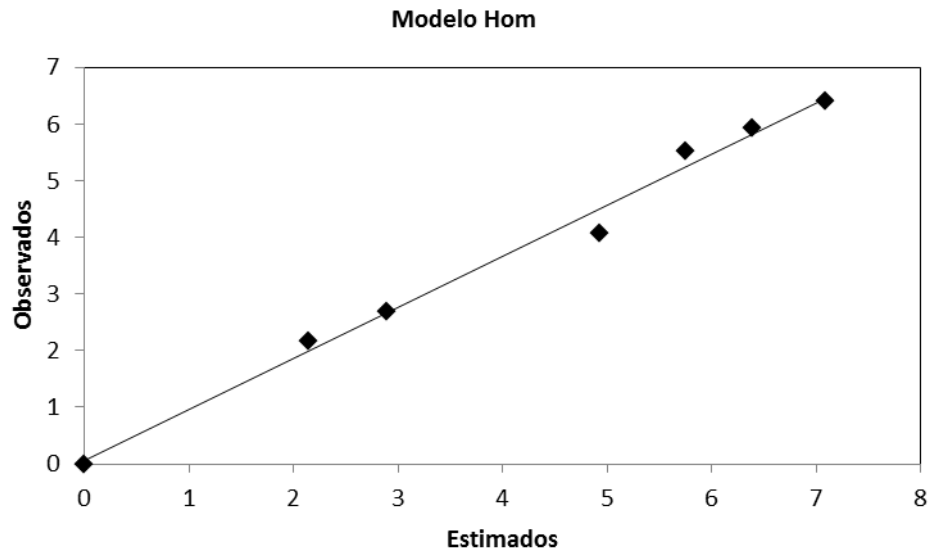


Figura A- XX. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización.

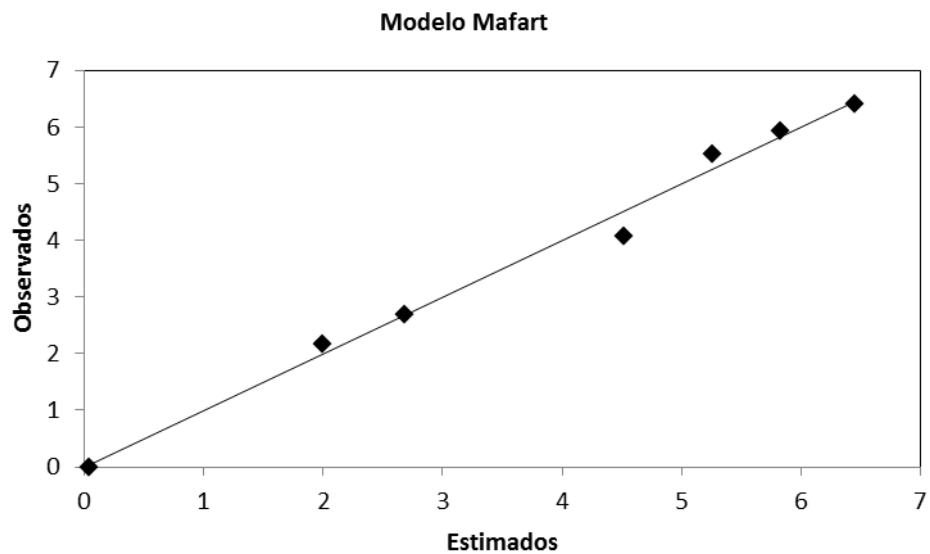


Figura A- XXI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización.

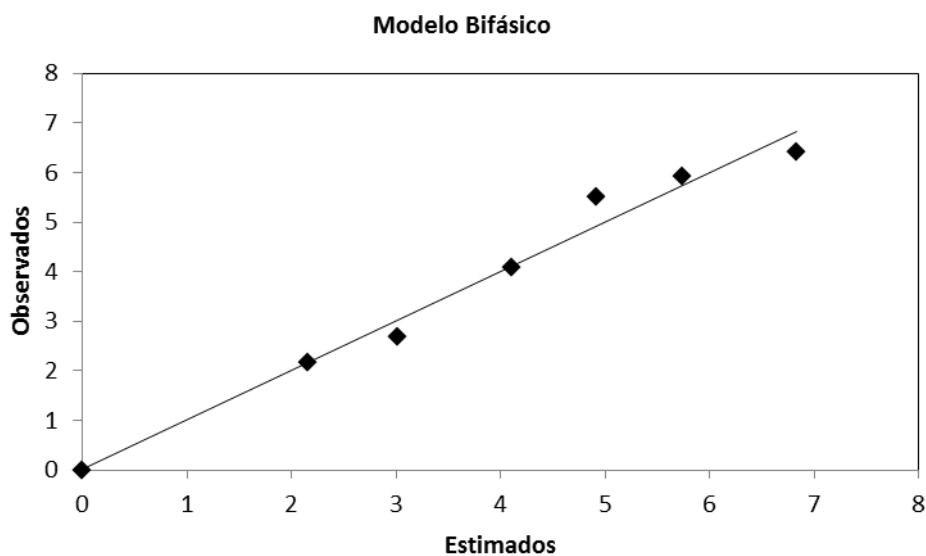


Figura A- XXII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización.

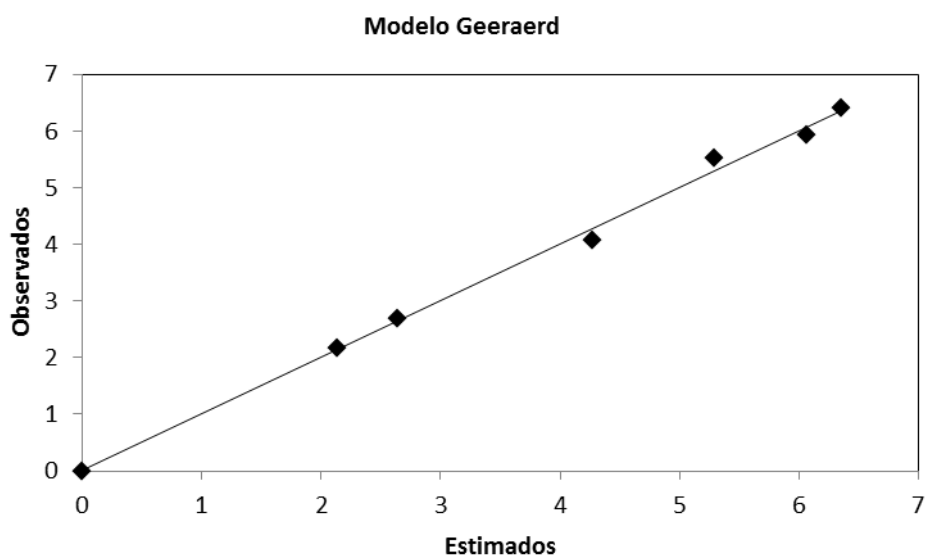


Figura A- XXIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geeraerd aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización.

IX.3.2. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2)

En la Figura A- XXIV se refleja de manera gráfica los ajustes de los modelos aplicados sobre la curva de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno.

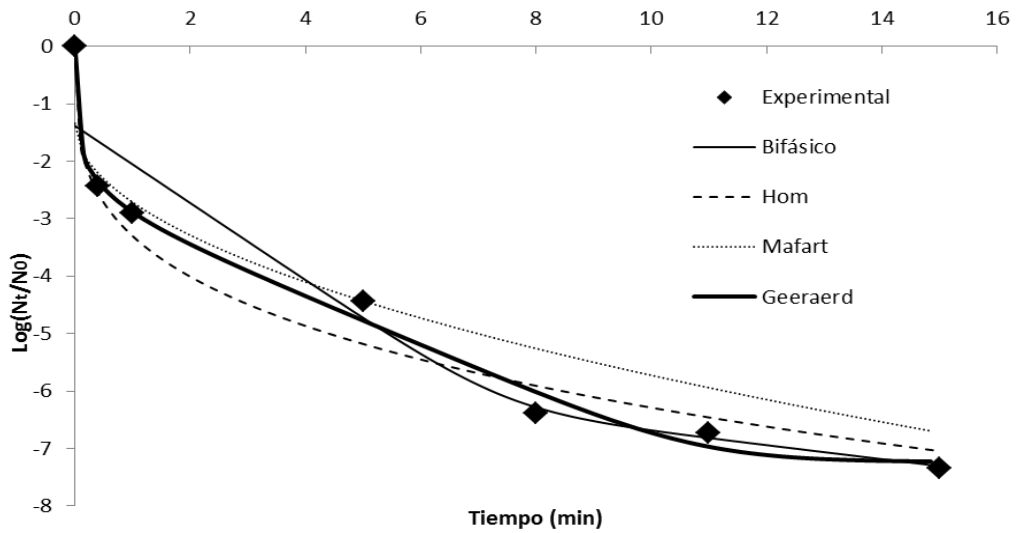


Figura A- XXIV. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno.

En las Figuras A-XXV, A-XXVI, A-XXVII y A-XXVIII se muestra otra forma de poder observar los ajustes de los modelos aplicados sobre los resultados que se han obtenido experimentalmente mediante la representación de los valores observados de inactivación y los estimados mediante los modelos cinéticos obtenidos en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno.

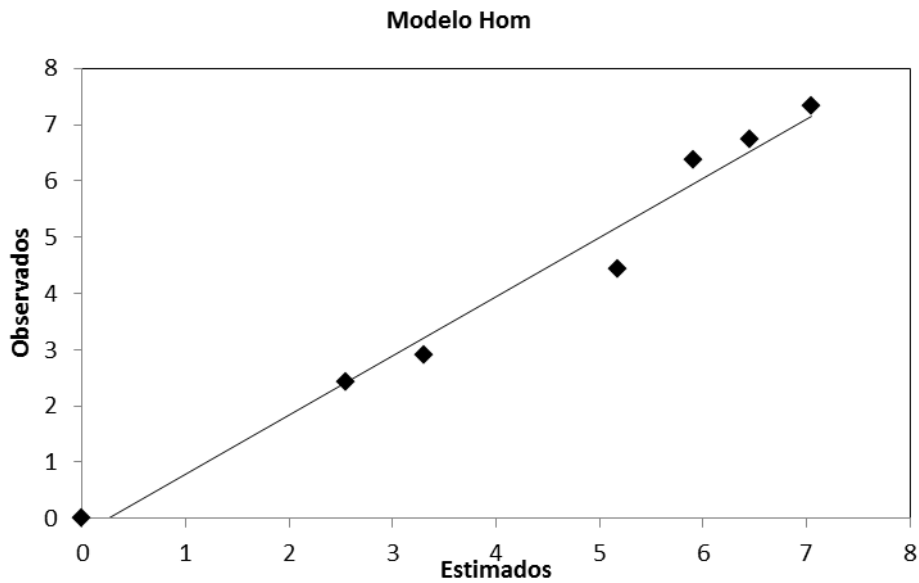


Figura A- XXV. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento con peroxona.

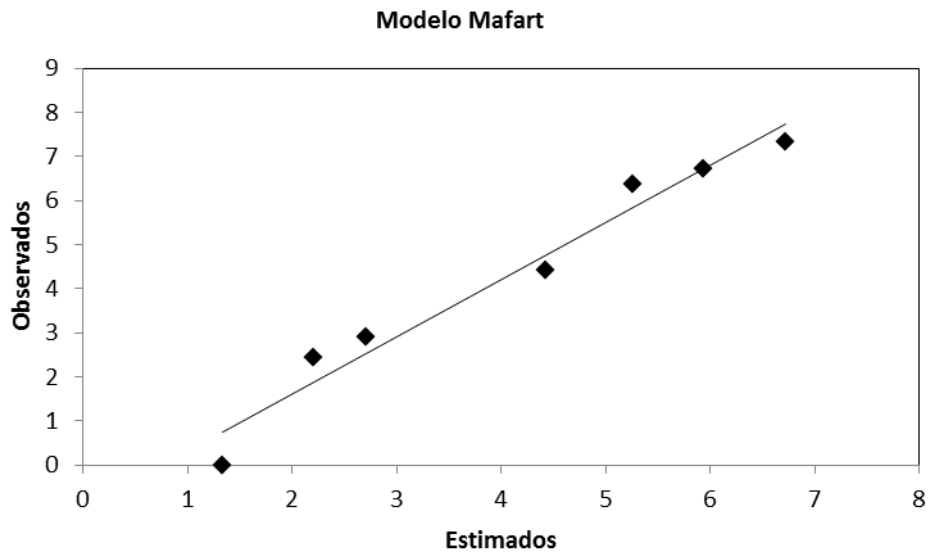


Figura A- XXVI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento con peroxona.

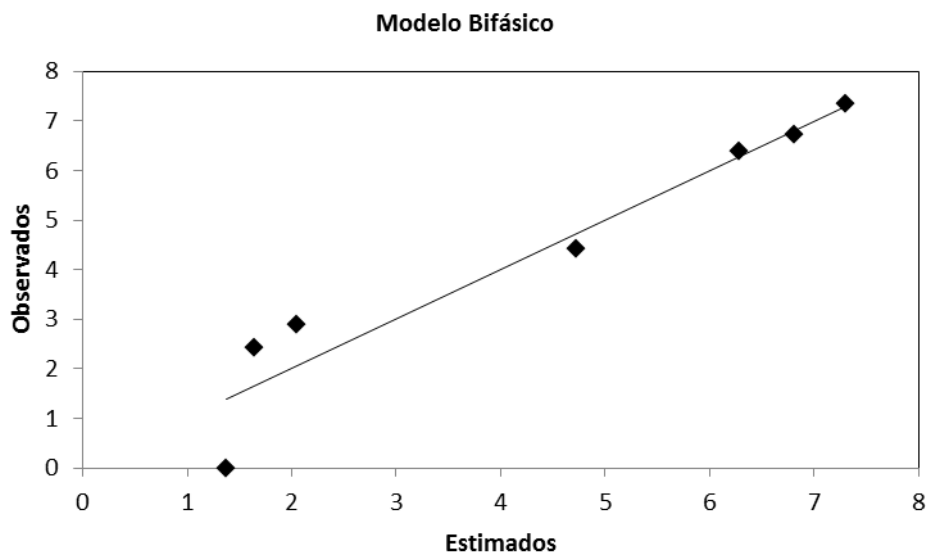


Figura A- XXVII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento con peroxona.

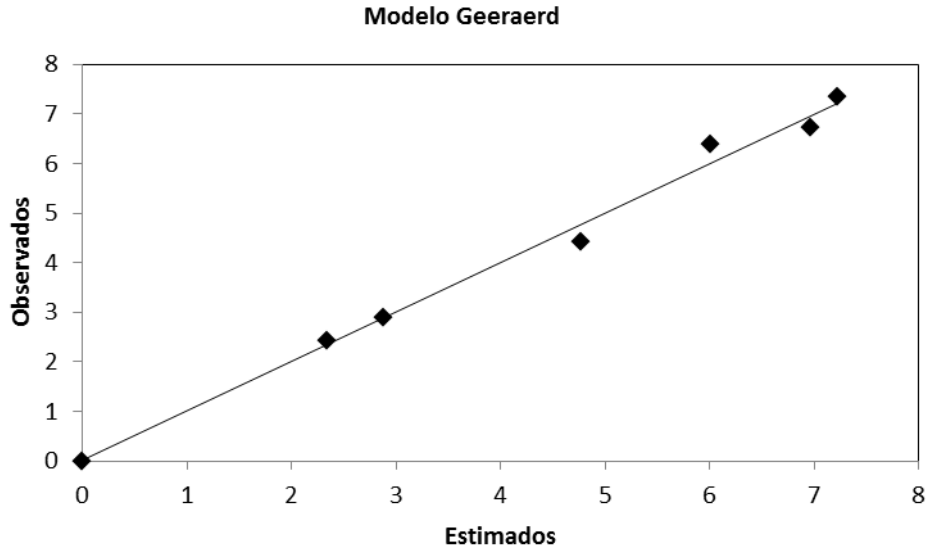


Figura A- XXVIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geereard aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento con peroxona.

IX.3.3. Ozono combinado con dióxido de titanio (O_3/TiO_2)

En la Figura A- XXIX se refleja de manera gráfica los ajustes de los modelos aplicados sobre la curva de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozonización catalítica.

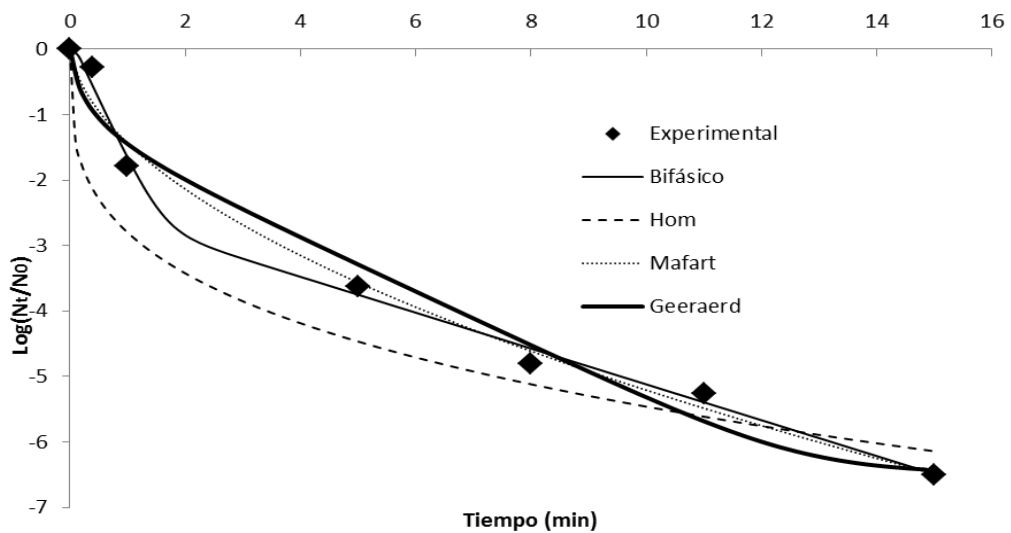


Figura A- XXIX. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

Las Figuras A-XXX, A-XXXI, A-XXXII y A-XXXIII muestran otra forma de poder observar los ajustes de los modelos aplicados sobre los resultados que se han obtenido experimentalmente mediante la representación de los valores observados de inactivación y los estimados mediante los modelos cinéticos.

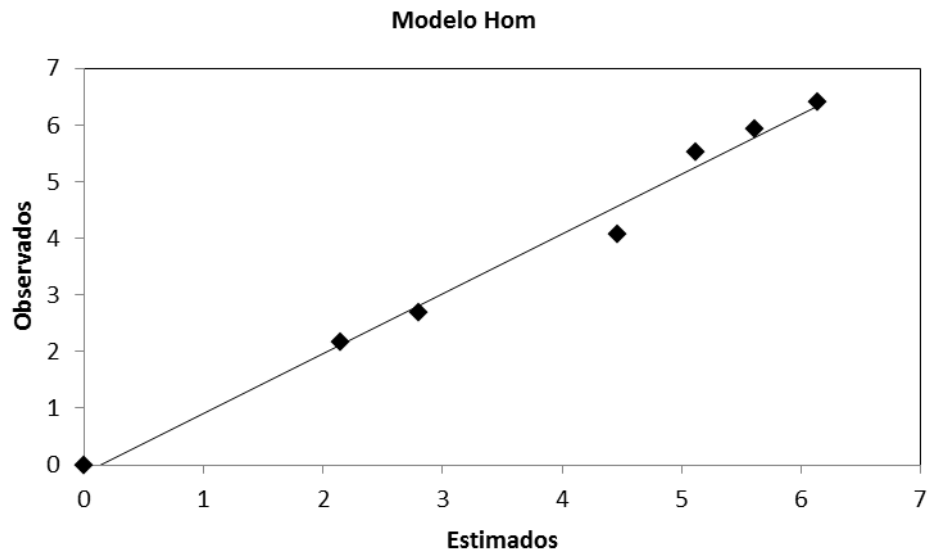


Figura A- XXX. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

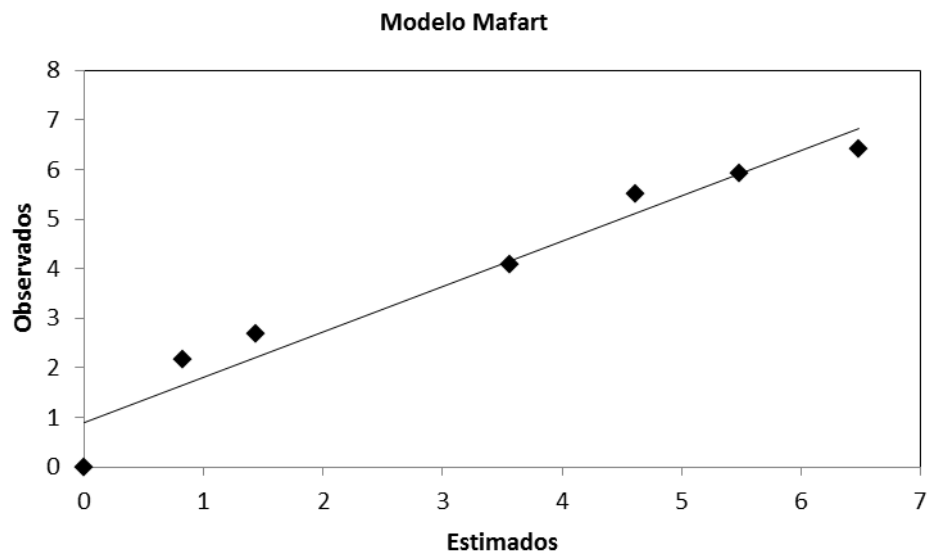


Figura A- XXXI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

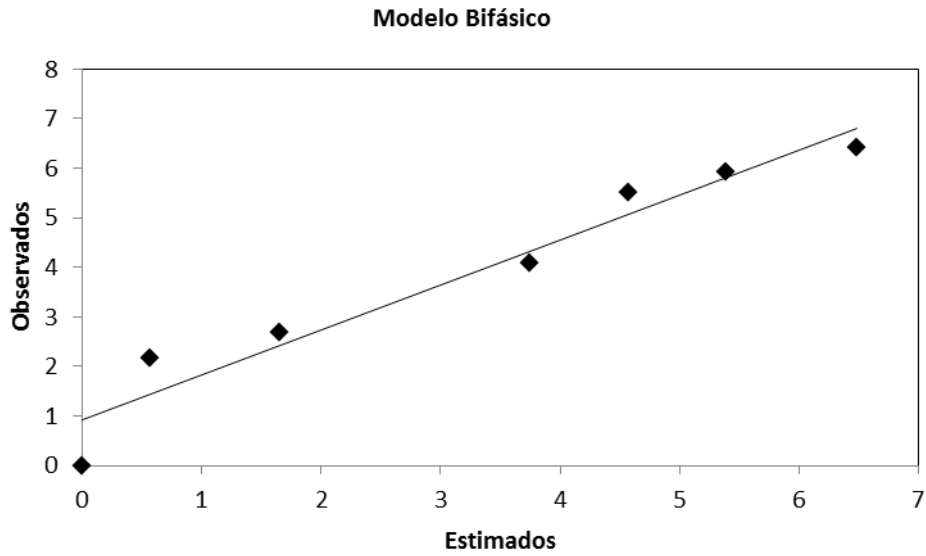


Figura A- XXXII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento ozono combinado con dióxido de titanio.

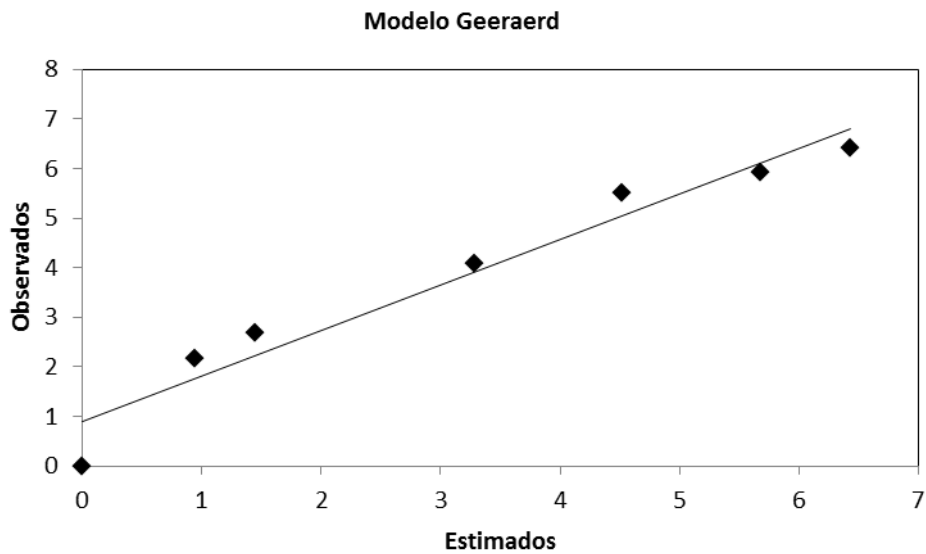


Figura A- XXXIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geereard aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

IX.3.4. Ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$)

En la Figura A- XXXIV se refleja de manera gráfica los ajustes de los modelos aplicados sobre la curva de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

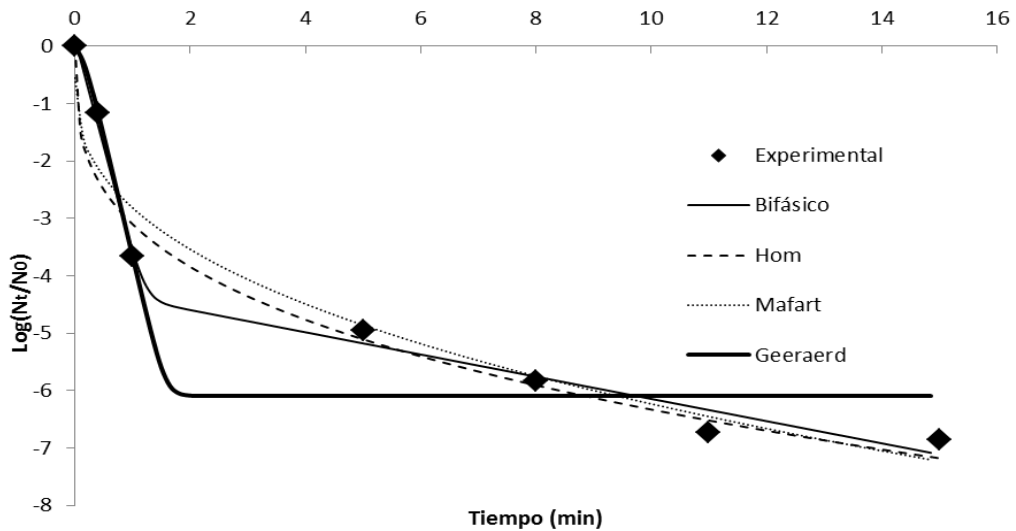


Figura A- XXXIV. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

En las Figuras A-XXXV, A-XXXVI, A-XXXVII y A-XXXVIII se muestra otra forma de poder observar los ajustes de los modelos aplicados sobre los resultados que se han obtenido experimentalmente mediante la representación de los valores observados de inactivación y los estimados mediante los modelos cinéticos.

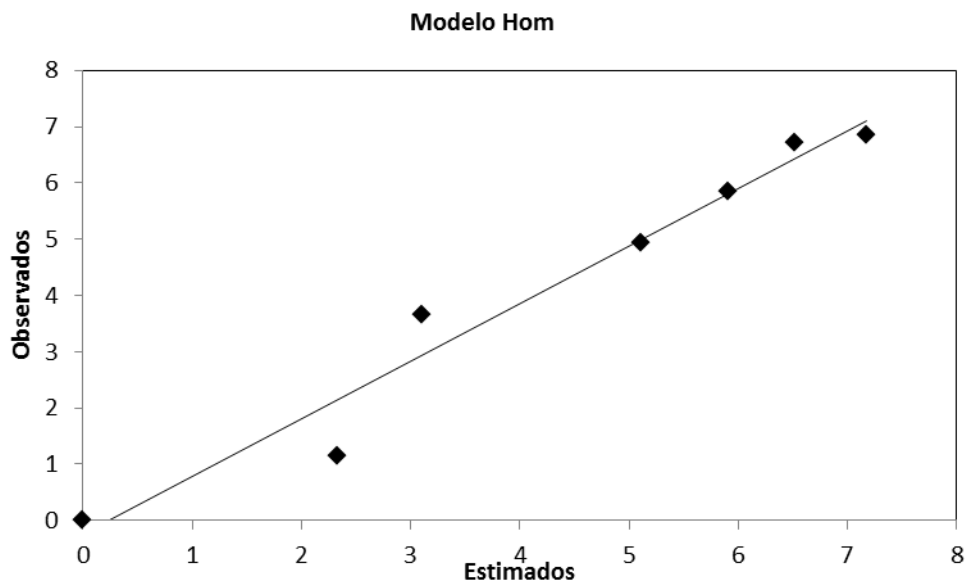


Figura A- XXXV. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Hom aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

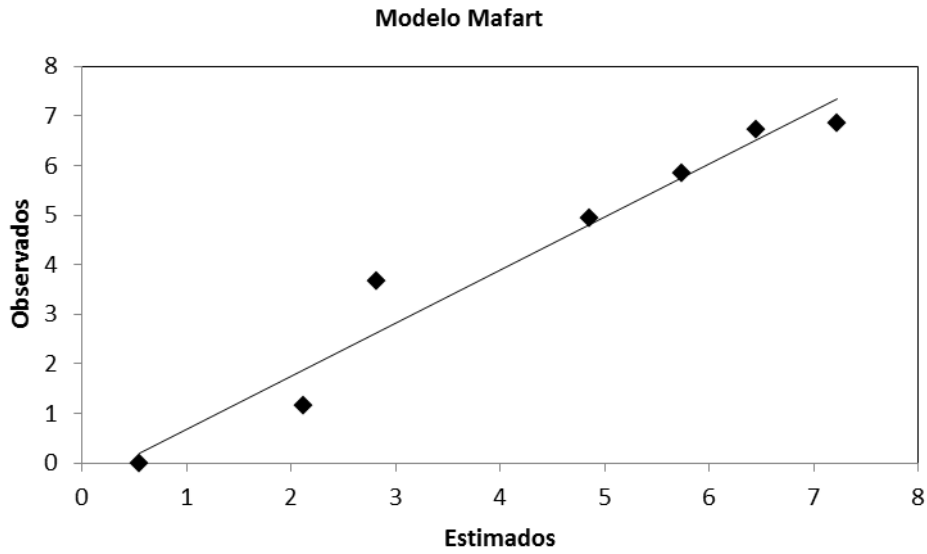


Figura A- XXXVI. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Mafart aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

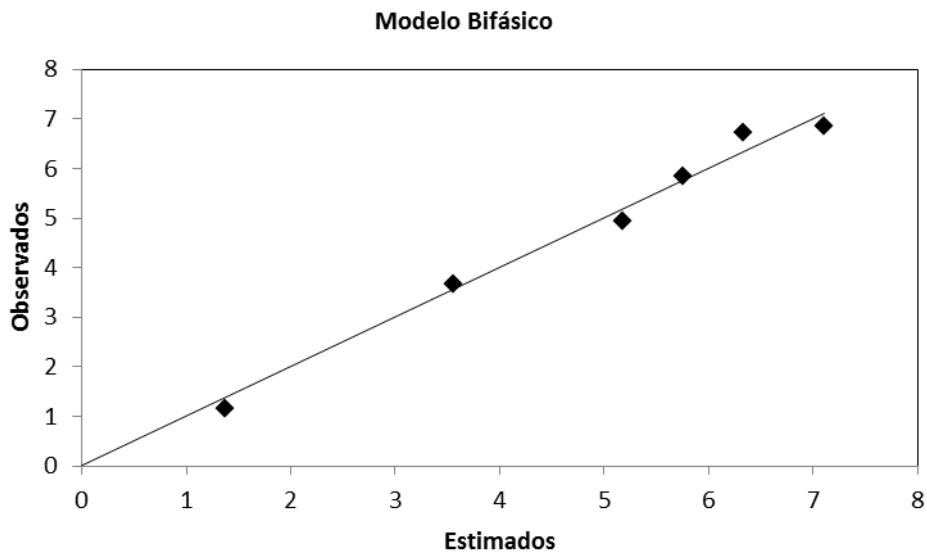


Figura A- XXXVII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo Bifásico aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

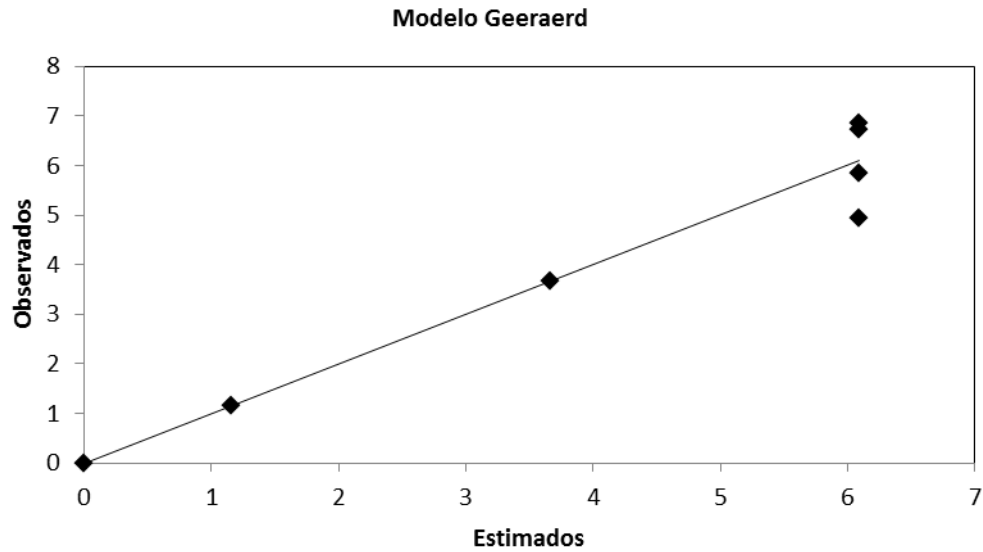


Figura A- XXXVIII. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por el modelo de Geereard aplicados en la inactivación de *P.aeruginosa* en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

Bibliografía

Esteban Finol, J. 2013. Eliminación de *Escherichia coli* en aguas naturales mediante técnicas de oxidación avanzada basadas en ozono, peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. Proyecto final de carrera. Universidad de Zaragoza.

Lanao Maldonado, M. 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus sp.* en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

