

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I. METODOLOGÍA ANALÍTICA FÍSICO-QUÍMICA.....	i
I.I pH	i
I.II Turbidez.....	i
I.III Conductividad	i
I.IV Sólidos en Suspensión Totales (SST)	i
I.V Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	i
I.VI Carbono Orgánico Total (COT)	i
BIBLIOGRAFÍA	ii
ANEXO II. METODOLOGÍA ANALÍTICA MICROBIOLÓGICA	iii
II.I Fortificación de muestras.....	iii
II.II Medios de cultivo	iv
II.III Método de diluciones decimales seriadas	v
II.IV Métodos de siembra	vii
II.IV.I Método de siembra en superficie	vii
II.IV.II Método de filtración por membrana	vii
ANEXO III. CARACTERIZACIÓN DEL TiO_2	ix
III.I Equipos empleados para la caracterización.....	ix
III.II Composición elemental.....	x
III.III Fases cristalinas.....	xi
III.IV Imágenes FESEM	xii
ANEXO IV. MODELIZACIÓN CINÉTICA	xiii
IV.I Descripción de modelos cinéticos.....	xiii
IV.II Ajuste de datos experimentales e índices de error.....	xvi
ANEXO V. RESULTADOS	xviii
V.I Estudio de las variables influyentes en fotocatalisis.....	xviii
V.II Modelización cinética.....	xxiii
V.III Ensayos de reutilización	xxvii

ANEXO I. METODOLOGÍA ANALÍTICA FÍSICO-QUÍMICA

I.I pH

El pH es la medida del grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa y se define como $-\log [H^+]$. La metodología empleada se basa en el método estándar 4500-HB del Standard Methods (Eaton, et al., 2005). Antes de la realización de la medida, el aparato debe ser calibrado con disoluciones tampón de pH 7.00 y 4.01 de la marca CRISON.

I.II Turbidez

La turbidez es la propiedad óptica de una muestra de dispersar o absorber la luz en lugar de transmitirla en línea recta. En otros términos, se define como la reducción de la transparencia de un líquido originada por la presencia de materias sin disolver. La metodología empleada se basa en la norma UNE-EN ISO 7027 (AENOR, 2001). Los turbidímetros constan de una fuente de luz para iluminar la muestra y detectores fotoeléctricos que miden la intensidad de la luz dispersada a 90º respecto a la fuente. Los resultados se expresan en unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

I.III Conductividad

La conductividad es la expresión numérica de la capacidad del agua de transportar corriente eléctrica. Indica la cantidad total de iones en el agua. La metodología empleada se basa en la norma UNE-EN 27888 (AENOR, 1994). Para conocer la conductividad de una muestra se introduce la célula en ella, se agita y se espera unos segundos hasta que se estabiliza el valor. Los resultados se expresan en mS/cm o en μ S/cm, según el rango de trabajo.

I.IV Sólidos en Suspensión Totales (SST)

Este parámetro indica la cantidad de sólidos presentes en suspensión y que pueden ser separados por medios mecánicos. La metodología empleada se basa en el método estándar 2540 D (Eaton et al., 2005). Para medir este parámetro se utiliza un fotómetro multiparámetro Hach Lange DR 2800, que utiliza una longitud de onda de 810 nm.

I.V Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO se define como la cantidad de oxígeno ($\text{mg O}_2/\text{L}$) consumido por las especies reductoras presentes en el agua. La medida corresponde a una estimación de las materias oxidables presentes en el agua, cualquiera que sea su origen, orgánico o mineral. Se basa en la adaptación del método 410.4 de la EPA (EPA, 1993). El método se basa en que los compuestos orgánicos oxidables reducen el ion dicromato (naranja) a ion cromo (III) (verde). Se determina la cantidad de cromo formada, utilizando para ello una lámpara de tungsteno de interferencia de banda estrecha a 420 nm.

I.VI Carbono Orgánico Total (COT)

El Carbono Orgánico Total es un método de medida del contenido en carbono de las sustancias orgánicas disueltas y en suspensión del agua. La metodología empleada se basa en el método estándar 5310-B del Standard Methods (Eaton et al., 2005).

BIBLIOGRAFÍA

Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., & Greenberg, A. E. (2005). *Standard methods for the examination of water & wastewater*. Washington, D.C.: American Public Health Association.

ANEXO II. METODOLOGÍA ANALÍTICA MICROBIOLÓGICA

II.I Fortificación de muestras

La fortificación de las muestras de agua destilada al 0,9 % NaCl se realiza a partir de una cepa congelado a -20°C. Tras descongelarse, se toma un inóculo con el asa de siembra y se realiza un aislamiento en superficie por agotamiento (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) en agar nutritivo (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), incubándose las placas durante el tiempo necesario y a la temperatura indicada para cada bacteria, 48 horas a 37°C para *Enterococcus sp.* y 24 horas a 42°C para *E. coli*.

El objetivo final de esta siembra consiste en obtener un número reducido de bacterias distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa, de forma que tras la incubación cada una de ellas originará una colonia aislada. Normalmente, una colonia aislada es un cultivo puro. El resultado de la siembra se muestra en la Figura II.

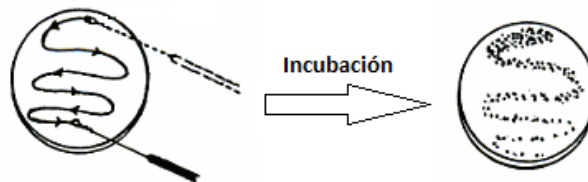


Figura I. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento.

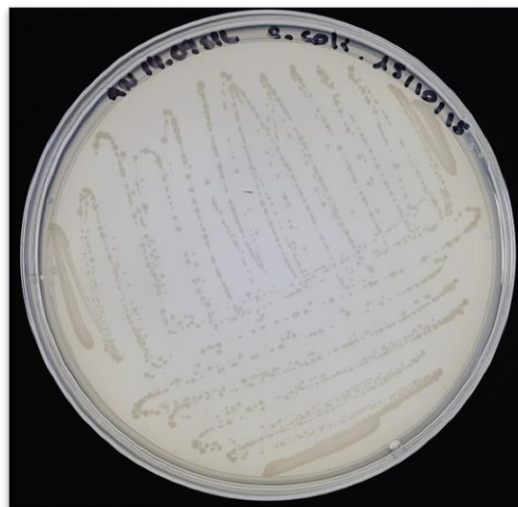


Figura II. Resultado tras la incubación de *Escherichia coli* 24 horas a 42°C.

Tabla I. Composición del agar nutritivo.

Ingredientes	Concentración (g/L)
Extracto de carne	1,0
Extracto de levadura	2,0
Peptona	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar	15,0

El agar nutritivo no es un tipo de agar selectivo, por lo que en él puede crecer cualquier tipo de bacterias. Es importante observar las colonias crecidas tras la incubación para ver si el cultivo es homogéneo.

Tras el periodo de incubación, se prepara una suspensión bacteriana concentrada transfiriendo las colonias a un tubo con agua ultrapura con NaCl 0,9 %. El número de colonias presentes en el inóculo se calcula en relación a la turbidez que presenta esta suspensión. Una vez alcanzada la turbidez deseada, se adiciona la suspensión de la bacteria de estudio a la muestra de agua ultrapura al 0,9 % NaCl que se desea fortificar. En el presente proyecto se preparan muestras fortificadas con *Escherichia coli* o *Enterococcus* sp., en función de la bacteria objeto de estudio del experimento. Las poblaciones bacterianas iniciales para cada uno de los experimentos realizados no son las mismas debido a la dificultad de preparación y calibración de la suspensión celular concentrada.

II.II Medios de cultivo

Los medios de cultivo selectivos son ambientes artificiales que proporcionan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano en el laboratorio y se encuentran en forma deshidratada. En esta investigación se utilizan medios sólidos, que se encuentran en forma de polvo fino o granular.

En primer lugar se adiciona la cantidad de medio adecuada en un litro de agua ultrapura. La mezcla se lleva a ebullición permitiendo la disolución completa del medio en el agua. A continuación, se dispone en botellas con tapón de rosca y se autoclavan a 121 °C y 1 bar de presión durante 15 minutos. Tras el proceso de autoclavado, se dejan enfriar hasta una temperatura de 50 °C y se vierte en placas Petri con un diámetro de 90 mm. Una vez solidificado el agar, las placas están listas para usar.

Para el análisis de *Escherichia coli* se utiliza el agar selectivo MacConkey (Scharlau), cuya composición se muestra en la Tabla II. En este medio, las colonias de *E. coli* presentan un color violeta oscuro característico.

Tabla II. Composición de agar MacConkey.

Ingredientes	Concentración (g/L)
Peptonas	20,000
Lactosa	10,000
Sales biliares	1,500
Cloruro de sodio	5,000
Rojo neutro	0,030
Cristal violeta	0,001
Agar	15,000

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

Tabla III. Composición de agar Slanetz & Bartley.

Ingredientes	Concentración (g/L)
Triptosa	20,0
Extracto de levadura	5,0
Dextrosa	2,0
Hidrogenofosfato de potasio	4,0
Azida de sodio (NaN ₃)	0,4
Agar	10

II.III Método de diluciones decimales seriadas

Debido a que no se conoce con antelación la concentración microbiológica presente en las muestras de agua a analizar, se realizan diluciones en serie de la muestra inicial con el fin de que el número de unidades formadoras de colonias por placa esté en el rango entre **30 y 300**. Una dilución en serie es la reducción progresiva, paso a paso, de la concentración de una sustancia en disolución.

A partir de la muestra a analizar (dilución 0), se toma 1 mL con micropipeta y se transfiere a un tubo con 9 mL de agua ultrapura al 0,9 % NaCl (suero fisiológico), 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 ultrapura al 0,9 % NaCl, todo ello en ambiente de trabajo estéril, proporcionado por un mechero Bunsen. La Figura III muestra el procedimiento de diluciones decimales seriadas de manera gráfica.

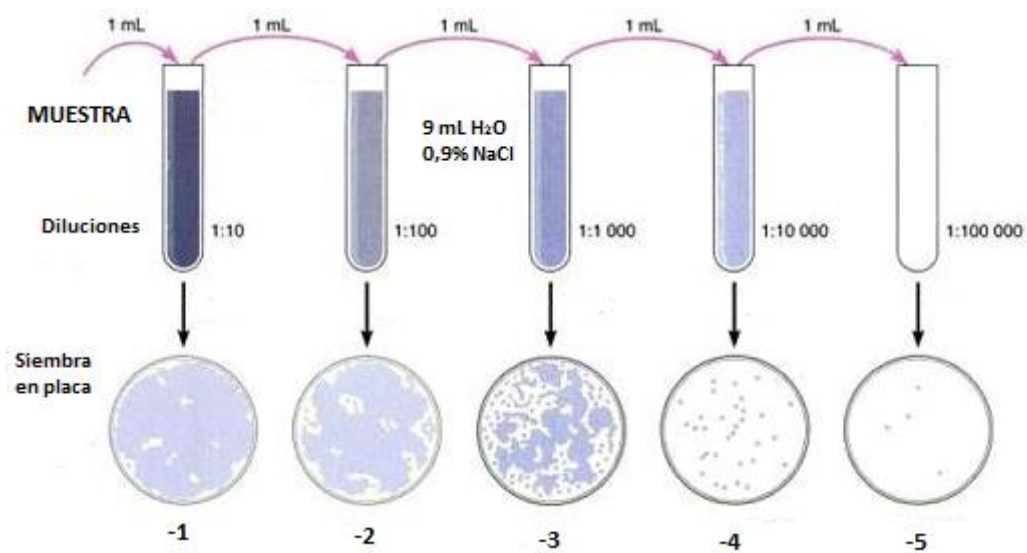


Figura III. Esquema del método de diluciones seriadas.

II.IV Métodos de siembra

II.IV.I Método de siembra en superficie

En presencia de atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, se pipetea sobre la superficie del agar dispuesto en la placa el volumen de muestra o de dilución deseado (100 μ L) en el centro de una placa Petri (90 mm $\varnothing$) que contiene medio de cultivo sólido (Figura IV a)). Con ayuda de una varilla de vidrio estéril se extiende la muestra de forma homogénea por la superficie del agar (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), a la vez que se va rotando la placa (Figura IV b)), hasta que el inóculo se ha absorbido completamente en el medio (Eaton et al., 2005).

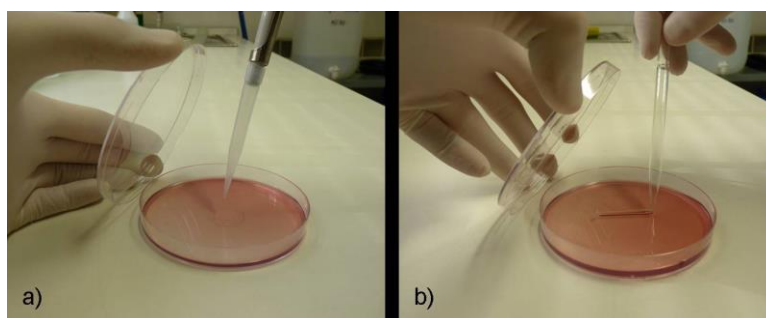


Figura IV. Método de siembra en superficie.

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 apropiada para el recuento final.

II.IV.II Método de filtración por membrana

En presencia de atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen con el que se esteriliza el equipo de filtración (Figura V a)), mediante pinzas previamente flameadas, se coloca un filtro de membrana estéril (Millipore) de 0,45 μ m de poro sobre el soporte de filtración (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** b)). Tras adaptar el embudo (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** c)), se humedece el filtro con una pequeña cantidad de agua ultrapura al 0,9 % NaCl estéril y se vierte un volumen conocido de la muestra, previamente homogeneizada (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** d) y e)). 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 entre 20-30 mL de agua ultrapura al 0,9 % NaCl estéril al embudo y a continuación la muestra a filtrar.

Finalmente, se retira el embudo y la membrana se coloca sobre el agar solidificado en una placa Petri con diámetro de 45 mm (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** f)), cuidando que no quede ninguna burbuja debajo del filtro. Este método se utiliza cuando la concentración de bacterias en la muestra no es muy elevada.

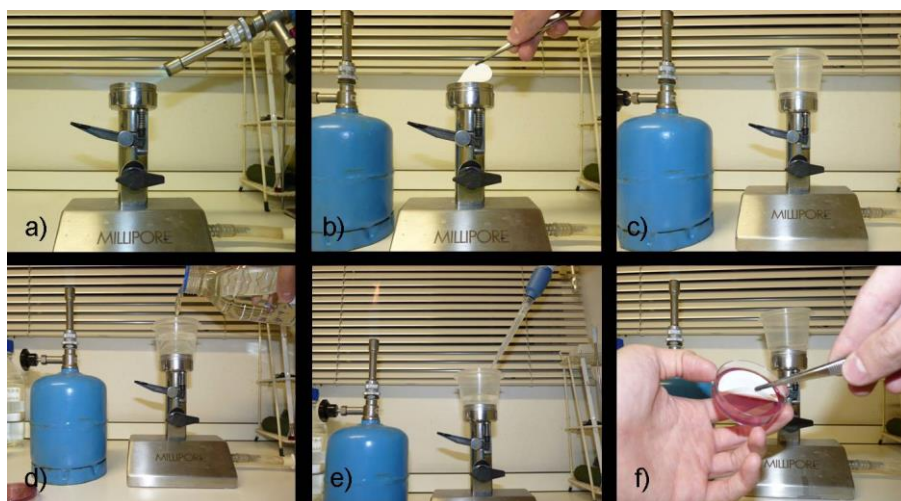


Figura V. Método de filtración en membrana.

BIBLIOGRAFÍA

Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., & Greenberg, A. E. (2005). *Standard methods for the examination of water & wastewater*. Washington, D.C.: American Public Health Association.

ANEXO III. CARACTERIZACIÓN DEL TiO_2

III.1 Equipos empleados para la caracterización

Las medidas de difracción y fluorescencia de rayos X se han realizado en el Servicio de Difracción de Rayos X y Análisis por Fluorescencia, y las de microscopía electrónica (FESEM) en el Servicio de Microscopia Electrónica de Materiales, pertenecientes ambos al Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

III.1.1 Difracción de Rayos X

La técnica de difracción de rayos X de muestras en polvo permite determinar los compuestos cristalinos presentes en una muestra y en el caso de nuevos compuestos se puede estudiar y determinar su estructura. También se pueden estudiar cambios estructurales en función de la temperatura.

Los datos se han recogido con un difractómetro marca RIGAKU, modelo D/max 2500 provisto de un ánodo rotante. El difractómetro funciona a 40Kv y 80 mA con un ánodo de cobre (Cu) y se utiliza un monocromador de grafito para seleccionar la radiación CuKalfa. Las condiciones de medida son 2θ 10 a 80 $\text{step}=0.03$ $t=1\text{s/step}$. La determinación y cuantificación de fases se ha realizado con el programa MDI-Jade7 y la base de datos JCPDS-International Centre for Diffraction Data- 2000.

III.1.2 Fluorescencia de Rayos X

El análisis elemental por fluorescencia de rayos X permite determinar los elementos presentes en la muestra. Se puede realizar tanto en muestras sólidas (pastilla, polvo, lámina etc...) como líquidas y de una manera cualitativa o cuantitativa.

Para el análisis semicuantitativo de fluorescencia de rayos X se ha utilizado un espectrómetro secuencial de Fluorescencia de rayos X de *ThermoElectron*, serie ARL, modelo ADVANT'XP. El espectrómetro está equipado con un tubo de rayos X con ventana frontal de berilio (Be) y ánodo de rodio (Rh). La muestra se ha medido en polvo en atmósfera de helio (He). Se ha utilizado el programa "UNIQUANT" de *ThermoScientific*, que permite obtener un análisis semicuantitativo de los elementos comprendidos entre el sodio (Na) y el uranio (U).

III.1.3 Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)

La microscopía electrónica de barrido de emisión de campo permite la observación y caracterización de materiales por espectrometría de energía dispersiva de RX de alta resolución. Es una herramienta que posibilita realizar análisis químicos cuantitativos y cualitativos y además crea imágenes de tres dimensiones utilizando electrones en lugar de ondas ligeras (cortas).

El equipo utilizado es microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) Carl Zeiss MERLIN™ (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), que tiene las siguientes características:

- Cañón de emisión de electrones por emisión de campo de punta caliente.

- Permite observaciones de hasta 0.8nm de resolución espacial.
- Voltajes de aceleración entre 0.02 y 30 kV.
- Detectores de electrones secundarios y retrodispersados en la cámara y en la columna (in-lens).
- Detector EDS para Análisis de la Energía de los Rayos X dispersados INCA 350 de Oxford Instruments con resolución en energía de 127 eV a 5.9 KeV.
- Detector EBSD (Electron Back Scatter Diffraction) para el registro y análisis de diagramas de Difracción de electrones retrodispersados y mapas de orientación cristalográfica.
- Detector STEM.
- Sistema de compensación de carga por inyección de nitrógeno. Este sistema permite la observación de muestras aislantes sin recubrir utilizando detectores de electrones de alto vacío.

Sistema de limpieza por plasma (“plasma cleaner”) y por inyección de oxígeno.



Figura VI. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM).

III.II Composición elemental

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra la composición elemental del dióxido de titanio analizado, TiO₂ Levenger.

Tabla IV. Composición elemental del dióxido de titanio utilizado.

% Peso	Levenger	
	Fluorescencia	FESEM
Ti	50,82	42,22
O	38,64	53,63
Zn	4,43	3,91
Ca	2,05	0,05
S	1,03	0,02
Si	0,64	-
Na	0,70	-
Mg	0,19	-
Al	0,17	-
Cu	-	0.17
Otros	1,33	-

III.III Fases cristalinas

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra el difractograma de rayos X de una muestra de TiO_2 Levenger.

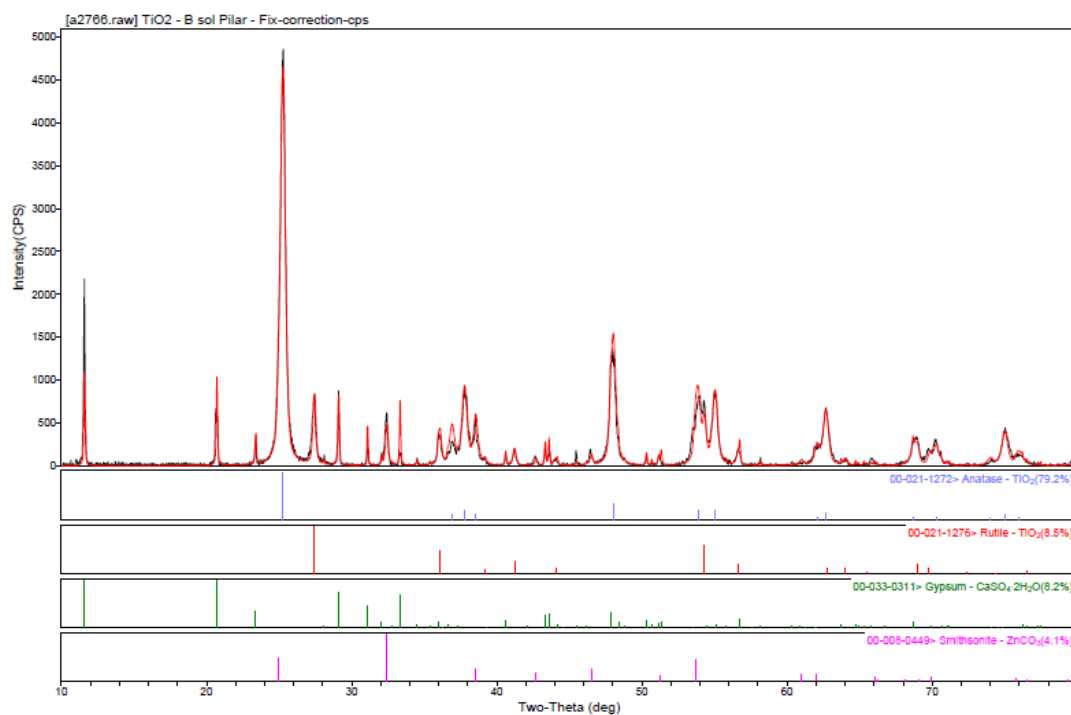


Figura VII. Difractograma de Rayos X de una muestra de TiO_2 Levenger.

III.IV Imágenes FESEM

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra diferentes imágenes de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) del TiO₂ Levenger.

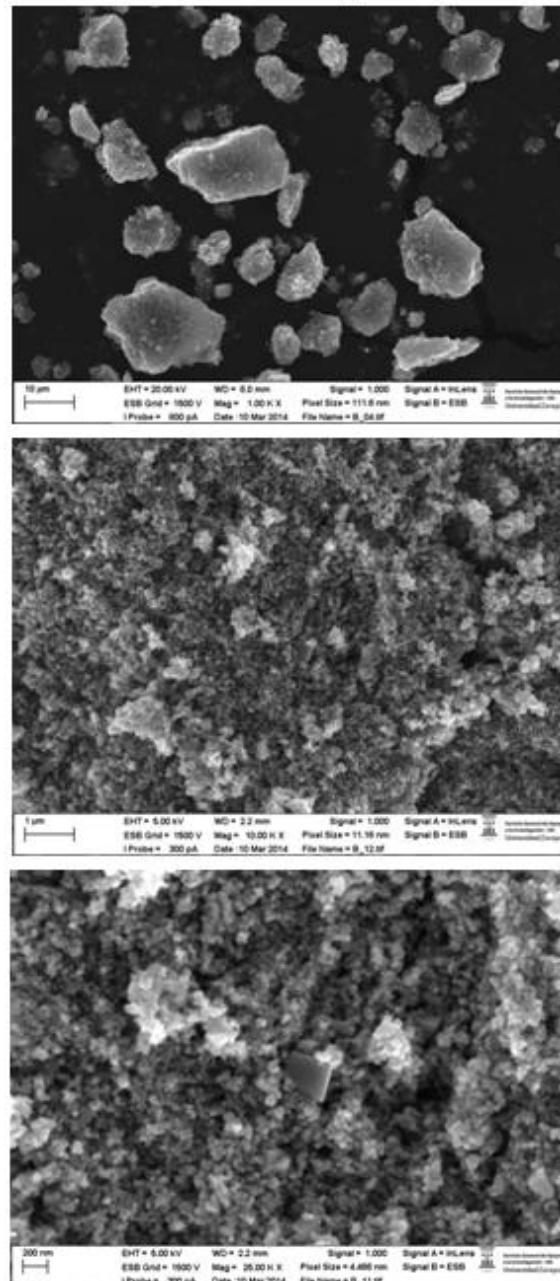


Figura VIII. Imágenes de Microscopía Electrónica del TiO₂ utilizado.

Destacan las partículas con bordes lisos y de mayor tamaño que aparecen en el TiO₂ Levenger. En las Figuras X y XI se muestran con más detalle las partículas citadas.

ANEXO IV. MODELIZACIÓN CINÉTICA

IV.1 Descripción de modelos cinéticos

La microbiología predictiva es la rama de la microbiología que pretende conocer el comportamiento de las poblaciones microbianas frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos. Para ello se requiere de un trabajo multidisciplinar, en el que se combina matemáticas, microbiología, ingeniería y química. El objetivo es la obtención de una expresión matemática que describa y permita predecir el ritmo de inactivación de los microorganismos de una determinada población. Dicha expresión matemática se conoce comúnmente como modelo cinético de inactivación, y estudia el ritmo de mortandad de las poblaciones.

En la literatura existe una amplia variedad de modelos cinéticos que tratan de representar la acción de un desinfectante y su particular modo de actuación sobre los microorganismos presentes en el agua, siempre bajo las condiciones particulares del sistema que se estudia.

La primera propuesta de un modelo cinético fue formulada por Chick en el año 1908. Se trata de una cinética de inactivación de primer orden para la modelización de gráficas de inactivación lineales. Con este modelo, Chick trata de explicar el proceso de desinfección como si de una reacción química se tratara. En este modelo, Chick supone que la concentración de desinfectante se encuentra en exceso, y por lo tanto el 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.

Uno de los problemas que presenta la Ley de Chick es que las desviaciones de su modelo son frecuentes. Por ejemplo, el índice de mortalidad aumenta o disminuye con el paso del tiempo. Por esta razón, la ecuación del modelo de Chick se puede integrar para formular una relación de la mortalidad de las bacterias válida para diferentes condiciones, obteniéndose la expresión representada en la ecuación (Ecuación I).

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

El mismo año que Chick presenta su modelo, Watson realiza una primera modificación del mismo. Watson creía que era posible incorporar al modelo el efecto de la concentración de desinfectante sobre la velocidad de reacción. Se sospecha que existe una relación estequiométrica entre el número de microorganismos y el número de moléculas de desinfectante necesarias para inactivarlos. El nuevo modelo, pasa a conocerse como modelo cinético de inactivación de Chick – Watson y se describe en la Ecuación II:

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

Donde C es la concentración de desinfectante y n es el número de moléculas de desinfectante necesarias para conseguir la inactivación bacteriana. Este factor empírico n , también se conoce como coeficiente de dilución y suele considerarse la unidad (Pernitsky et al., 1995; Lanao, 2012).

Sin embargo, los modelos cinéticos lineales presentan muchas limitaciones y no son capaces de explicar determinadas desviaciones observadas en los procesos de desinfección bacteriana. En ocasiones la curva de inactivación microbiana no es lineal y presenta formas curvilíneas cóncavas (hombro) y convexo (cola). En la figura 3.22. se muestran las diferentes grupos curvas de inactivación existentes (A, B, C y D).

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 rápida seguida de una disminución de las poblaciones lenta, lo que se traduce en la formación de una cola o tailing-off (Gyürék y Finch, 1998). Del mismo modo que en el fenómeno de los hombros, existen varias teorías acerca de la aparición de colas. Puede ser debido a agrupaciones de microorganismos, a la presencia de subpoblaciones con una resistencia variable al desinfectante, bien de carácter innato o como respuesta a una adaptación al medio, o también, a que se produzca una disminución en la concentración del desinfectante durante el tratamiento. Finalmente, las curvas D presentan ambas desviaciones lineales, mostrando una fase inicial de hombro seguida de una fase lineal de inactivación y finalizando con un fenómeno de cola (curvas sigmoideas).

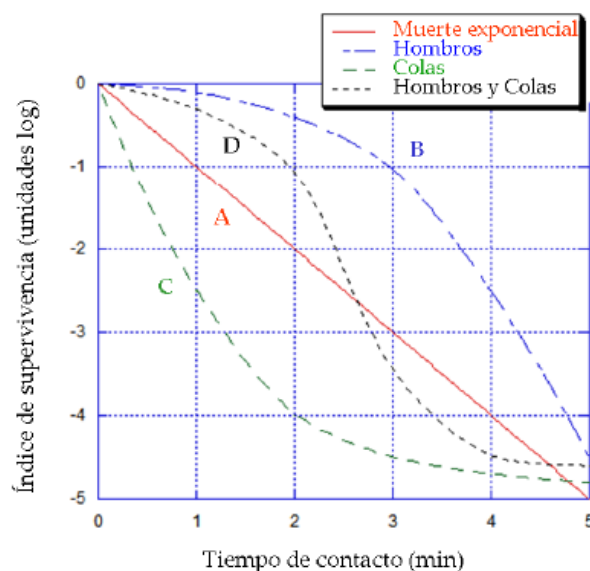


Figura IX. Curvas de inactivación microbiana posibles (Gyürék y Finch, 1998).

Modelo de Hom (1972)

El origen del modelo cinético de Hom surge como una generalización empírica de la ley de Chick-Watson. El propio Hom observó como las cinéticas de inactivación de sus sistemas algales-bacterianos no se ajustaban a los tradicionales modelos cinéticos de tipo lineal, si no que presentaban cinéticas curvilíneas.

De este modo, Hom desarrolló un nuevo modelo a partir de la ley de Chick-Watson (Ecuación III), 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. El modelo se simplifica siempre que la concentración de desinfectante sea constante, integrándose esta concentración en una constante de velocidad aparente de pseudo-primer orden ($k_{ap} = k \cdot C^n$; (min^{-1})), obteniéndose de este modo la Ecuación IV.

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

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

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 3.22. 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* (Lanao, 2012).

Modelo Weibull

Mafart y colaboradores, describen en 2002 un modelo de inactivación microbiana basado en una distribución de tipo Weibull. Se trata de una distribución de probabilidades diseñada para describir el comportamiento de sistemas que tienen cierto grado de variabilidad.

Mientras que en los modelos convencionales de primer orden se asume que las poblaciones microbianas son homogéneas desde el punto de vista de su resistencia a las condiciones a las que son expuestas, el modelo descrito por Mafart y colaboradores asume que la muerte celular tiene lugar en función del tiempo de contacto de la célula a unas condiciones de estrés dadas y que cada célula necesita un tiempo de contacto diferente para morir, y que la dispersión de la resistencia a las condiciones a las que se exponen las células viene regida por una distribución de tipo Weibull; este modelo asume que las poblaciones microbianas son de carácter heterogéneo.

La Ecuación V es la propuesta por Mafart para describir el modelo descrito.

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

El parámetro δ es conocido como “tiempo de la primera reducción decimal”, y se corresponde con el tiempo necesario para llevar a cabo la reducción del primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana (por ejemplo, de N_0 a $N_0/10$). Este parámetro se distingue del

parámetro D utilizado tradicionalmente en cinéticas de primer orden y el cual representa el tiempo de reducción decimal. El parámetro p indica la forma que va a presentar la curva de la ecuación. Cuando $p > 1$, la curva toma formas convexas, y cuando $p < 1$, la curva toma formas cóncavas. En el caso de que $p = 1$, la curva de la ecuación describiría un modelo lineal de primer orden.

Este modelo presenta dos desventajas principales. En primer lugar, es que la evaluación de los parámetros requiere de una regresión no lineal. La otra desventaja radica en que el parámetro p está fuertemente correlacionado con el parámetro δ , es decir, no son parámetros independientes, y un error en uno de ellos repercutirá en el otro. Esta correlación causa cierta inestabilidad en los parámetros estimados.

Modelo bifásico

Este modelo, denominado como bifásico, se basa en la existencia de dos poblaciones microbianas que presentan una sensibilidad diferente al tratamiento, siguiendo en ambos casos una cinética de inactivación de primer orden. La expresión matemática del modelo se define por la Ecuación VI.

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

[Ecuación VI]

Donde P es la fracción de microorganismos supervivientes correspondientes a la subpoblación 1, y por lo tanto $(1 - P)$ es la fracción de microorganismos supervivientes de la subpoblación 2. El parámetro k_1 representa la constante de inactivación de la población sensible y k_2 es la constante de inactivación de la población más resistente.

IV.II Ajuste de datos experimentales e índices de error

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

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

El coeficiente de determinación R , se calcula a partir de R^2 y 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 de R^2 a 1, mejor es la precisión predictiva del modelo, y por tanto, más concuerdan los valores predichos con los valores observados. La ecuación del coeficiente de determinación viene

descrita por la Ecuación VII, donde $\hat{y}_i$ son los valores estimados, e $\bar{y}$ es la media de los valores reales.

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

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 VIII, 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.

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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

Gyürék, L. L., Finch, G. R. (1998). Modeling Water Treatment Chemical Disinfection Kinetics. *Journal of Environmental Engineering*, 124(9), 783-793.

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

Lanao 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.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1), 107-113.

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, 1235-1241.

Pruitt, K. M., Kamau, D. N. (2007). Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 221-231.

ANEXO V. RESULTADOS

V.I Estudio de las variables influyentes en fotocátalisis

Las Tablas V-VIII muestran la inactivación de *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp. conseguida mediante los tratamientos de fotocátalisis en muestras de suspensión bacteriana en NaCl al 0,9%.

Tabla V. Inactivación de *Escherichia coli* en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9 % para diferentes dosis.

Tiempo (min)	Potencia (W/m ²)	Dosis (g/L)	Desviación	Reducción
10	500	0	0,02	-0,12
10	500	0,5	0,72	-6,60
10	500	1	0,90	-6,16
10	500	2	0,50	-6,81

Tabla VI. Inactivación de *Enterococcus* sp. en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9 % para diferentes dosis.

Tiempo (min)	Potencia (W/m ²)	Dosis (g/L)	Desviación	Reducción
10	500	0	0,14	0,10
10	500	0,5	0,80	-2,18
10	500	1	0,86	-1,91
10	500	1,5	0,80	-2,96
10	500	2	0,80	-3,15

Tabla VII. Inactivación de *E. coli* en suspensión bacteriana en NaCl 0,9% para diferentes tiempos.

Tiempo (min)	Potencia (W/m ²)	Dosis (g/L)	Desviación	Reducción
5	500	1	0,90	-4,71
10	500	1	0,00	-6,95
15	500	1	0,00	-6,95
25	500	1	0,00	-6,95
5	500	0	0,02	-0,04
10	500	0	0,05	-0,07
15	500	0	0,11	-0,14
25	500	0	0,23	-0,33

Tabla VIII. Inactivación de *Enterococcus* sp. en suspensión bacteriana en NaCl 0,9% para diferentes tiempos.

Tiempo (min)	Potencia (W/m ²)	Dosis (g/L)	Desviación	Reducción
10	500	1	0,86	-1,91
20	500	1	0,83	-4,24
30	500	1	0,37	-4,89
10	500	0	0,14	0,10
20	500	0	0,12	0,00
30	500	0	0,14	0,05

Las Tablas IX y X muestran los resultados obtenidos en los tratamientos fotocatalíticos para estudiar la influencia del tiempo de tratamiento en agua de salida de depuradora.

Tabla IX. Inactivación de *E. coli* en agua de salida de EDAR (ver Tabla 4), diferentes tiempos.

	Tiempo (min)	Reducciones		Desviaciones	
		TiO ₂	Sin TiO ₂	TiO ₂	Sin TiO ₂
Cintruénigo 4	60	-1,7	-1,0	0,18	0,16
	120	-3,1	-1,5	0,16	0,21
Monteagudo 5	60	-2,11	-1,86	0,37	0,23
	120	-3,5	-2,34	0,3	0,28
Tudela 6	60	-1,63		0,42	
	120	-2,43		0,31	
Tudela 7	60	-1,61		0,21	
	120	-1,97		0,4	

Tabla X. Inactivación de *Enterococcus* sp. en agua de salida de EDAR (ver Tabla 4), diferentes tiempos.

	Tiempo (min)	Reducciones		Desviaciones	
		TiO ₂	Sin TiO ₂	TiO ₂	Sin TiO ₂
Cintruénigo	60	-1,96	-0,15	0,43	0,3
	120	-2,46	-0,87	0,3	0,015
Monteagudo	60	-4,46	-2,75	0,1	0,01
	120	-4,46	-3,99	0,1	0,3
Tudela 6	60	-2,89		0,35	
	120	-2,89		0,4	
Tudela 7	60	-0,44		0,5	
	120	-1,93		0	

La Tabla XI muestra los resultados obtenidos en los tratamientos fotocatalíticos para estudiar la influencia de la temperatura en la inactivación de suspensión bacteriana al 0,9% NaCl fortificada con *E. coli*.

Tabla XI. Resultados de los tratamientos fotocatalíticos en suspensión bacteriana de *E. coli* al 0,9% NaCl, diferentes temperaturas.

Tª (°C)	Potencia	Dosis TiO ₂	Dosis UVA (W·h/m ²)	Tiempo (min)	Reducción	Desviación
10	250	0	42	10	0,00	0,03
10	250	0	250	60	-0,71	0,00
10	250	1	42	10	-3,81	0,56
10	250	1	250	60	-5,80	0,00
10	750	0	125	10	-0,18	0,01
10	750	0	750	60	-2,53	0,00
10	750	1	125	10	-5,43	0,00
10	750	1	750	60	-6,53	0,00
20	500	0	17	2	-0,02	0,06
20	500	0	33	4	-0,07	0,09
20	500	0	42	5	-0,04	0,02
20	500	0	58	7	-0,03	0,07
20	500	0	83	10	-0,07	0,05
20	500	0	125	15	-0,14	0,11
20	500	0	208	25	-0,33	0,23
20	500	1	17	2	-1,62	0,98
20	500	1	33	4	-2,74	1
20	500	1	42	5	-4,71	0,9
20	500	1	58	7	-3,89	1
20	250	0	42	10	-0,54	0,35
20	250	0	250	60	-0,54	0,25
20	250	1	42	10	-4,00	0,99
20	250	1	250	60	-5,69	1,00
20	750	0	125	10	-0,18	0,00
20	750	0	750	60	-2,34	0,04
20	750	1	125	10	-5,43	0,75
20	750	1	750	60	-7,86	0,00
33	250	0	42	10	-0,07	0,14
33	250	0	250	60	-0,81	0,06
33	250	1	42	10	-3,85	0,71
33	250	1	250	60	-7,51	0,00
33	750	0	125	10	-0,28	0,05
33	750	0	750	60	-3,96	0,19
33	750	1	125	10	-5,74	0,99
33	750	1	750	60	-8,17	0,80

En las Tablas XII y XIII se presentan los resultados obtenidos en los tratamientos de fotocátalisis para el estudio de la influencia de la temperatura en aguas de salida de depuradora nº 6, 8 y 9 de la Tabla 4.

Tabla XII. Resultados de los tratamientos fotocatalíticos en agua de salida de EDAR para *E. coli*, diferentes temperaturas.

Tª	Potencia	TiO ₂	Dosis UVA (W·h/m ²)	Tiempo (min)	Reducción	Desviación
22°C	500	1	500	60	-1,63	0,42
22°C	500	1	1000	120	-2,43	0,31
10°C	500	1	83	10	-0,37	0,32
10°C	500	1	250	30	-0,43	0,2
10°C	500	1	500	60	-0,85	0,3
10°C	250	1	42	10	-0,25	0,18
10°C	250	1	125	30	-0,56	0,32
10°C	250	1	250	60	-1,01	0,5
10°C	750	1	125	10	-0,26	0,5
10°C	750	1	375	30	-0,67	0,5
10°C	750	1	750	60	-1,39	0,21

Tabla XIII. Resultados de los tratamientos fotocatalíticos en agua de salida de EDAR para *Enterococcus sp.*, diferentes temperaturas.

Tª	Potencia	TiO ₂	Dosis UVA (W·h/m ²)	Tiempo (min)	Reducción	Desviación
22°C	500	1	500	60	-2,89	0,35
22°C	500	1	1000	120	-2,89	0,40
10°C	500	1	83	10	-0,52	0,02
10°C	500	1	500	60	-1,74	0,4
10°C	250	1	42	10	0,00	0,3
10°C	250	1	125	30	-0,55	0,5
10°C	250	1	250	60	-1,00	0,7
10°C	750	1	125	10	-0,53	0,3
10°C	750	1	375	30	-1,53	0,3
10°C	750	1	750	60	-2,23	0

En las Tablas XIV, XV y XVI se presentan los resultados obtenidos en los tratamientos de fotocátalisis para el estudio de la influencia de la matriz (EDAR y EDAR+SB corresponden a los números 1 y 3 de la Tabla 4).

Tabla XIV. Resultados de los tratamientos fotocatalíticos en diferentes matrices para *E. coli*.

	Tiempo (min)	Intensidad (W/m ²)	Dosis TiO ₂ (W·h/m ²)	Reducción	Desviación
E. coli SB	2	500	0	-0,02	0,06
	4	500	0	-0,07	0,09
	5	500	0	-0,04	0,02
	7	500	0	-0,03	0,07
	10	500	0	-0,07	0,05
	15	500	0	-0,14	0,11
	25	500	0	-0,33	0,23
	2	500	1	-1,62	0,98
	4	500	1	-2,74	0,9
	5	500	1	-4,71	0,9
	7	500	1	-3,89	0,89
	10	500	1	-6,95	0
	15	500	1	-6,95	0
	25	500	1	-6,95	0

Tabla XV. Resultados de los tratamientos fotocatalíticos en diferentes matrices para *E. coli*.

	Tiempo (min)	Intensidad (W/m ²)	Dosis TiO ₂ (W·h/m ²)	Reducción	Desviación
E. coli Corella 1	60	500	0	-0,234	0,063
	120	500	0	-1,141	0,143
	60	500	1	-2,182	0,157
	120	500	1	-3,718	0,180

Tabla XVI. Resultados de los tratamientos fotocatalíticos en diferentes matrices para *E. coli*.

	Tiempo (min)	Intensidad (W/m ²)	Dosis TiO ₂	Desviación	Reducción
E. coli Corella 3	60	500	0	0,07	-0,70
	120	500	0	0,08	-0,84
	60	500	1	0,17	-4,38
	120	500	1	0,32	-5,05

El estudio de la influencia de la matriz con suspensión bacteriana de *Enterococcus* sp. en NaCl al 0,9% se realiza con los resultados de la Tabla VIII. En el caso de los resultados obtenidos para agua de salida de depuradora se presentan en las Tablas IX y X.

V.II. Modelización cinética

En las Figuras XI y XII se representa el ajuste de los distintos modelos matemáticos a los datos experimentales observados durante los tratamientos de inactivación de *Escherichia coli*, en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9%.

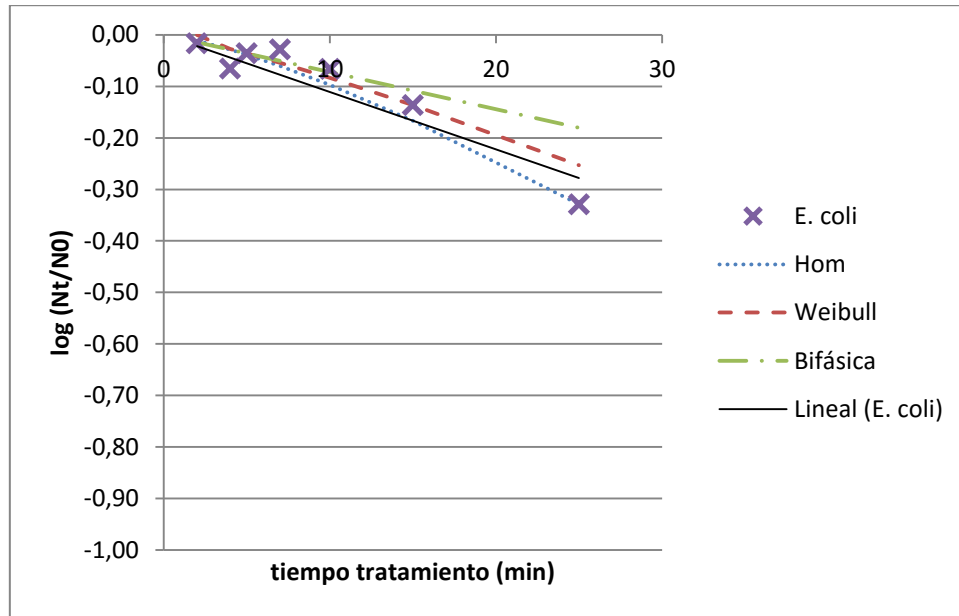


Figura X. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9% sin TiO_2 .

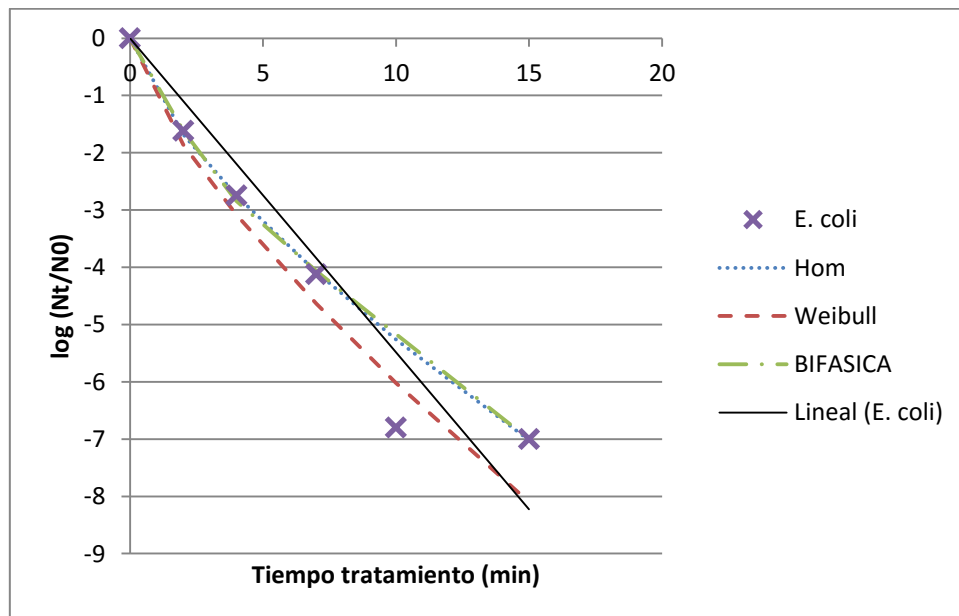


Figura XI. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *E. coli* en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9% con TiO_2 .

En las Figuras XIII y XIV se representa el ajuste de los distintos modelos matemáticos a los datos experimentales observados durante los tratamientos de inactivación de *Enterococcus sp.*, en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9%.

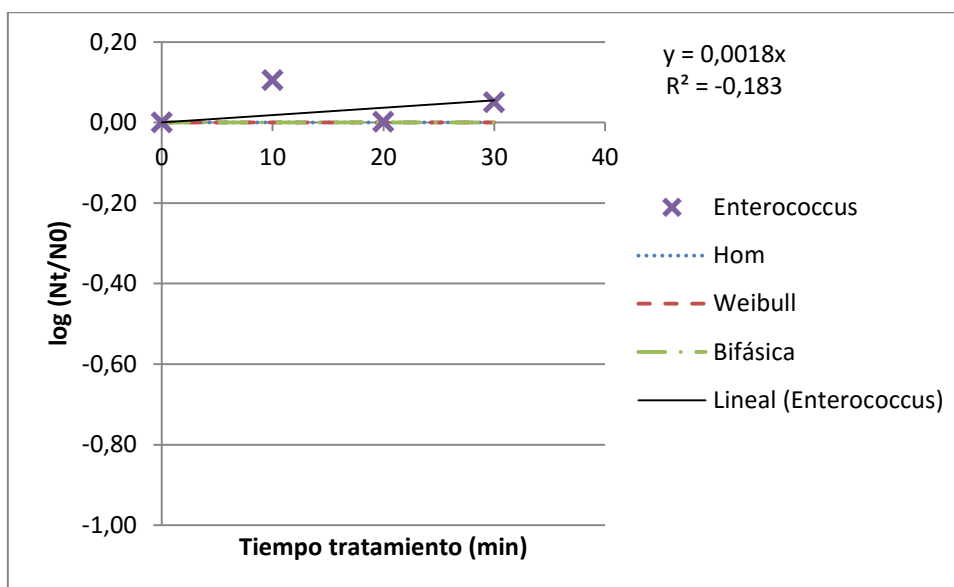


Figura XII. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus sp.* en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9% sin TiO_2 .

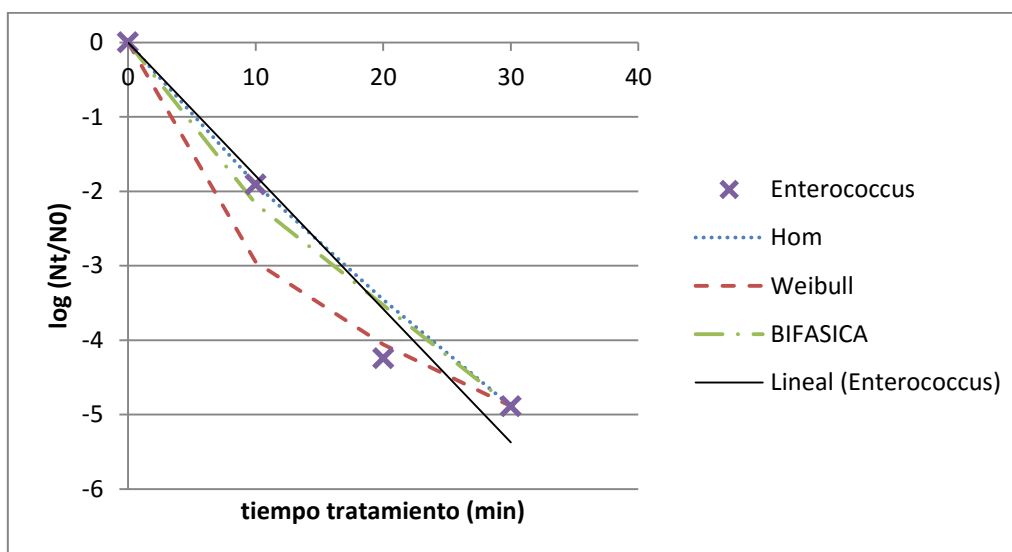


Figura XIII. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la curva de inactivación de *Enterococcus sp.* en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9% con TiO_2 .

En las Figuras XV-XX se representan los valores experimentales observados de inactivación de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* frente a los valores estimados por los distintos modelos, en suspensión bacteriana en NaCl al 0,9 %. Cuanto más se acerquen estos datos a una línea recta, mejor es el ajuste.

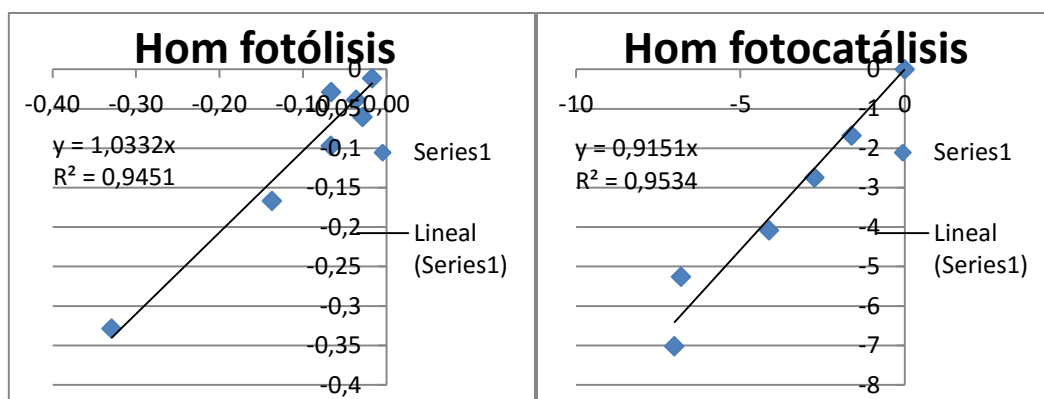


Figura XIV. Valores estimados frente a los valores observados en tratamiento de fotólisis y fotocatalisis en suspensión bacteriana de *E. coli* en NaCl al 0,9 %. Modelo de Hom.

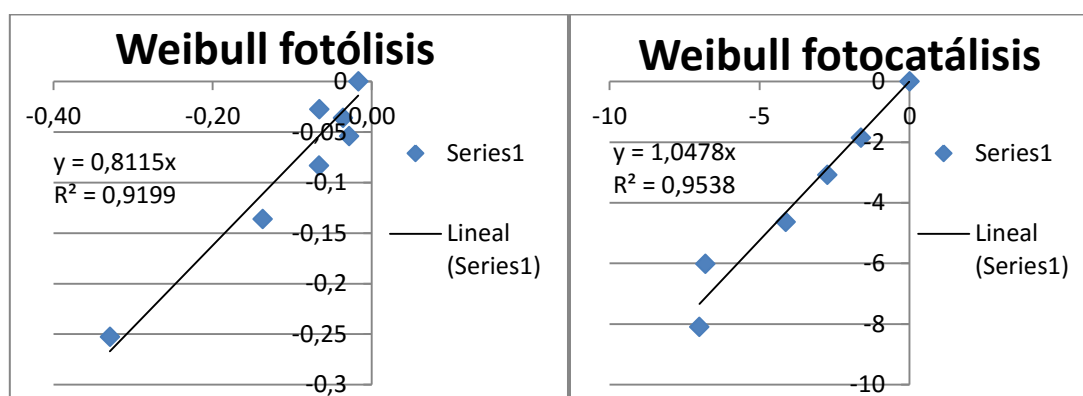


Figura XV. Valores estimados frente a los valores observados en tratamiento de fotólisis y fotocatalisis en suspensión bacteriana de *E. coli* en NaCl al 0,9 %. Modelo de Weibull.

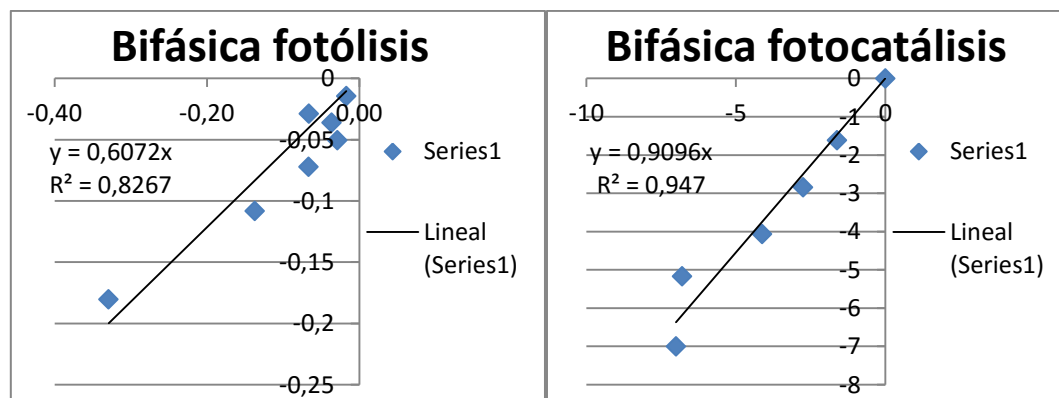


Figura XVI. Valores estimados frente a los valores observados en tratamiento de fotólisis y fotocatalisis en suspensión bacteriana de *E. coli* en NaCl al 0,9 %. Modelo Bifásico.

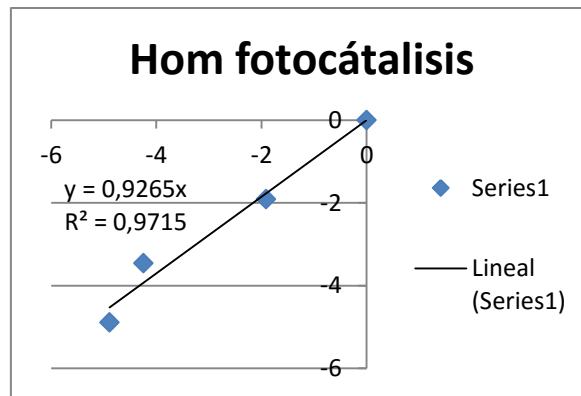


Figura XVII. Valores estimados frente a los valores observados en tratamiento de fotocátalisis en suspensión bacteriana de *Enterococcus* sp. en NaCl al 0,9 %. Modelo de Hom.

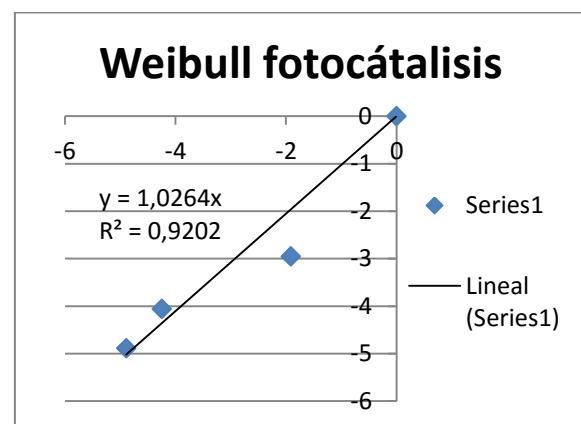


Figura XVIII. Valores estimados frente a los valores observados en tratamiento de fotocátalisis en suspensión bacteriana de *Enterococcus* sp. en NaCl al 0,9 %. Modelo de Weibull.

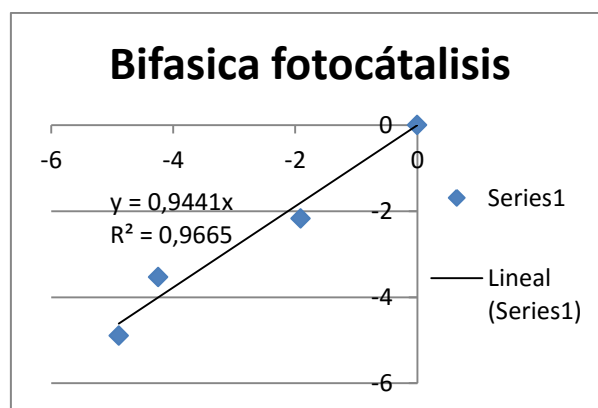


Figura XIX. Valores estimados frente a los valores observados en tratamiento de fotocátalisis en suspensión bacteriana de *Enterococcus* sp. en NaCl al 0,9 %. Modelo Bifásico.

V.III. Ensayos de reutilización

La Tabla V muestra los resultados obtenidos en los ensayos de inactivación bacteriana con un tiempo de tratamiento de 15 minutos reutilizando 1 g/L de TiO_2 en discontinuo en suspensión bacteriana al 0,9% NaCl fortificada con *Escherichia coli* y a 500 W/m^2 , (Apartado 3.7).

Tabla XVII. Resultados de los ensayos de reutilización del dióxido de titanio.

Nº usos	Reducción	Turbidez (NTU)	pH	Conductividad (mS/cm)	Desviación
1	-7,84	3170	7,1	12,26	0
2	-6,93	3450	7,12	11,11	0,4
3	-7,12	3200	6,75	11,6	0,98
4	-6,42	3050	6,92	12,45	0,98
5	-6,35	2920	6,89	12,07	0,92
6	-5,95	2830	6,43	10,4	0,99
7	-5,93	2720	6,4	12,89	0,93