



**Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza**

PROYECTO FINAL DE CARRERA

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES
SOBRE LA DESINFECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*
MEDIANTE TECNICAS BASADAS EN EL REACTIVO
FENTON.**

AUTOR

José Luís López Gutiérrez

DIRECTOR

Jorge Jesús Rodríguez Chueca

PONENTE

Rosa Mosteo Abad

ESPECIALIDAD

Química Industrial

CONVOCATORIA

Mayo/Junio 2012

ÍNDICE

1- Resumen.	8
2- Alcance y objetivos.	9
3- Desinfección de aguas.	12
3.1- Introducción.	12
3.2- Contaminación biológica.	13
3.2.1- virus.....	14
3.2.2- Protozoos.....	14
3.2.3- Bacterias.....	15
3.3- Métodos de desinfección.....	16
3.3.1- Agentes químicos.....	17
3.3.2- Medios físicos.	17
3.3.3- Medios mecánicos.....	18
4- El proceso Fenton.....	19
4.1- Aplicaciones y tipos de procesos Fenton.....	19
4.2- Mecanismos de reacción del proceso Fenton.....	21
5- Procedimiento experimental.....	25
5.1- Reactivos y materiales.....	25
5.2- Metodología	27

5.2.1- Análisis de parámetros físico-químicos.....	28
5.2.2- Analisis <i>Escherichia. coli</i>	28
5.3- Preparación de las muestras	32
5.4- Ensayos de desinfección	33
5.5- Diseño de experimentos y análisis de variables.....	34
6- Resultados de la experimentación.....	38
6.1- Resultados de analisis previos.....	38
6.2- Resultados de los ensayos incluidos en el diseño de experimentos.	39
6.2.1 Estudio de parámetros físico-químicos.....	39
6.2.2 Resultados de desinfección.	41
6.3- Análisis de variables	42
7- Conclusiones.....	51
ANEXO I PROCESOS FENTON.....	56
ANEXO II DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	65
ANEXO III METODOLOGIA DE LA MICROBIOLOGIA	70
ANEXO IV TEORÍA DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS	76
ANEXO V RESULTADOS DE TODOS LOS EXPERIMENTOS RREALIZADOS EN ESTE PROYECTO FIN DE CARRERA.	84
Bibliografía	88

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría dar las gracias...

A mis padres por su continuo esfuerzo para que tuviera siempre las mejores oportunidades. Gracias por vuestro cariño y apoyo. También a mi novia Inma por estar siempre dispuesta a ayudarme al escribir esta memoria.

A Jorge por enseñarme todo lo que he aprendido sobre microbiología y por el apoyo y la ayuda que me ha prestado para la realización de este proyecto fin de carrera, que no hubiera podido realizar sin su ayuda.

A Rosa por darme la posibilidad de implicarme en un proyecto tan interesante y por su ayuda especialmente en los momentos más delicados.

A los compañeros de laboratorio por los buenos momentos vividos juntos, así siempre es más fácil y agradable trabajar y siempre me han ayudado en lo que les he necesitado.

A mis amigos por sus continuos ánimos, muy en especial a Javi y José por estar siempre ahí, en los buenos y en los malos momentos, por escucharme y ayudarme cuando lo he necesitado.

A mis compañeros de clase, amigos ante todo que me han dado ánimos en la difícil tarea de desarrollar este proyecto. Gracias por vuestro apoyo, consejos y cariño.

A la Universidad de Zaragoza y a todos sus empleados por hacer posible la realización de mi carrera y este proyecto.

A todos aquellos que han formado parte de mi vida de una forma u otra y que han hecho posible el llegar hasta aquí.

1- Resumen.

Uno de los factores de mayor riesgo asociados al uso del agua es la exposición del hombre a agentes patógenos, como son las bacterias, puesto que son causantes de enfermedades de origen hídrico con altos porcentajes de morbilidad entre la población, por lo que es necesario el control microbiológico de esta agua. Entre estos microorganismos destacan: las bacterias de putrefacción como las *Pseudomonas* e indicadores fecales como la *Escherichia coli*, bacteria seleccionada para la investigación desarrollada en el presente proyecto final de carrera.

La desinfección de las aguas mediante coloración es el tratamiento mas utilizado desde hace décadas. En los últimos años, los procesos de oxidación avanzada se están utilizando como alternativa a la desinfección convencional. El proceso Fenton es una técnica de oxidación avanzada en la que se utiliza Fe y H₂O₂ como reactivos. En este proyecto se estudia la influencia de variables sobre la desinfección de *E. coli* mediante el proceso Fenton. Las variables seleccionadas son:

- Presencia o ausencia de radiación solar.
- Concentración de cloruro de hierro (III).
- Concentración de peróxido de hidrogeno en procesos Fenton.

Uno de los resultados mas relevantes que se ha obtenido en la investigación desarrollada es que se alcanzan desinfecciones de 5,81 utilizando como reactivos 5 ppm de cloruro de hierro, 20 ppm de H₂O₂ y uso de radiación solar. En general, los mejores resultados se obtienen siempre en presencia de radiación solar, lo que indica que es la variable más significativa.

Según el análisis estadístico, realizado por el programa Minitab, para determinar la influencia de las variables seleccionadas en la desinfección de *E. coli* mediante un proceso Fenton se observa que la presencia de luz y el H₂O₂ son las variables más influyentes.

2- Alcance y objetivos.

El agua es esencial para la vida, tanto para la existencia de las personas como para el desarrollo de sus actividades económicas. Sin embargo, la disponibilidad de agua es muchas veces un recurso limitado a nivel mundial. A medida que la población y su nivel de vida aumentan, también aumenta la demanda hídrica para abastecer las necesidades que conllevan el continuo desarrollo y crecimiento económico de la sociedad.

El principal factor de riesgo sanitario que acompaña a los distintos usos del agua, como el uso agrícola, el uso humano, etc., es la exposición del hombre y animales a agentes biológicos [Moreno et al., 1998]. Estos microorganismos causan enfermedades de origen hídrico lo que hace que sea imprescindible un control microbiológico del agua para que ésta no suponga un riesgo sanitario.

Para evitar el riesgo sanitario de las aguas es necesario someter a las aguas a tratamientos de desinfección. Durante décadas, el tratamiento de desinfección basado en la cloración ha sido y es el más utilizado debido a su alta eficiencia y su efecto residual. Sin embargo, durante los últimos años ha aumentado la preocupación sobre la aplicación del cloro debido a la generación de compuestos órgano clorados durante el proceso de desinfección. Estos compuestos son altamente cancerígenos por lo que se está limitando la concentración de estas sustancias en el agua.

Con este fin, actualmente se está estudiando la aplicación de los denominados procesos de oxidación avanzada (POAs), que se basan en la generación de radicales hidroxilo altamente oxidantes para la desinfección de aguas. Uno de ellos es el proceso Fenton, que se basa en el uso de sales de hierro disueltas o en fase heterogénea y peróxido de hidrógeno como reactivos, este proceso es objeto de estudio en este proyecto.

Este proceso de oxidación avanzada es una de las técnicas más económicas y eficaces ya que es capaz de degradar a la mayor parte de los contaminantes presentes en el agua, sin embargo existen pocos estudios en los que se esté aplicando esta técnica para la desinfección de aguas [Moncayo et al, 2009; Spuhler et al, 2010].

En este proyecto el objetivo principal es estudiar la desinfección de aguas mediante tratamientos Fenton y Foto-Fenton (procesos de oxidación avanzada).

Este proyecto ha sido realizado dentro del grupo de investigación Calidad Y Tratamiento de Aguas perteneciente al IUCA (Instituto Universitario de Ciencias Ambientales) de la Universidad de Zaragoza.

En concreto, son objetivos de este proyecto los siguientes:

- Determinar la influencia de los distintos parámetros implicados en el proceso Fenton y Foto Fenton (concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de hierro, la presencia o ausencia de luz solar y pH) sobre el proceso de desinfección.
- Determinar las condiciones de trabajo más favorables para la desinfección de aguas mediante procesos Fenton y Foto-Fenton.

La estructura de la memoria es la siguiente:

- Capítulo 1: Resumen
- Capítulo 2: Introducción
- Capítulo 3: Desinfección de aguas
- Capítulo 4: El proceso Fenton
- Capítulo 5: Procedimiento experimental

- Capítulo 6: Resultados de la experimentación
- Capítulo 7: Conclusiones
- Capítulo 8: Bibliografía
- Anexos

3- Desinfección de aguas.

3.1- Introducción.

Si nos remitimos a datos históricos sabemos que las bacterias fueron descubiertas en 1680, por Antony Van Leeuwenhoek, un comerciante de Delft, Holanda. No tuvo educación universitaria y por ello se le excluyó de la comunidad científica de su época.

Después de Leeuwenhoek, el austriaco Marc von Plenciz (1705-1781) afirmó que las enfermedades contagiosas eran causadas por los pequeños organismos descubiertos por Leeuwenhoek.

Alrededor de 1880, algunas investigaciones demostraron que las denominadas patógenas eran la causa de determinadas enfermedades, comprobándose que muy pequeñas cantidades de determinados productos químicos eran capaces de eliminarlas.

La desinfección de aguas nace en los primeros años del siglo XX, en Estados Unidos. Se define la desinfección de agua como el proceso mediante el cual se eliminan los microorganismos patógenos existentes en el agua. Esta destrucción supondrá el fin de la reproducción y crecimiento de los mismos. El proceso de desinfección de las aguas es muy importante para preservar la salud, pues estos microorganismos son capaces de transmitir muchas enfermedades como son: las enteritis causadas por bacterias o incluso la cólera causada por *vibrio cholerae*.

Los desinfectantes no solo deben matar a los microorganismos sino que deben además tener un efecto residual, que significa que se mantengan como agentes activos en el agua después de la desinfección para prevenir el crecimiento de los microorganismos en las tuberías provocando la recontaminación del agua.

3.2- Contaminación biológica.

El agua puede contener materia orgánica y microorganismos que la conviertan en causa o vehículo de distintas enfermedades, actuando como un factor que limita el desarrollo económico y social. El origen principal de la contaminación biológica es el origen fecal, por lo tanto la contaminación microbiológica se suele evaluar mediante indicadores de contaminación fecal como son la *E. coli*, *Enterococos* o *Clostridium Perfringens*.

Los indicadores de contaminación fecal se han elegido de acuerdo a los siguientes criterios:

- Ser fáciles de aislar y cultivar en el laboratorio.
- Ser relativamente inocuos para el hombre y los animales.
- Estar presentes en las heces de humanos y animales en grandes cantidades.
- No multiplicarse en aguas naturales.
- Persistir en el agua de manera similar a los patógenos fecales.
- El grado de eliminación durante el tratamiento del agua debe ser similar al de los patógenos.

No obstante, cabe destacar que no existe ningún microorganismo que reúna todos los criterios de un indicador ideal.

La unidad de medida de la contaminación microbiológica es la UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Así, el valor de UFC por metro cúbico (UFC/m³), indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente.

Los síntomas que provocan los microorganismos patógenos son: náuseas, vómitos, diarrea, entre otros. Además de estos síntomas, producen enfermedades tales como: la fiebre tifoidea, causada por *Salmonella typhi*; el cólera, producido por la bacteria *Vibrio cholerae*.

En el agua, los microorganismos patógenos que pueden encontrarse son: **protozoos, virus y bacterias**. Si es verdad que de todos ellos, el que más interés requiere es el grupo de estas últimas.

A continuación, se muestra un resumen de las características principales de dichos grupos.

3.2.1- virus.

Los virus son sistemas biológicos ultramicroscópicos que pueden causar infecciones y que sólo se reproducen en células huésped. Fuera de células huésped están en forma inactiva, la cual es muy resistente. Además, se caracterizan por presentar una capa protectora. Su forma puede ser espiral, esférica o como células pequeñas.

Al contrario que las bacterias, los virus no están presentes en el ser humano de manera natural. Cuando las personas quedan afectadas por un virus, estos se eliminan generalmente mediante las heces en grandes cantidades

3.2.2- Protozoos.

Los protozoos son microorganismos sencillos, la mayoría de ellos 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 quistes o huevos. Los huevos de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*, son comunes en aguas afectadas por contaminación fecal. Ambos protozoos son resistentes a la desinfección por cloro y por otros agentes desinfectantes.

Según su alimentación se clasifican en muchos grupos: heterótrofos, fagótrofos, detritívoros, a veces mixótrofos (parcialmente autótrofos). Viven en ambientes húmedos o en medios acuáticos, ya sean aguas saladas o aguas dulces. Se reproducen de manera asexual, por bipartición y también por conjugación, intercambio de material hereditario entre ellos.

3.2.3- Bacterias.

Las bacterias son microorganismos unicelulares cuyo tamaño oscila entre 0,5 y 5 μm . Presentan diversas formas como son las esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas es decir, son células muy rudimentarias, que no presentan ni núcleo ni la mayoría de orgánulos que si presentan las células eucariotas. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento. Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos; crecen hasta en los más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos, en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que se pueden encontrar en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo.

Las bacterias son imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de éstas. Como ejemplo cabe citar la fijación del nitrógeno atmosférico.

Algunas bacterias son inofensivas, otras producen enfermedades y otras participan en la degradación de la materia orgánica contenida en el agua. Ciertas bacterias descomponen sustancias inorgánicas.

Escherichia coli.

En este proyecto fin de carrera se ha seleccionado la *E. coli* como germen patógeno a inactivar mediante la técnica de desinfección propuesta debido a su presencia en muchos tipos de aguas así como por su fácil control. A continuación se muestran las características de esta bacteria.

Es una enterobacteria que se encuentra generalmente en el intestino de los animales homeotérmicos. Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo del ser humano. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo. La *E.coli* puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biología molecular. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram-negativo), es anaerobio facultativo, no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, [Chris Bell et al., 1998]

3.3- Métodos de desinfección.

Se entiende por desinfección, la inhibición o eliminación de agentes microbianos causantes de enfermedades. Los métodos de desinfección de aguas se pueden clasificar en tres grupos, los cuales describiremos con más detalle unas líneas más abajo. Esta clasificación consta de:

- Agentes químicos.
- Medios físicos.
- Medios mecánicos.

3.3.1- Agentes químicos.

Los compuestos químicos utilizados para la desinfección del agua son:

- Hipoclorito de sodio (NaClO), ácido hipocloroso (HClO), c (NaClO_2).
- Dióxido de cloro (ClO_2).
- Ozono (O_3).
- Halógenos: Yodo.
- Metales: cobre (Cu^{2+}), plata (Ag^+).
- Permanganato de potasio (KMnO_4).
- Jabones y detergentes.
- Sales de amonio.
- Peróxido de hidrógeno ($\text{H}_2 \text{O}_2$).
- Flúor.

El desinfectante más común y efectivo es el cloro [Aurelio Hernández Muñoz 2001]. Sin embargo, la creciente preocupación por la generación de subproductos cancerígenos, como los trihalometanos, generados a partir de la reacción del cloro y la materia orgánica presente en el agua, esta provocando la sustitución paulatina por otros agentes desinfectantes. Con el fin de buscar técnicas alternativas que minimicen la presencia de trihalometanos en aguas, se están aplicando los procesos de oxidación avanzada, descritos en el apartado 4 de esta memoria.

3.3.2- Medios físicos.

Los procesos físicos más utilizados para la desinfección del agua son:

- Luz ultravioleta
- Radiación electrónica
- Calor

3.3.3- Medios mecánicos

El más utilizado de los medios mecánicos es la filtración. La filtración consiste en hacer pasar el medio líquido que contiene las bacterias, por un filtro con diferentes tamaños de poro, en función de los microorganismos que se desee eliminar. La esterilización por filtración se utiliza mayoritariamente para eliminar bacterias de los medios líquidos que sean susceptibles al calor. Por ejemplo, las disoluciones enzimáticas o de vitaminas.

4- El proceso Fenton

4.1- Aplicaciones y tipos de procesos Fenton

La reacción Fenton clásica fue descubierta por H. J. H. Fenton en 1894. Es un proceso de oxidación avanzada (POA) realizado a pH 3 en el que se utilizan como reactivos peróxido de hidrógeno y sulfato de hierro (II), en un reactor simple y no presurizado, normalmente de tipo discontinuo. La descomposición del peróxido en presencia de hierro genera especies reactivas del oxígeno (ROS) que degradan la materia orgánica y son desinfectantes, por lo que mejoran la calidad del agua tratada, en el ANEXO I se desarrolla este apartado con más detalle.

Una de las ventajas del Fenton frente a otros POAs es que los reactivos empleados son seguros y fáciles de manejar, relativamente económicos, y no suponen una amenaza para el medioambiente, puesto que el peróxido se descompone fácilmente en agua y oxígeno y el hierro no tiene ningún efecto adverso [Pignatello et al., 2006]. En las condiciones adecuadas, los contaminantes orgánicos pueden ser eficazmente degradados mediante el proceso Fenton [Martínez et al., 2001], ya sea debido a:

- Un cambio en la estructura de los compuestos orgánicos que facilite un posible tratamiento biológico posterior.
- Una oxidación parcial de los contaminantes que reduzca la toxicidad del efluente.
- Una oxidación total de los compuestos orgánicos en sustancias inocuas que haga posible la descarga segura del efluente sin necesidad de un tratamiento posterior.

Existe una gran variedad de compuestos orgánicos que pueden ser degradados mediante el proceso Fenton. Algunos, como el benceno o el fenol, se oxidan con relativa facilidad, mientras que otros, como el ácido acético, son más refractarios.

Además, puede haber situaciones en las que se produzcan compuestos no deseados (por ejemplo, la descomposición de algunos alcoholes puede dar lugar a acetona, un compuesto totalmente refractario a la oxidación), por lo que se requiere la realización de ensayos y análisis antes, durante y después del tratamiento [Bigda, 1995]. En muchos casos, un substrato orgánico aparentemente refractario al tratamiento puede ser oxidado modificando las condiciones de temperatura, pH o concentración de catalizador.

La eficiencia del proceso Fenton depende de múltiples factores: dosis y ratio de reactivos, pH, concentración y características de materia inorgánica y orgánica, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, condiciones de luz ambiental, etc. [Namkung et al., 2004]. Puesto que estos parámetros determinan la eficiencia de la reacción global, es importante entender las relaciones entre estos, en términos de producción y consumo de radicales [Yoon et al., 2001]. En el ANEXO I se desarrolla este apartado con más detalle.

Con el objetivo de evitar algunos de los problemas detectados que conlleva la aplicación del proceso Fenton clásico, se han propuesto y estudiado distintas modificaciones a éste a lo largo de los años, por ejemplo, el proceso “Fenton-like” y el proceso Foto-Fenton [Pignatello et al., 2006]. En este proyecto se va a utilizar un proceso “Fenton – like” para el estudio de desinfección de aguas. Por un lado, se va a trabajar a pH 5 y con radiación solar y por otro lado se va a trabajar a pH 5 y ausencia de luz solar (proceso Foto – Fenton).

En el proceso “Fenton-like”, las diferencias respecto al Fenton tradicional son el tipo de catalizador utilizado: en el Fenton clásico se emplea Fe^{2+} , mientras que en el “Fenton-like” se añade Fe^{3+} u otros iones de metales de transición como catalizador [Jiang et al., 2010], el pH de trabajo también es diferente al utilizado en el Fenton tradicional.

En el proceso Foto-Fenton las muestras se irradian durante el tratamiento con luz ultravioleta (UV) o UV/visible. Las reacciones Fenton foto-asistidas o reacciones Foto-Fenton normalmente tienen lugar a mayor velocidad y obtienen niveles de mineralización más elevados que en el Fenton tradicional [Ruppert et al., 1993]. Estas mejoras son debidas a la foto-química del Fe^{3+} y a la fotólisis que experimenta el H_2O_2 en presencia de luz UV, en ambos casos se contribuye a la formación de radicales hidroxilo y por lo tanto a la degradación de los contaminantes [Pignatello, 1992]. El proceso Foto-Fenton se explica más detalladamente en el ANEXO I.

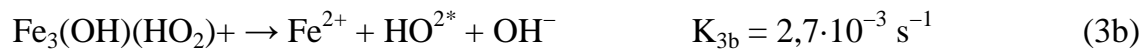
Durante los últimos años, se ha estudiado y comprobado que las especies reactivas del oxígeno generadas en procesos Fenton, son eficaces como agentes desinfectantes. El proceso Foto-Fenton ha sido aplicado con éxito para la inactivación de *Escherichia coli* en aguas de ríos [Moncayo-Lasso et al., 2009] y en aguas prepotables [Spuhler et al., 2010], así como para la eliminación de *Enterococcus* en aguas de salida de depuradora [Rodríguez et al., 2010], utilizando en todos los casos luz solar como fuente de radiación UV/visible. Además, el análisis al microscopio electrónico de las células de *E. coli* tratadas mediante el proceso Fenton sugiere que su inactivación es mucho mayor que la causada por otras técnicas de desinfección, como la cloración [Diao et al., 2004].

4.2- Mecanismos de reacción del proceso Fenton.

El mecanismo de reacción del proceso Fenton fue determinado por Haber y Weiss en 1934, quienes propusieron que el oxidante activo generado por la reacción Fenton era el radical hidroxilo. Más tarde, Barb et al., (1949) revisaron y ampliaron el mecanismo propuesto por Haber y Weiss. Walling (1975) investigó la reacción del radical $\cdot\text{OH}$ con varios sustratos orgánicos en el sistema Fenton y el destino de los resultantes radicales intermedios. De Laat y Gallard (1999) demostraron la eliminación de contaminantes orgánicos variando las condiciones de reactivos y utilizando simulación cinética basada en el mecanismo de reacción Fenton.

El mecanismo del proceso Fenton es muy complejo y puede variar con las condiciones de reacción y el tipo de catalizador. Generalmente, el proceso Fenton se realiza dentro de un sistema de tratamiento constituido por cuatro etapas: ajuste del pH, reacción de oxidación (Fenton propiamente dicho), neutralización y precipitación química. De esa forma, los contaminantes se eliminan principalmente en la etapa de oxidación y el hierro en la de coagulación-floculación posterior [Kang et al., 2000].

A continuación se muestran las reacciones principales que intervienen en el proceso Fenton [De Laat et al., 1999]:



Como se muestra en las ecuaciones (1-12) el mecanismo de reacción del proceso Fenton se debe a la generación de especies reactivas del oxígeno, que son las encargadas de la degradación oxidativa de los contaminantes que se desean eliminar. Las ROS generadas son: el radical hidroxilo (*OH), el radical hidroperóxido (HO^{2*}), su base conjugada el anión superóxido (O_2^{-*}) y los radicales peróxido (R-OO*), reflejadas en las ecuaciones 3, 4, 6, 11 y 12.

El *OH es un oxidante poderoso y no muy selectivo, capaz de degradar muchos compuestos orgánicos [Smith et al., 2006]. El radical hidroxilo se forma por descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia del ión ferroso (Ec. 4) y reacciona con los compuestos orgánicos principalmente captando un átomo de hidrógeno de los enlaces C-H, N-H y O-H, o añadiéndose a los enlaces C=C o a los anillos aromáticos [Von Sonntag et al., 1997]. La reacción del *OH con los compuestos orgánicos da lugar a la formación de radicales centrados en el carbono *R (Ec. 9).

Los radicales HO_2^* y O_2^{-*} se originan por reacción del peróxido de hidrógeno y por descomposición de los radicales R-OO* . Su presencia en disolución acuosa depende del pH, ya que ambas especies se encuentran en equilibrio (Ec. 13).

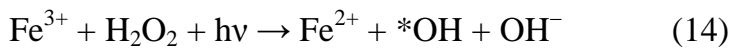


El radical hidroperóxido (HO^{2*}) es un oxidante débil que tiene una reactividad mínima en sistemas acuosos, mientras que el radical superóxido (O_2^{-*}) es un nucleófilo y un agente reductor [Smith et al., 2006]. En disolución acuosa estos radicales son poco reactivos con la mayoría de sustancias, comparados con el *OH . Los radicales HO^{2*} y O_2^{-*} pueden ser capaces de reducir los radicales peróxido a ROOH , con constantes de reacción un orden de magnitud inferior para el HO_2^* que para el O_2^{-*} [Bielski et al., 1985].

Los radicales libres centrados en el carbono (*R) reaccionan en presencia de oxígeno para formar radicales peroxilo (R-OO*) (Ec. 12), los cuales no son muy reactivos con otros contaminantes orgánicos, pero su descomposición contribuye a la degradación oxidativa de los compuestos orgánicos.

Los radicales *R, R-OO* y R-O* pueden asociarse o desproporcionarse para dar moléculas relativamente estables, o bien pueden reaccionar con los iones del hierro. Los compuestos orgánicos intermedios generados en la primera etapa de la oxidación pueden continuar reaccionando con *OH y oxígeno. La evolución del CO₂ es más lenta que la desaparición del compuesto inicial y normalmente su velocidad disminuye con el tiempo conforme los productos se vuelven menos reactivos con el *OH [Von Sonntag et al., 1997].

Cuando el proceso Fenton se lleva a cabo en presencia de radiación UV o UV/visible, la foto-química del Fe³⁺ favorece la formación de radicales hidroxilo mediante la reacción Foto-Fenton [Zepp et al., 1992] (Ec. 14).



La reacción Foto-Fenton contribuye a su vez, a la regeneración del Fe²⁺ (Ec. 14). Éste reacciona de nuevo con H₂O₂ generando más radicales hidroxilo, mediante la reacción descrita en la ecuación 4. La fotólisis del peróxido de hidrógeno también favorece, aunque en menor medida, la generación de radicales hidroxilo en el proceso Foto-Fenton (Ec. 15).



5- Procedimiento experimental

5.1- Reactivos y materiales.

Los reactivos y materiales utilizados para la experimentación desarrollada en esta investigación son los siguientes:

- Cloruro de hierro (III): reactivo sólido $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ >98%, marca Probus.
- Peroxido de hidrogeno: disolución H_2O_2 , 30% v/v, calidad para análisis, marca Panreac.
- Acido sulfúrico: H_2SO_4 96%, calidad para análisis, marca Panreac.
- Hidróxido de sodio: disolución NaOH 0,01N, marca Scharlau.
- Asa de siembra.
- Cultivo joven y puro de *E. coli*. (**Fig. 5.2**).
- Mechero Bunsen.
- Agua destilada.
- Recipientes de Borosilicato de 1000 mL.
- Vórtex agitador.
- Embudos estériles para el equipo de filtración en membrana (Millipore)
- Rampa de Filtración (Millipore)
- Filtros d membrana (Millipore, 0,45 μm diámetro de poro).
- Contador de Colonias electrónico (Interscience Scan 100).
- Estufa incubadora (Selecta Incubidit 36 L).
- Agar MacConkey (Scharlau).

- Cámara solar, ATLAS, Sun test CPS+ (**fig. 5.1**).
- Autoclave (Selecta, Presoclave II 50).
- Micropipetas diferentes volúmenes.

Es importante destacar que todo el material de vidrio y los medios de cultivos son preparados en el autoclave a 121 °C y 1 bar de presión durante 15 minutos para lograr su completa esterilización.

En este PFC la realización de los experimentos Foto-Fenton se lleva a cabo mediante una cámara solar que está equipada con una lámpara de xenon que emite luz a una longitud de onda entre 320 y 800 nm y con un Filtro especial de ventana, simulando la luz solar natural.



Fig. 5.1. Cámara Solar ATLAS SUNTEST CPS+/XLS+.

En la **tabla 5.1** se muestran las condiciones de operación del equipo.

Tabla 5.1: Condiciones de operación de la cámara solar.

<u>Equipo</u>	<u>Marca y modelo</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Intensidad de radiación</u>	<u>Longitud de onda</u>
Cámara solar	ATLAS, Sun test CPS+	35 °C	500 W/m ²	320-800 nm



Fig. 5.2. Placa petri con bacterias sembradas.

5.2- Metodología

En este apartado se desarrolla toda la metodología realizada en la experimentación de este Proyecto final de carrera, tanto los análisis de los parámetros fisicoquímicos como el análisis de *E. coli* mediante 2 métodos (Método en placa difusa y Método de Filtración por membrana).

5.2.1- Análisis de parámetros físico-químicos.

La **Tabla 5.2** muestra los parámetros físico-químicos analizados antes y después de la experimentación, los métodos analíticos y el instrumental utilizado durante el desarrollo de este proyecto.

Tabla 5.2: Parámetros físico-químicos analizados en este proyecto:

<u>Parámetro</u>	<u>Método</u>	<u>Equipo</u>	<u>Marca y modelo</u>	<u>Rango</u>	<u>Error</u>
pH	4500- HB Standard Methods	pH-metro	CRISON GLP 21	1-14	± 0,02
Turbidez	ISO 7027	Turbidímetro	HANNA Instruments LP 2000	0-1000 UNT	± 0,5 UNT
Conductividad	UNE-EN ISO 27888	Conductímetro	CRISON Basic 30	0,01-19999 µS/cm	± 0,02 µS/cm
Sólidos en suspensión	2540D Standard Methods	Espectrofotómetro	Hach LANGE DR 2800	5-750 mg/l	± 0,1 mg/l

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

5.2.2- Analisis *Escherichia. coli*.

Para llevar a cabo la cuantificación y recuento de células viables de *Escherichia coli* presentes en la muestra de agua se puede llevar a cabo mediante dos métodos diferente:

a) **Método en placa difusa (MPD)**, [Standard Methods 9215 C].

b) **Método de Filtración por membrana (MFM)** [Standard Methods 9215 D].

A continuación se procede a la explicación de dichos métodos [Clesceri et al, 2005] y a la metodología de recuento de placas.

a) Método en placa difusa (MPD)

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 UFC 100 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 24 ± 2 horas a una temperatura de 42 ± 2 °C según establece la norma (UNE EN ISO 9308-1:2000).



Figura 5.3. Colonias de *E. coli* en placa petri después de la incubación.

b) Método de Filtración por membrana (MFM)

Se trata de una de las herramientas más versátiles en el análisis microbiológico del agua. El uso del MFM 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 $0,45 \mu\text{m}$ en el soporte y se adapta el embudo. El siguiente paso sería 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 24 ± 2 horas a una temperatura de $42 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ según establece la norma (UNE EN ISO 9308-1:2000).

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

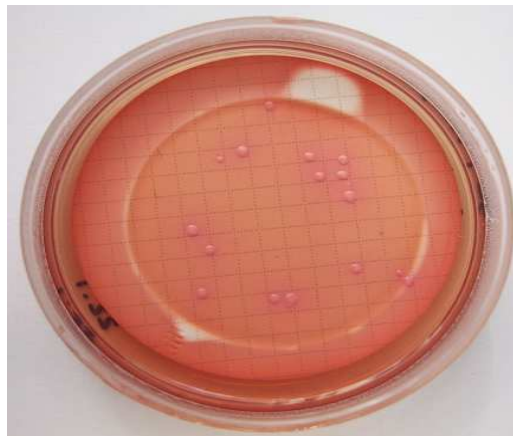


Figura 5.4. Colonias de *E. coli* en filtro con un diámetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$.

Recuento de placas

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.

Una vez ya se ha hecho el recuento de colonias se procede al calculo de la desinfección a partir de la fórmula $D = \log (\text{UFC final} / \text{UFC inicial})$. Este apartado se explica con más detalle en el ANEXO III.



Figura 5.5. Contador de colonias (Interscience Scan 100)

5.3- Preparación de las muestras

El cloruro de hierro actúa como un ácido, y dada la importancia de las condiciones de acidez para la supervivencia de las bacterias, se añade al agua antes de la adición de los microorganismos, como se explica en un estudio realizado por el grupo de investigación de “Calidad y Tratamiento de las aguas” de la Universidad de Zaragoza, [Rodríguez et al., 2011]. La adición de FeCl_3 en gran cantidad, puede llegar a provocar disminuciones de pH considerables. En el estudio nombrado se expone que pH inferiores a 5 podrían matar las bacterias y obtener de esta forma datos erróneos, por lo que es importante ajustar el pH de la muestra a 5 tras la adición del cloruro de hierro. Tras esto, se añade la suspensión bacteriana concentrada a la muestra bajo estudio.

Se preparan 4 recipientes de Borosilicato de 1 litro de capacidad, se añade agua destilada hasta enrasar después se le añade el Cloruro de hierro (III) hasta la cantidad deseada en cada uno de los recipientes y se ajusta el pH de las muestras a 5. Las concentraciones de hierro utilizadas son 5 ppm, 2,5 ppm y 1 ppm debido a estudios previos realizados por el grupo de “Calidad y Tratamiento de las aguas” de la Universidad de Zaragoza.

En este trabajo de investigación se selecciona como germen patógeno la *Escherichia coli*, como se ha indicado previamente en el apartado 3.2.3 de la presente memoria.

La fortificación se lleva a cabo a partir de cultivo bacteriano joven de *E. coli*. Se prepara una suspensión bacteriana concentrada transfiriendo colonias a un tubo de ensayo con suero fisiológico, NaCl 0,9 %, el cual ha sido previamente esterilizado en el autoclave. El número de colonias a transferir se calcula en relación a la turbidez que presenta esta suspensión. Conocida la turbidez necesaria de la suspensión bacteriana concentrada, se procede a añadir dicha suspensión al agua a tratar.

La fortificación se lleva a cabo en una atmósfera inerte creada mediante un mechero Bunsen y de esta forma no contaminar las muestras. Una vez añadidas las bacterias a los recipientes ya tendríamos preparadas las muestras y podríamos comenzar con los experimentos Fenton y Foto Fenton.

5.4- Ensayos de desinfección

Los experimentos Fenton y Foto-Fenton se realizan siguiendo la metodología que se indica a continuación:

1. Preparación de las muestras (apartado 5.3).
2. Se vierte la muestra en reactores de borosilicato esterilizados previamente en el autoclave y se añade el H_2O_2 en la concentración deseada.
3. En los experimentos Fenton, los reactores permanecen en total oscuridad desde que se adiciona el H_2O_2 hasta el final del proceso (tiempo = 60 min.).
4. En los experimentos Foto-Fenton, los reactores se introducen en una cámara solar ATLAS SUNTEST CPS+ equipada con una lámpara de Xenón que simula la radiación solar natural emitiendo luz a una longitud de onda entre 320 y 800 nm. La temperatura máxima que se alcanza dentro del recinto de la cámara se fija mediante un controlador de temperatura que evita que se alcancen temperaturas mayores a la fijada. La temperatura máxima fijada para este trabajo es 35°C. Es importante controlar la temperatura porque las bacterias se mueren a altas temperaturas, el peróxido de hidrógeno se descompone a partir de 40°C y por las pérdidas por volatilización.
5. Análisis de H_2O_2 al finalizar el ensayo.
6. Análisis de parámetros físico-químicos y *E. coli* al finalizar el ensayo.

5.5- Diseño de experimentos y análisis de variables.

Para llevar a cabo la planificación de los experimentos, mediante los cuales se pretende determinar la influencia de ciertas variables en el proceso Fenton aplicado a la desinfección, se hace uso de la técnica de diseño de experimentos.

En este trabajo se selecciona un diseño factorial 2^k . Este tipo de diseño de experimentos es uno de los más utilizados, ya que posibilita el estudio simultáneo de los efectos que varios factores pueden tener en un proceso, reduciendo así el número de experimentos que es necesario realizar. [Anderson et al., 2000]. La técnica de Diseño de Experimentos se describe con más detalle en el ANEXO IV.

La **tabla 5.3** muestra las variables y los rangos seleccionados para este trabajo de investigación.

Tabla 5.3 Variables y rangos seleccionados.

<u>Variables estudiadas</u>	<u>Rango de trabajo</u>
Condiciones de luz	Cámara solar si / no luz
Catalizador de Cloruro de hierro(III)	5 ppm, Ausencia de Fe
H ₂ O ₂	50 ppm, 20 ppm.

Estos experimentos se llevan a cabo siguiendo el procedimiento indicado previamente en el apartado 5.3.2 de acuerdo al diseño de experimentos descrito a continuación.

Para la realización de este proyecto se elige un diseño factorial (2^k) con punto central (2,5 ppm de Cloruro de hierro (III) y 35 ppm de H₂O₂) y réplica, siendo k el número de grados de libertad o de factores variables, en este caso 3 (condiciones de luz, diferentes concentraciones del catalizador y diferentes concentraciones de H₂O₂). El intervalo de confianza empleado es del 95% ($\alpha=0,05$). Teniendo en cuenta todo esto, se obtienen un total de 10 experimentos y cada uno se realiza por triplicado. Mediante

el programa MINITAB® se genera la matriz del diseño en la que figuran todos los experimentos a realizar para el diseño seleccionado. Los experimentos que se llevan a cabo en este proyecto por triplicado (un total de 30 ensayos) se presentan en la **tabla 5.4**.

Tabla 5.4 Matriz de diseño de experimentos

<u>Experimento</u>	<u>Variables</u>		
	<u>[Fe³⁺] ppm</u>	<u>[H₂O₂] ppm</u>	<u>Condiciones de Luz</u>
1	5	50	off
2	0	50	on
3	0	50	off
4	5	50	on
5	5	20	on
6	5	20	off
7	0	20	on
8	2,5	35	on
9	2,5	35	off
10	0	20	off

El factor respuesta seleccionado para este estudio es la formula de desinfección $D = \log (\text{UFC final} / \text{UFC inicial})$.

Para analizar los resultados y obtener conclusiones objetivas al respecto se utiliza el programa MINITAB ®. El objetivo principal del análisis de resultados es determinar la influencia de los factores ([Fe³⁺], [H₂O₂] y condiciones de luz) en la inactivación de la bacteria *E. coli*. Además con estos experimentos se pretende conocer las mejores condiciones de operación para la eliminación de *E. coli*.

El programa MINITAB® genera una serie de representaciones gráficas que muestran tanto de la influencia de las variables como de sus interacciones.

- Gráfica de identificación de los efectos principales: Representa el valor medio de la variable respuesta para cada nivel de cada una de las variables seleccionadas. MINITAB® une estos valores mediante una línea de referencia. Cuanto mayor es la pendiente de esta recta mayor es la influencia de la variable sobre la variable respuesta [MINITAB®, 2000].
- Gráfica de interacciones dobles: Esta gráfica muestra las medias para cada nivel de una variable cuando el nivel de un segundo factor se mantiene constante. Dos variables interaccionan cuando el cambio en la respuesta desde el nivel bajo hasta el alto de una variable no es el mismo a los dos niveles de una segunda variable. Es decir, que el efecto de una variable depende de una segunda variable. Cuando las rectas tienden a ser paralelas significa que entre ese par de variables no hay interacción o que ésta es poco significativa. En cambio, cuando las rectas tienden a cortarse quiere decir que hay interacción entre esas dos variables.
- Diagrama de Pareto: permite identificar tanto la magnitud como la importancia del efecto de una variable. Este diagrama muestra el valor absoluto de las variables, y dibuja una línea de referencia en el diagrama. Cualquier efecto que sobrepase esta línea de referencia es potencialmente importante.

Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis, para el control de métodos analíticos. Los ejemplos de aplicación son múltiples, pudiéndose agrupar, según el objetivo que persiguen, en dos principalmente:

- La comparación de múltiples columnas de datos.
- La estimación de los componentes de variación de un proceso.

La comparación de diversos conjuntos de resultados es habitual en los laboratorios analíticos. Hay dos posibles fuentes de variación: una es el error aleatorio en la medida y la otra es lo que se denomina factor controlado (tipo de método, diferentes condiciones, analista o laboratorio,...).

Una de las herramientas estadísticas más utilizadas que permite la separación de las diversas fuentes de variación es el análisis de la varianza (ANOVA).

Cuando tengamos un factor, controlado o aleatorio, aparte del error propio de la medida, hablaremos del ANOVA de un factor. En los casos donde tenemos dos o más factores que influyen, se realizan los experimentos para todas las combinaciones de los factores estudiados, seguido del ANOVA. Se puede deducir entonces si cada uno de los factores o una interacción entre ellos tienen influencia significativa en el resultado.

El objetivo del ANOVA es comparar los errores sistemáticos con los aleatorios obtenidos al realizar diversos análisis en el laboratorio y comparar los diversos valores medios para determinar si alguno de ellos difiere significativamente del resto. Lo más importante en el análisis de varianza ANOVA es el valor p. Valores de $p < 0.05$ indican que existen diferencias entre las medias de las variables.

6- Resultados de la experimentación.

6.1- Resultados de análisis previos.

En este apartado se muestran resultados de experimentos realizados previamente al diseño de experimentos con el objetivo de obtener una valorización previa de la aplicación del proceso Fenton y Foto-Fenton.

Las condiciones de operación de estos ensayos son: concentración de Cloruro de Hierro (III) de 1ppm, concentraciones de 50 ppm y 20 ppm de peroxido de hidrogeno y presencia o ausencia de luz solar. En estos experimentos se analizan los parámetros físico-químicos y la concentración de *E. coli*. Los resultados obtenidos en el analisis de parámetros físico-químicos se muestran en la **tabla 6.1** y se calculan como promedio de las tres replicas utilizadas para cada ensayo Fenton. Los resultados de inactivación de la bacteria *E. coli* se muestran en la **tabla 6.2**.

Tabla 6.1 Resultados previos del analisis de parámetros físico-químicos.

Experimento	Fe (ppm)	H2O2 (ppm)	Luz	<u>INICIALES</u>				<u>FINALES</u>			
				pH	Cond (µS/cm)	SS (mg/L)	Turbidez	pH	Cond (µS/cm)	SS (mg/L)	Turbidez
A	1	50	on	5,4	185,8	3	9,3	5,7	234,3	4	17,0
B	1	50	off	5,4	184,2	3	9,2	5,6	239,3	3	13,8
C	1	20	on	5	214,9	6	18,9	5,8	231,3	5	18,8
D	1	20	off	5,4	295	2	3,9	5,7	104,5	4	17,5

Se observa en la **tabla 6.1** un ligero aumento del pH después de la experimentación debido a la reacción de Fe con el H₂O₂ y también se observa un aumento de la turbidez en todos los ensayos realizados.

Tabla 6.2. Resultados de inactivación de *E. coli*.

<u>Experimento</u>	<u>Fe (ppm)</u>	<u>H₂O₂</u> <u>(ppm)</u>	<u>Luz</u>	<u>Desinfección (Log Nt/No)</u>
A	1	50	on	4,32
B	1	50	off	0,87
C	1	20	on	3,96
D	1	20	off	0,79

En la **tabla 6.2** se observa claramente una mayor desinfección cuando se realizan procesos Foto-Fenton, obteniendo máximos resultados de desinfección de 4,32. En los resultados mostrados también se refleja que se obtiene mayor desinfección al aumentar la concentración de H₂O₂.

6.2- Resultados de los ensayos incluidos en el diseño de experimentos.

6.2.1 Estudio de parámetros físico-químicos.

Los resultados del análisis de los parámetros físico-químicos iniciales y finales obtenidos como promedio de los diversos experimentos realizados a las distintas condiciones propuestas aparecen en la **Tabla 6.3**. Los resultados son medias de las 3 replicas analizadas para cada experimento, en el ANEXO V se muestran todos los resultados completos con sus respectivas replicas.

Tabla 6.3 Resultados del análisis de parámetros físico-químicos.

				<u>INICIALES</u>				<u>FINALES</u>			
Experimento	Fe (ppm)	H ₂ O ₂ (ppm)	Luz	pH	Cond (μS)	SS (mg/L)	Turbidez	pH	Cond (μS)	SS (mg/L)	Turbidez
1	5	50	off	5,6	105,4	3	11,4	6,2	110,4	2	13,5
2	0	50	on	6,3	233,1	2	7,7	5,1	141,5	2	4,7
3	0	50	off	5,2	94,4	2	4,6	5,0	94,6	2	2,3
4	5	50	on	5,6	115,6	2	2	5,9	166,4	3	12,8
5	5	20	on	5,7	348	2	6,2	6,5	46,2	5	49,3
6	5	20	off	5,7	348	2	6,2	6,4	75,2	6	52,6
7	0	20	on	4,9	174,7	2	5,2	6,2	185,5	2	3,4
8	3	35	on	5,6	319	3	4,5	5,5	31,4	5	33,5
9	3	35	off	5,6	319	3	4,5	5,1	33,5	3	23,6
10	0	20	off	5,2	94,4	2	4,6	5,1	92,7	2	3,1

Se observa en la **tabla 6.3** un aumento del pH después de la experimentación debido a la reacción del Fe³⁺ con el H₂O₂ y también se observa en un pequeño aumento de la turbidez debido también a la reacción que se lleva a cabo.

6.2.2 Resultados de desinfección.

Los resultados de desinfección obtenidos como promedio de los diversos experimentos realizados a las distintas condiciones propuestas y siguiendo los pasos de la experimentación detallada en apartados anteriores de la presente memoria aparecen en la **Tabla 6.4**. Los resultados son medias de las 3 replicas analizadas para cada experimento. Al finalizar los ensayos, se detecta siempre H_2O_2 en la muestra tratada.

Tabla 6.4. Resultados de desinfección.

<u>Experimento</u>	<u>Fe³⁺ (ppm)</u>	<u>H₂O₂ (ppm)</u>	<u>Luz</u>	<u>Desinfección (Log Nt/No)</u>
1	5	50	off	2,16
2	0	50	on	5,63
3	0	50	off	1,22
4	5	50	on	5,17
5	5	20	on	5,81
6	5	20	off	1,72
7	0	20	on	4,43
8	2,5	35	on	5,17
9	2,5	35	off	0,05
10	0	20	off	0,75

Se puede observar en la **tabla 6.4** que las desinfecciones más altas son siempre en presencia de luz solar, lo que parece indicar que la variable más significativa es la radiación solar. Es interesante observar que se han obtenido resultados altos a concentraciones más bajas de H_2O_2 , es un dato importante económicamente ya que el H_2O_2 es un reactivo caro.

Se observa que los mejores resultados de desinfección se obtienen para las siguientes condiciones:

- Desinfección de 5,81log: 5 ppm de Fe, 20 ppm de H₂O₂ y con luz.
- Desinfección de 5,17 log: 2,5 ppm Fe, 35 ppm de H₂O₂ y con luz.
- Desinfección de 5,17 log: 5 ppm Fe, 50 ppm de H₂O₂ y con luz.
- Desinfección de 2,16 log: 5 ppm Fe, 50 ppm de H₂O₂ y sin luz.
- Desinfección de 5,63 log: 0 ppm Fe, 50 ppm de H₂O₂ y con luz.

A continuación, se muestra la influencia de las variables sobre el factor respuesta.

6.3- Análisis de variables

Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de ANOVA del estudio realizado en este proyecto se resume en las **tablas 6.5 y 6.6**.

Tabla 6.5. Analisis de variables.

Estimated Effects and Coefficients					
Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		-3,317	0,1148	-28,89	0,000
[H2O2]	-0,278	-0,139	0,1148	-1,21	0,239
[Fe]	-0,793	-0,397	0,1148	-3,45	0,002
luz	4,135	2,068	0,1027	20,13	0,000
[H2O2]*[Fe]	0,378	0,189	0,1148	1,65	0,114
[H2O2]*luz	0,002	0,001	0,1148	0,01	0,994
[Fe]*luz	-0,337	-0,168	0,1148	-1,47	0,157
[H2O2]*[Fe]*luz	-0,542	-0,271	0,1148	-2,36	0,028
Ct Pt	0,705	0,2567	2,75	0,012	

Tabla 6.6. Analisis de varianza ANOVA.

Analysis of Variance						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	3	132.5	132.498	44.166	139.6	0
2-Way Interactions	3	1.539	1.539	0.513	1.62	0.214
3-Way Interactions	1	1.76	1.76	1.7604	5.56	0.028
Curvature	1	2.386	2.386	2.3857	7.545	0.012
Residual Error	21	6.644	6.644	0.3164		
Lack of Fit	1	1.806	1.806	1.8057	7.46	0.013
Pure Error	20	4.838	4.838	0.2419		
Total	29	144827				

DF: Grados de libertad factoriales.

Seq SS: Suma de cuadrados (SS)

Adj SS: Suma de cuadrados (SS).

Adj MS: Promedio de los cuadrados (MS)

F: Valor estadístico de contraste (MS-factor/MS-error).

P: Valor de probabilidad.

$\alpha = 0,05$ con un intervalo de confianza a un nivel del 95%.

El valor de probabilidad (**P**) que aparece en las **Tablas 6.5 y 6.6** indica aquel valor de a partir del cual el ANOVA no detectaría ninguna diferencia significativa. Así pues, a menor valor de probabilidad, mayor seguridad de que existen diferencias significativas.

A continuación se analizan las interacciones de cada variable por separado:

Como se observa en la **tabla 6.5** la variable [**H2O2**] tiene un valor de ($P = 0,239$) que es mayor que el nivel de significancia ($0,05$) por lo tanto es una variable que no tiene mucha interacción. Por el contrario la variable [**Fe**] tiene un valor de ($P = 0,002$) que es menor que el nivel de significancia ($0,05$) por lo tanto esta variable tiene influencia

en el proceso Fenton. La variable **Luz** tiene un valor de ($P= 0,000$) que es menor que el nivel de significancia ($0,05$) esta es la variable con menos valor de (P) por lo tanto es la variable más influyente de todas y la más importante en el proceso Fenton.

A continuación se analizan las interacciones de las variables de dos en dos y las tres a la vez:

La variable **[H₂O₂]*[Fe]** tiene un valor de ($P = 0,114$) que es mayor que el nivel de significancia ($0,05$) por lo tanto se puede concluir que no existe interacción entre las dos variables.

La variable **[H₂O₂]*luz** tiene un valor de ($P = 0,994$) que es mayor que el nivel de significancia ($0,05$) por lo tanto se puede concluir que no existe interacción entre estas dos variables.

La variable **[Fe]*luz** tiene un valor de ($P = 0,157$) que es mayor que el nivel de significancia ($0,05$) por lo tanto se concluye que tampoco existe interacción entre estas dos variables.

La variable **[H₂O₂]*[Fe]*luz** tiene un valor de ($P = 0,028$) que es menor que el nivel de significancia ($0,05$) por lo tanto se concluye que entre estas tres variables si que existe interacción.

Como conclusión final a partir del análisis de varianza ANOVA se puede determinar que la variable más significativa del proceso Fenton es la presencia de la luz solar destacando por encima de las demás variables, también hay que destacar la importancia de la interacción de las tres variables en conjunto en el proceso Fenton.

Para evaluar la importancia de los efectos de las variables y sus combinaciones sobre la variable respuesta de forma más fiable es recomendable realizar un diagrama de Pareto. Se representan los resultados de la experimentación con MINITAB en la siguiente grafica de Pareto, **Figura 6.3**.

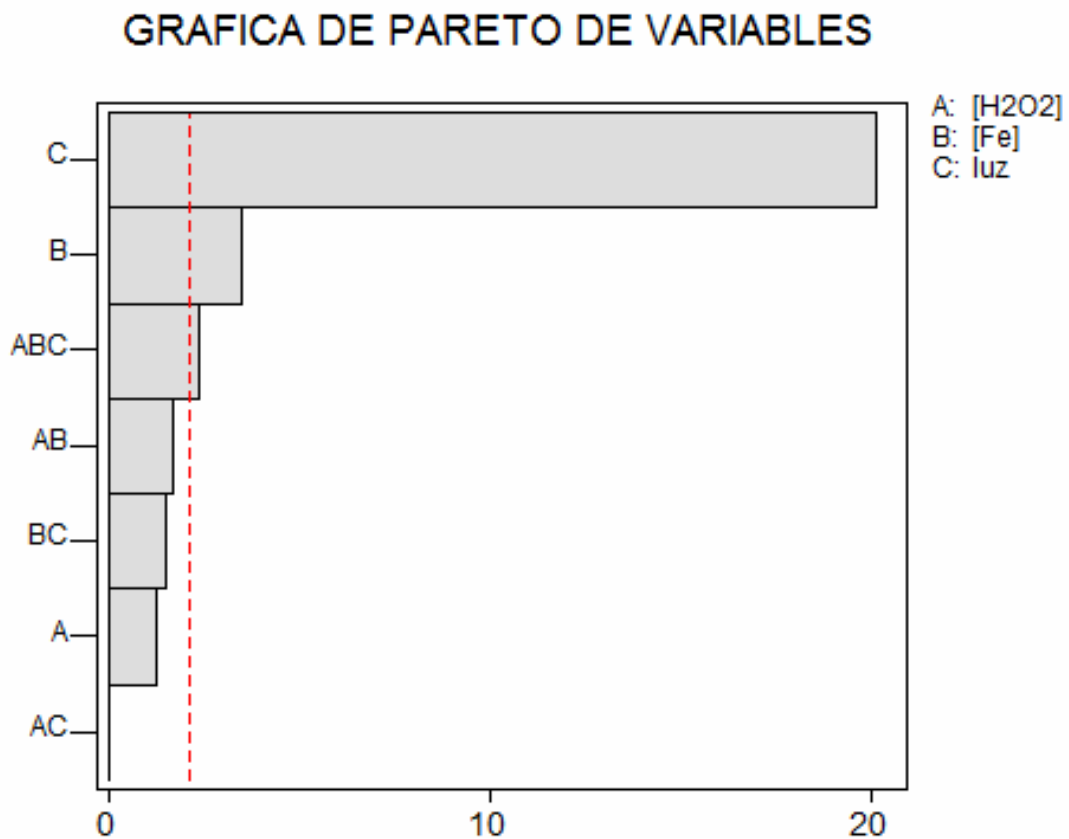


Figura 6.3: Diagrama de Pareto de la desinfección de *E. coli*.

Factores ordenados de mayor a menor influencia, son:

- Radiación solar.
- Concentración de Cloruro de Hierro (III).
- Las tres variables en conjunto (Cloruro de Hierro (III), peróxido de hidrogeno y radiación solar).

Todos los efectos que sobrepasan la línea de referencia son considerados como significativos. En la gráfica de Pareto mostrada se observa como la variable más influyente es la presencia / ausencia de luz, además la variable cloruro de hierro (III) también es significativa en el estudio realizado. Para finalizar, indicar que la interacción de las tres variables seleccionadas supera ligeramente la línea que marca las influencias significativas. Viendo la gran diferencia existente entre la variable luz y la interacción luz / Cloruro de Hierro (III) / H₂O₂ se puede excluir esta interacción de las variables influyentes y simplificar el proceso para diseños posteriores.

La **gráfica 6.4** representa la gráfica de identificación de los efectos principales, obtenida a partir de los resultados mostrados en la **Tabla 6.2**. Esta gráfica permite conocer si las variables estudiadas tienen efecto negativo o positivo sobre la variable respuesta. La importancia del efecto de cada variable sobre la variable respuesta viene marcada por la pendiente de la recta.

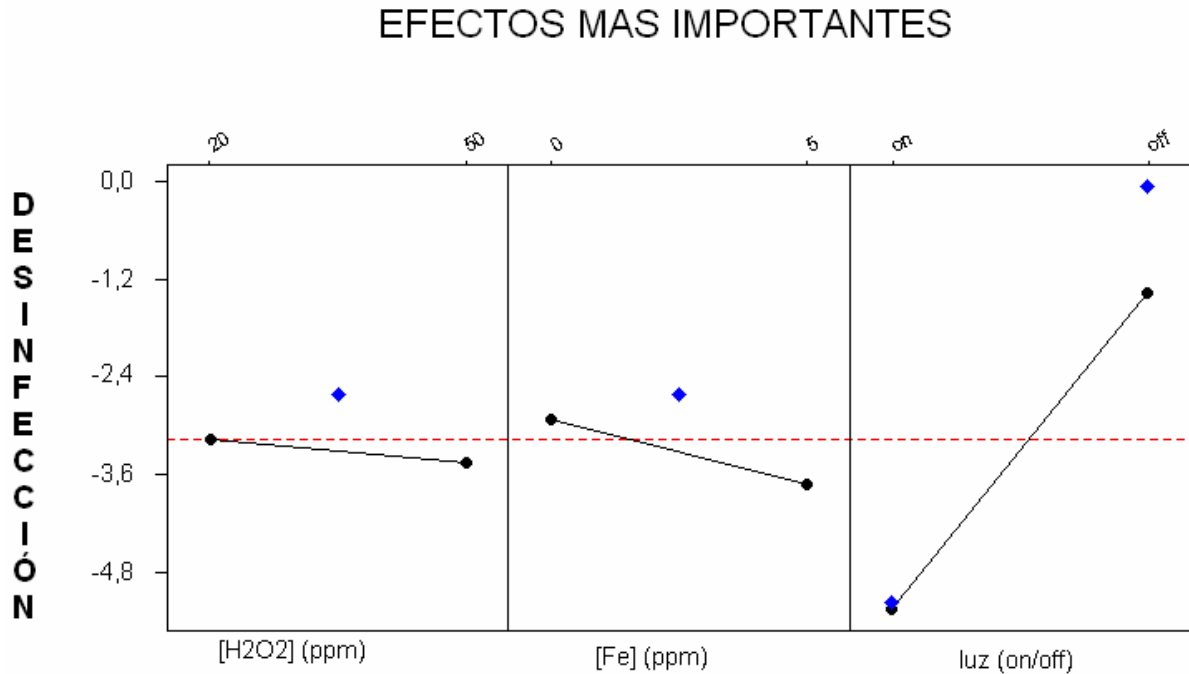


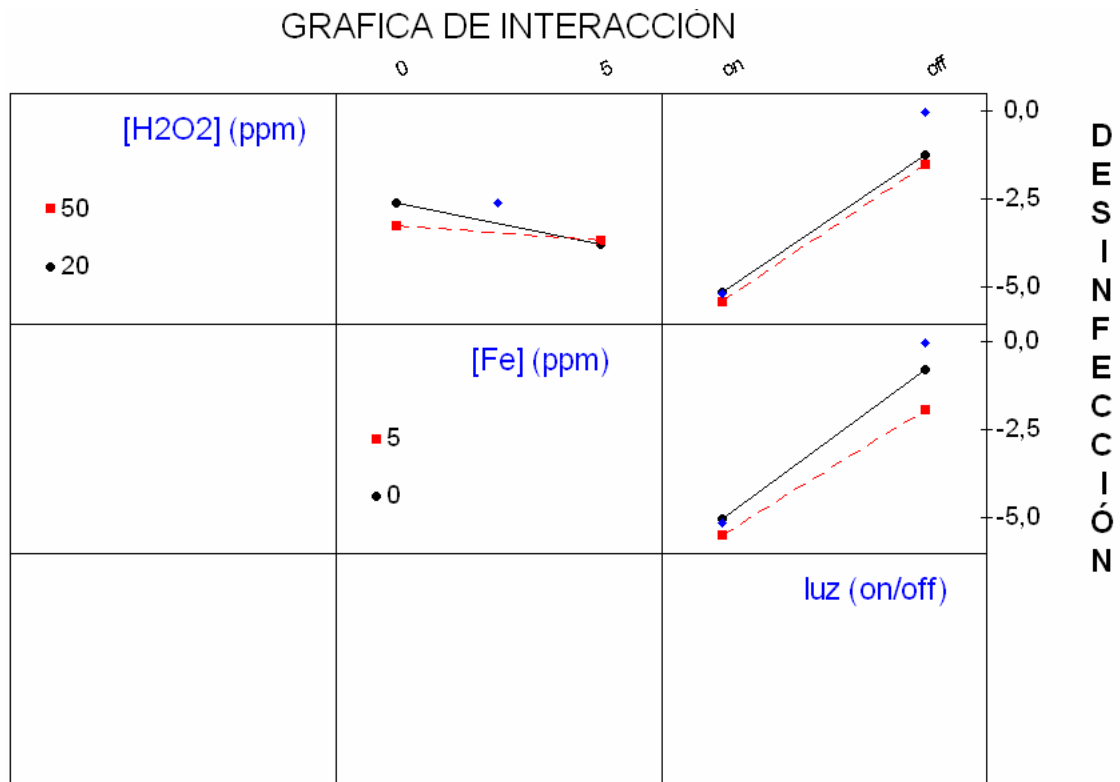
Figura 6.4: Gráfica de los efectos principales.

Efecto del peróxido en la desinfección: Se observa en la figura 6.4 un efecto ligeramente positivo debido a que la grafica tiene una pendiente negativa ya que el grado de desinfección se representa con signo negativo, es decir, que a medida que aumenta la concentración de peróxido aumenta la desinfección ligeramente. El punto central sugiere que la relación no es totalmente lineal sino que tiene cierta curvatura.

Efecto del cloruro de hierro (III) en la desinfección: La grafica 6.4 muestra una pendiente negativa en el cloruro de hierro (III) por lo que es un efecto positivo ya que si aumentamos la concentración de cloruro de hierro (III) aumenta la desinfección y en mayor medida que con la variable de concentración de peróxido por que la pendiente está más inclinada, en conclusión es mas importante en la desinfección la variable de concentración de cloruro de hierro (III) que la de peróxido. El punto central sugiere también que la relación no es lineal si no que tiene cierta curvatura.

Efecto de la luz: Se observa en la grafica 6.4 un efecto muy positivo debido a que la pendiente es positiva y es la que tiene mayor pendiente de las tres por lo tanto la variable más importante en la experimentación ya que con la luz solar los valores de desinfección son mucho más altos que sin luz solar.

Para determinar las interacciones existentes entre las tres variables se utiliza el gráfico de interacciones dobles. Rectas paralelas indican que no existe interacción, mientras que si tienden a cruzarse o cortarse indican lo contrario. Este gráfico se muestra en la **grafica 6.5.**



Gra

figa 6.5: Grafica de interacción.

Se estudian las tres interacciones de variables existentes por separado para poder explicar el comportamiento del tratamiento de forma más minuciosa:

- **Cloruro de hierro (III) - H₂O₂:** Esta interacción es la más importante puesto que las dos rectas se cruzan y eso quiere decir que hay interacción entre la variable de [cloruro de hierro (III)] y [H₂O₂]. Al aumentar la concentración de cloruro de hierro (III) aumenta la desinfección pero no se aprecia casi aumento en la desinfección al aumentar de 20 ppm de peróxido a 50 ppm de peróxido, ya que las 2 rectas se cruzan y se obtienen valores de desinfección parecidos tanto para 20 ppm de peróxido como para 50 ppm de peróxido con los 5 ppm de cloruro de hierro (III).
- **Cloruro de hierro (III) - Luz:** Existe una pequeña interacción entre ambas variables ya que las rectas tienden a cortarse. En presencia de luz solar no hay interacción con el cloruro de hierro (III) ya que los valores de desinfección son casi los mismos, pero sin presencia de luz solar si que se observa influencia del

cloruro de hierro (III) ya que obtenemos mas desinfección con 5 ppm de cloruro de hierro (III) que sin cloruro de hierro (III).

- **H₂O₂ - Luz:** La interacción en este caso es casi inexistente, puesto que las rectas son prácticamente paralelas lo que indica que no hay interacción entre estas 2 variables. En conclusión la desinfección aumenta mucho con la presencia de la luz solar y queda claro que es la variable más significativa, la desinfección aumenta muy poco al aumentar de 20 ppm de peróxido a 50 ppm, los valores de desinfección son casi los mismos.

Conocidos los comportamientos de las distintas variables durante los tratamientos para la bacteria analizada, se pueden sacar una serie de conclusiones acerca de lo sucedido durante el transcurso de los mismos y a partir de ello, determinar cuáles son las mejores condiciones de trabajo.

La conclusión más aparente es la importancia de la presencia de luz y de peróxido de hidrógeno en el tratamiento. Su presencia es imprescindible puesto que los procesos de oxidación avanzada se basan en la generación de especies reactivas del oxígeno como son los radicales hidroxilo (OH·) o los radicales superóxido (O₂⁻), y éstos se obtienen por reacción del peróxido de hidrógeno. Estos radicales reaccionan con los componentes celulares provocando lesiones que conducen a la inactivación o incluso a la muerte celular. Además en contacto con el hierro presente en la célula, necesario para las actividades vitales básicas de la misma, se produce un aumento de radicales intracelulares a través de una reacción Fenton, que aumentan el efecto letal inicial de los radicales [Malato et al., 2009].

La variable radiación solar (luz) favorece la formación de los radicales mencionados anteriormente, que son en los que se basan los tratamientos aplicados. Las células contienen cromóforos intracelulares que absorben la radiación UV-A y UV-B, lo que en presencia de oxígeno resulta tóxico para la célula pues favorece la generación de especies reactivas de oxígeno [Tyrrel & Keyse, 1990].

La presencia de hierro es importante puesto que es uno de los reactivos usados en los tratamientos Fenton. Para que el hierro tome parte en las reacciones Fenton, es necesario que se encuentre en disolución puesto que así formará los complejos más activos en términos de fotoactividad, de ahí la importancia de trabajar a $\text{pH}=5$ [Malato et al., 2009].

De acuerdo con lo concluido anteriormente, se puede afirmar que el tratamiento más efectivo corresponderá a aquel en el que exista hierro y en el que se trabaje en presencia de la luz solar y la dosis optima de peróxido de hidrógeno que es la variable que menos influye pero es imprescindible como ya hemos explicado antes. Siendo en siguiente lugar necesario determinar las dosis óptimas de cada una de las variables.

7- Conclusiones

Las principales conclusiones extraídas de este Proyecto Final de Carrera son las siguientes:

- En la aplicación de los procesos Fenton / Foto-Fenton en desinfección de *E. coli* se han obtenido valores de desinfección altos como (5,8 / 5,17 / 5,63) por lo que se ha demostrado en este PFC que el proceso Fenton funciona correctamente en la desinfección de *E. coli*.
- En el estudio de las variables del proceso Fenton se llega a la conclusión de que la variable más significativa es la presencia de la luz solar por encima de las demás variables, y según lo obtenido en la grafica de Pareto otra variable que es significativa pero en menor medida es la concentración de Fe. En cuanto al peróxido de hidrogeno es la variable menos influyente en los experimentos realizados.
- Por último se concluye que las condiciones óptimas de operación en el tratamiento Fenton para la desinfección de *E. coli* son la presencia de luz solar, 5 ppm de Fe y 20 ppm de peróxido de hidrógeno, obteniendo con estos parámetros una desinfección de 5,8log, el cual es el valor más alto obtenido en la experimentación de este PFC, correspondiente a la eliminación total de la bacteria en la muestra de agua.

ANEXOS

ÍNDICE

- ANEXO I PROCESOS FENTON.
- ANEXO II DESARROLLO DEL MÉTODO ANÁLITICO.
- ANEXO III METODOLOGIA DE LA MICROBIOLOGIA.
- ANEXO IV TEORÍA DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS.
- ANEXO V RESULTADOS DE TODOS LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EN ESTE PROYECTO FIN DE CARRERA.

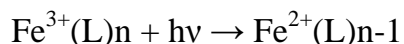
ANEXO I PROCESOS FENTON

1-Proceso Foto-Fenton

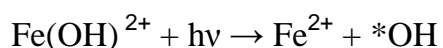
Tras el descubrimiento del proceso Fenton, las sucesivas investigaciones pronto revelaron que las reacciones que intervenían en este proceso eran notablemente aceleradas por la luz. En las reacciones Fenton foto-asistidas (reacciones Foto-Fenton) la irradiación de las disoluciones Fenton con luz ultravioleta (UV) o UV/visible normalmente da lugar a mayores velocidades de reacción y a rendimientos de mineralización más elevados que en el Fenton clásico [Ruppert et al., 1993]. Estas mejoras son debidas casi en su totalidad a la fotoquímica del Fe^{3+} .

Fotólisis de las especies del Fe^{3+}

Los complejos de Fe^{3+} experimentan excitación por transferencia de carga entre el ligando y el metal (LMCT), disociándose para dar Fe^{2+} y un ligando oxidado. La fotoquímica del Fe^{3+} supone una ventaja para este proceso porque el hierro reducido puede reaccionar con el H_2O_2 para producir $\cdot\text{OH}$ y porque la oxidación del ligando puede dar lugar a una degradación mayor del contaminante. La fotólisis del Fe^{2+} no es importante a las longitudes de onda empleadas en el proceso Foto-Fenton [Pignatello, 1992].



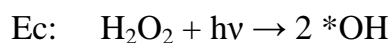
Los hidrox-complejos de Fe^{3+} presentes en disolución acuosa ligeramente acidificada, como el $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ y el $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ absorben luz apreciablemente en las regiones UV y visible. Estos complejos experimentan foto-reducción para dar $\cdot\text{OH}$ y Fe^{2+} .



Además, el Fe^{3+} puede acomplejarse con ciertos compuestos o sus subproductos. Estos complejos normalmente tienen mayores coeficientes de absorción molar en las regiones UV y visible que los complejos acuosos. Por eso los complejos de Fe^{3+} podrían ser de mayor importancia para el proceso Fenton que las especies simples acuosas del Fe^{3+} .

Fotólisis del peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno también experimenta fotólisis con la luz ultravioleta:



Aunque esta reacción tiene una eficacia cuántica relativamente elevada, su contribución en aplicaciones Foto-Fenton está limitada por la débil absorción de la luz por el H_2O_2 y el fuerte “efecto filtro interno” que producen el hierro y los compuestos orgánicos al absorber parte de la luz. Sin embargo, la fotólisis del peróxido puede contribuir a la formación de radicales hidroxilo a bajas concentraciones de hierro y absorbentes orgánicos o a concentraciones muy elevadas de peróxido.

Contribución de las diferentes reacciones fotoquímicas a la mejora de las reacciones Fenton

Hay muchas reacciones químicas posibles en los sistemas Fenton irradiados. La contribución de una reacción dada a la degradación de los compuestos orgánicos depende del espectro de emisión de la fuente, la concentración y la absorbancia de las especies foto-reactivas, la eficiencia cuántica de la reacción y la presencia y concentración de otras especies que absorban luz en el sistema, es decir, el efecto

filtro (éste limita el volumen del reactor). Además, la concentración y la absorbancia de las especies fotoactivas y no fotoactivas cambian durante el transcurso de la reacción [Pignatello et al., 2006].

Mientras que en teoría la velocidad de reacción debería aumentar con la potencia radiante, en la práctica puede haber un límite superior, que se alcanza cuando la foto-reducción del hierro sobrepasa su re-oxidación, es decir, cuando el hierro en forma de Fe^{3+} es una pequeña parte del hierro total.

2-Proceso Fenton utilizando complejos de hierro como catalizadores.

El hierro quelado ha sido utilizado en algunas ocasiones para llevar a cabo la degradación de compuestos en procesos Fenton. La quelación amplía el rango de pH en el que el hierro es soluble, ya que el ligando quelante compite favorablemente con el ion hidróxido para coordinarse, esto permite que los complejos quelados sean solubles. Además, la quelación puede acelerar la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno en radicales hidroxilo catalizada por Fe^{2+} (Ec. 4). Por otra parte, la quelación puede retardar las reacciones entre el Fe^{3+} y el peróxido (Ec. 1, 2 y 3), y el agente quelante (libre o acomplexado) puede capturar radicales hidroxilo [Sun et al., 1992].

3-Proceso Fenton heterogéneo.

Con el fin de evitar el problema de generación de fangos de óxido de hierro y su correspondiente gestión, inherente al tratamiento Fenton en aguas residuales, así como para ampliar el campo de aplicación de este proceso a suelos u otros materiales, se ha promovido la investigación de reacciones Fenton heterogéneas y la preparación de catalizadores de hierro soportado.

El Fenton heterogéneo consiste en utilizar un catalizador en estado sólido, ya sea un compuesto o material sólido rico en hierro (lana de acero, minerales de hierro) o un catalizador que contenga hierro soportado (membranas de Nafion, arcillas de hierro modificadas). Aunque, por lo general, la oxidación tiene lugar más despacio, las reacciones heterogéneas son a veces más eficientes, ya que consumen menos peróxido por mol de contaminante degradado. Además, los catalizadores de hierro soportado pueden ampliar el rango efectivo de pH del proceso [Pignatello et al., 2006].

4-Fenton.

Los métodos electro-Fenton incluyen reacciones electroquímicas que se usan para generar “in situ” uno o ambos de los reactivos empleados en el proceso Fenton. El reactivo o reactivos generados dependen del potencial de la celda, las condiciones de la disolución y la naturaleza de los electrodos. Los iones ferrosos pueden ser producidos por disolución oxidativa de ánodos de sacrificio de hierro, o mediante reducción de iones férricos en un cátodo inerte, como el platino. Los electrodos deben tener un área superficial específica lo suficientemente grande para alcanzar las concentraciones óptimas de hierro disuelto. El peróxido de hidrógeno puede producirse por reducción de oxígeno (O_2) en el cátodo [Chou et al., 1999]. La generación “in situ” de los reactivos supone, en algunas aplicaciones, una ventaja con respecto a la tecnología convencional de bombear los reactivos desde una reserva externa.

5-Influencia de los factores que intervienen en el proceso Fenton.

En general, el tiempo y las cantidades de reactivos necesarias estarán en función de la concentración inicial de compuestos oxidables y de la concentración final de estos que se desea obtener. En los ensayos a nivel de laboratorio todos los reactivos se añaden a la vez, mientras que a gran escala esto no es viable, ya que la reacción es altamente exotérmica, y el peróxido debe ser añadido lentamente para prevenir el calentamiento excesivo.

a) Influencia del pH.

Para muchos compuestos, la literatura indica que el pH ideal para llevar a cabo la reacción Fenton está entre 3 y 4 [Bigda, 1995]. A pH entre 3 y 4, el peróxido de hidrógeno es más estable y al sobrepasar un pH de 5, su velocidad de descomposición aumenta rápidamente y se produce desactivación del catalizador por la formación de hidroxocomplejos de hierro, lo que hace disminuir la eficacia del proceso.

Otros autores afirman que el pH óptimo para la degradación de materia orgánica en el proceso Fenton se encuentra entre 3,5 y 6 [Kang et al., 2000] o entre 2,5 y 6 [Jiang et al., 2010]. Esto se debe a que, por una parte, la degradación de materia orgánica por oxidación es más eficaz a pH menores que 4, y por otra, la eliminación por coagulación aumenta al aumentar el pH, aunque principalmente precipitan oxihidróxidos de hierro (III) produciendo un fango no deseado en las aplicaciones tecnológicas. El proceso “Fenton-like” es más sensible al pH, siendo su rango óptimo de pH entre 2,8 y 3,8.

Por otra parte, diversos estudios realizados han demostrado que a pH entre 3 y 8, la reacción entre el Fe^{2+} y el H_2O_2 en agua produce eficazmente radicales hidroxilo. Esta reacción tiene lugar incluso a los valores neutros de pH que se encuentran normalmente en las aguas contaminadas [Zepp et al., 1992].

b) Efecto de la dosis de H₂O₂.

La eliminación de materia orgánica aumenta al aumentar la dosis de peróxido de hidrógeno. Para que la oxidación sea completa ha de utilizarse un ratio peróxido de hidrógeno / materia orgánica adecuado [Bigda, 1995].

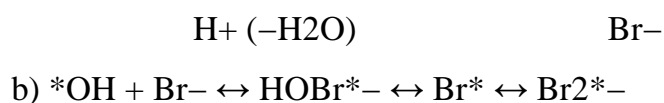
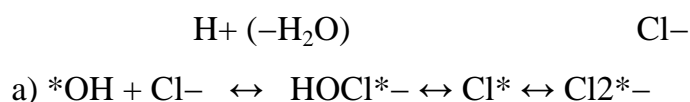
c) Influencia de la dosis de catalizador de hierro.

La degradación de compuestos es más eficaz al aumentar la dosis de hierro, aunque la eliminación por oxidación disminuye ligeramente. La concentración inicial de hierro y la temperatura determinan la velocidad de oxidación. Algunos autores consideran que el ratio óptimo catalizador: peróxido es 1:5 (en peso) [Bigda, 1995], mientras que otros indican que es algo mayor, 1:10 [Tang et al., 1996]. Sin embargo, normalmente mucho menos hierro es necesario, por ejemplo, los ratios utilizados en el tratamiento de aguas normalmente se encuentran entre un valor hierro: peróxido de 1:100 o 1:1000 (molar) con el fin de minimizar la captura de radicales hidroxilo por el Fe²⁺ y reducir la producción de oxihidroxidos férricos [De Laat et al., 1999].

d) Influencia de la presencia de iones inorgánicos.

La oxidación de los compuestos orgánicos en procesos Fenton y Foto-Fenton es inhibida en distinta medida por los iones fosfato, sulfato, organosulfonato, fluoruro, bromuro y cloruro, dependiendo de sus concentraciones. Estos aniones pueden estar presentes en el agua a tratar, o bien formarse como subproductos de los compuestos que son degradados. La inhibición causada por estas especies puede ser debida a la precipitación del hierro, el “scavenging” de los radicales hidroxilos o la coordinación con el Fe³⁺ disuelto, para formar complejos menos reactivos.

La inhibición de las reacciones Fenton por los aniones Cl^- y Br^- es debida a la captura de $^*\text{OH}$, tal como muestran las ecuaciones a) y b), puesto que estos iones son ligandos relativamente débiles del Fe^{3+} . Esto limita el tratamiento Fenton en efluentes residuales que contengan una elevada concentración de sales de haluros [Pignatello, 1992].



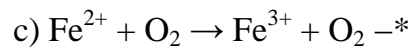
Por otra parte, los fluoruros y sulfatos inhiben la reacción Fenton incluso aunque apenas atrapen los radicales hidroxilos y sus complejos con el hierro sean solubles. Estos iones reducen la reactividad del Fe^{3+} mediante coordinación. El Fe^{3+} forma una mezcla de complejos de FeSO_4^{4+} y $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2^{2-}$ en la presencia de sulfato [De Laat et al., 2005]. La afinidad del ión férrico por el fluoruro es muy elevada, con elevadas constantes de formación para los complejos de mono-, di- y trifluoruro. Los complejos formados no actúan como catalizadores de la reacción Fenton.

5-Influencia de la presencia de oxígeno.

La presencia de oxígeno (O_2) en concentración casi invariable, produce una mayor mineralización de los compuestos orgánicos a CO_2 . El oxígeno actúa de dos formas: sirve como un oxidante adicional y acelera la velocidad de reacción. Puesto que el oxígeno, si se emplea aire como “reactivo”, es deseable canalizar el mecanismo de reacción de forma que se consuma O_2 preferiblemente a H_2O_2 . Además, el O_2 normalmente acelera la velocidad de mineralización en las reacciones foto-Fenton.

La oxidación directa del Fe^{2+} por el oxígeno (Ec c) es extremadamente lenta a niveles de pH en los que el Fe^{3+} es soluble, y por eso, normalmente no contribuye a las

reacciones Fenton a pH menor de 4. Sin embargo, a pH mayor que 4, podría ser importante [King, 1998].



ANEXO II DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

1-pH.

El pH es la medida del grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa y se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones H^+ .

Para determinar el pH de las muestras acuosas se utiliza un pH-metro marca CRISON, modelo GLP 21, previamente calibrado con disoluciones tampón de pH 7,00 y 4,01. El método utilizado es el 4500-HB del Standard Methods [Clesceri et al., 2005].

2-Turbidez

Se define como la reducción de la transparencia de un líquido originada por la presencia de materias sin disolver.

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

3-Conductividad.

Es la expresión numérica de la capacidad de un agua para transportar la corriente eléctrica. Indica la concentración total de iones en el agua.

La determinación se realiza utilizando un conductímetro *CRISON* modelo *Basic 30*, provisto de una célula de dos electrodos y de acuerdo a la norma UNE-EN ISO 27888:1994. Para conocer la conductividad de una muestra se introduce la célula en ella, se agita y se espera unos minutos antes de tomar el valor. Los resultados se expresan en mS/cm o en $\mu\text{S}/\text{cm}$, según el rango de trabajo.

4-Sólidos en suspensión totales (SST).

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

5-Hierro total.

La determinación del hierro total se lleva a cabo mediante un fotómetro multiparámetro de sobremesa, marca *Hanna Instruments*, modelo *HI 83099*. El método empleado es una adaptación del método 3500-Fe B de Standard Methods [Clesceri et al., 2005]. La reacción entre el hierro y los reactivos origina una coloración naranja en la muestra. Para su medición se utiliza una lámpara de Tungsteno con filtro de interferencia de banda estrecha a 525nm.

6-Peróxido de hidrógeno.

La concentración de peróxidos se determina semicuantitativamente por comparación colorimétrica mediante un test indicador de peróxidos marca *Merckoquant®*. La peroxidasa transfiere el oxígeno del peróxido a un indicador redox orgánico, formándose un producto de oxidación azul (0-100mg/l) o amarillo (100-1000mg/l).

La zona de reacción de la tira de ensayo se compara visualmente con una escala colorimétrica.

7-Detección y recuento de *Escherichia coli*

El cultivo y el recuento de *Escherichia coli* se llevan a cabo de acuerdo al método de filtración por membrana establecido en la Norma UNE-EN ISO 9308-1:2001. En primer lugar se filtra la muestra al vacío a través de membranas de celulosa estériles (Millipore®) de 0,45 µm de tamaño de poro y 47mm de diámetro. La muestra filtrada se coloca en una placa de Petri (agar MacConkey (Scharlau®)) y se incuba a 42 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. Pasado este tiempo, se realiza el recuento de las colonias rosas que se han formado y se lleva a cabo el test de tinción de Gram para confirmar algunas de ellas. El coeficiente de variación del método es del 15% aproximadamente. El recuento de colonias se expresa en (Unidades Formadoras de Colonias) por 100ml de muestra. Estas concentraciones se transforman a log10, y la eliminación de la bacteria, $\text{Log}(N_t/N_0)$, se calcula a partir de la concentración inicial (N_0) y de la concentración de bacterias a tiempo t (N_t).

La bibliografía consultada en la metodología:

- Environmental Protection Agency.
- Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA-AWWA-WPCF. Edición 20.
- Method 2540-D: *Determination of suspended solids. Gravimetric Method.*
- Method 4500 H-B: *Determination of pH. Electrometric method.*
- UNE-EN ISO 7027: *Water Quality-Determination of turbidity (1999).*
- UNE-EN ISO 7888: *Determinación de conductividad por el método electrométrico (1985).*

- UNE-EN ISO 8199: *Calidad de agua. Guía general para el análisis microbiológico mediante la enumeración de microorganismos en un medio de cultivo* (2005).

ANEXO III METODOLOGIA DE LA MICROBIOLOGIA

1- Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un material nutritivo artificial preparado para el crecimiento de microorganismos en un laboratorio. Algunas de las bacterias pueden crecer bien en casi cualquier medio de cultivo; otras requieren medios especiales.

A la hora de cultivar una bacteria determinada el medio de cultivo tiene que satisfacer una serie de criterios. Debe contener los nutrientes adecuados para la bacteria específica que se desea desarrollar. También debe contener humedad suficiente, un pH ajustado y una concentración conveniente de oxígeno. El medio en el que se siembra debe ser estéril, es decir, en un principio no debe tener bacterias viables, de modo que el cultivo tenga sólo las bacterias que se agreguen al medio. Por último, el medio de cultivo sembrado debe incubarse a la temperatura adecuada.

Se dispone de una amplia variedad de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias en el laboratorio. Casi todos esos medios están deshidratados y sólo precisan el agregado de agua y un proceso de esterilización [Tortora et al., 1993].

Cuando se desea que las bacterias se desarrollen sobre un medio sólido se agrega un agente solidificante como el agar. Es un polisacárido complejo proveniente de un alga marina. Posee algunas propiedades muy importantes que lo convierten en valioso para la microbiología. Pocos microorganismos pueden degradarlo, de modo que permanece en estado sólido. Se licua a una temperatura de alrededor de 100°C. Para el uso en laboratorio se mantiene en baños de agua a 50°C.

En el estudio llevado a cabo se han utilizado dos tipos de medios de cultivo diferentes, por un lado se utiliza agar nutritivo que permite el crecimiento de cualquier tipo de bacteria y un agar selectivo para *E.coli* llamado agar McConkey.

1.1- Agar nutritivo

Este tipo de agar se utiliza para obtener grandes números de colonias de un determinado tipo de bacteria, a partir de las cuales se procederá a fortificar o dopar las muestras de agua con las que se va a trabajar. Su composición es la que aparece en la tabla III.I.

Tabla III.I: Composición del agar nutritivo

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Peptona (proteína parcialmente digerida).	5
Extracto de carne.	3
Cloruro de sodio.	8
Agar.	15

Para preparar este agar se añaden 23 gramos del agar deshidratado por cada litro de agua destilada. Se lleva a ebullición y tras esto se esteriliza en el autoclave. Después se vierte la cantidad adecuada en las placas Petri dispuestas para el posterior cultivo de bacterias.

1.2- Agar MacConkey

Este agar es selectivo de *E.coli* y por lo tanto tiene inhibido el crecimiento de otras bacterias. La composición de este agar es la que figura en la tabla V.II.

Tabla III.II: Composición del agar MacConkey

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Peptona	20
Lactosa	10
Sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5
Rojo neutro	0,03
Violeta cristal	0,001
Agar	15

Para preparar este medio de cultivo es preciso diluir 51,5 gramos del medio deshidratado en un litro de agua y llevarlo a ebullición. Tras someterlo al proceso de esterilización en el autoclave se vierte el medio fundido en placas Petri y una vez solidificado se conservan en la nevera hasta su utilización.

2- Métodos de siembra.

2.1- Método de siembra en por agotamiento.

Este método de siembra se utiliza tanto en el caso de agar nutritivo, como cuando se espera una alta concentración de bacterias suspendidas en el agua tratada y por tanto se han de realizar diluciones seriadas como se explica en el siguiente epígrafe.

En el caso del agar nutritivo hablaremos de dos formas de siembra dependiendo de cómo se realice la distribución de la cepa madre sobre la placa. Podemos hablar de siembra por agotamiento (figura 5.1) o de siembra en estría (figura 5.2).

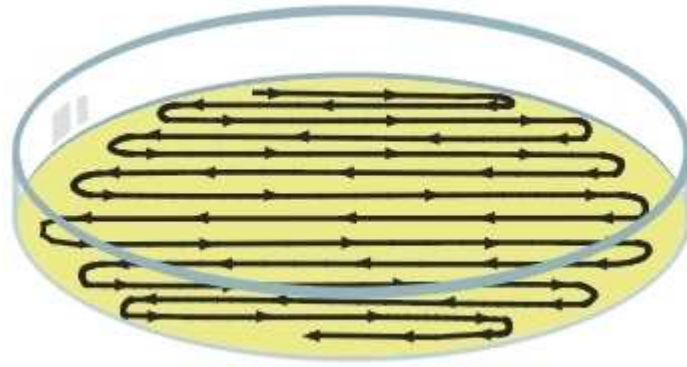


Figura III.I. Siembra por agotamiento.

2.2- Método de siembra en estrías.



Figura III.II Siembra en estrías.

3- Método de la dilución seriada

Pese a que la legislación vigente (Real Decreto 140/2003) recomienda un volumen de filtración de 100 mL, en muchos casos esto no es posible. La gran variabilidad de concentraciones de bacterias que presentan las muestras hace necesario trabajar con cantidades más pequeñas e incluso con diluciones que permitan un recuento adecuado puesto que en el método de filtración de membrana sólo serán válidas las placas que contengan entre 15 y 150 colonias, mientras que en el caso de siembra en superficie, este número puede variar entre 30 y 300. Esta técnica se conoce como dilución seriada. La figura 5.3 muestra cómo proceder con esta técnica.

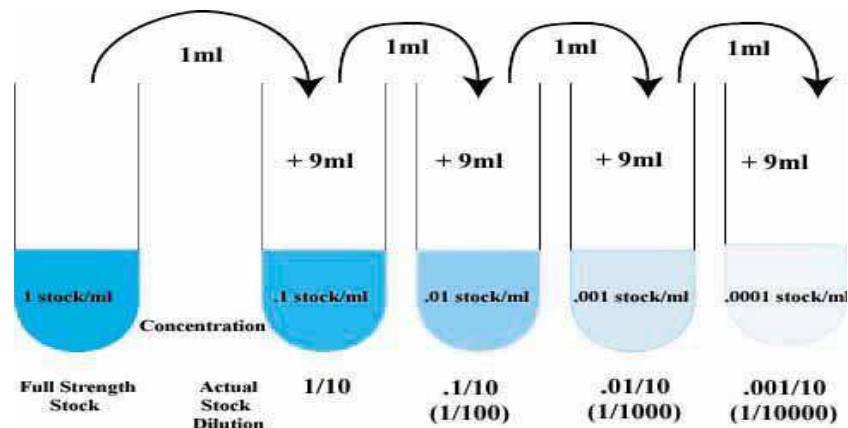


Figura III.III. Técnica dilución seriada.

ANEXO IV TEORÍA DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Los experimentos bien diseñados pueden producir mucha mayor cantidad de información que los no planificados o realizados al azar, y puesto que los recursos son limitados, es muy importante conseguir la máxima información posible de cada experimento que se lleva a cabo.

El Diseño de Experimentos es una técnica que permite estudiar de forma sistemática las variables que influyen en los resultados de un proceso o producto y extraer conclusiones objetivas al respecto. Los experimentos diseñados suelen realizarse en cuatro etapas: planificación, caracterización del proceso, optimización y verificación [MINITAB®, 2000].

La preparación previa a la experimentación ha de ser adecuada para cada caso. Normalmente, en la etapa de planificación se identifican las variables que se van a estudiar, de acuerdo a los objetivos que se desean conseguir, y se planean los experimentos de forma que produzcan información significativa. En muchos casos, las variables que influyen potencialmente en un proceso son numerosas. La caracterización del proceso permite identificar aquellas que son clave, reduciendo así el número de factores que afectan al resultado. Una vez identificados los factores más influyentes, es necesario determinar los valores a los que se obtienen los resultados óptimos. Estos valores dependen de los objetivos fijados en la etapa de planificación. Finalmente, se pueden llevar a cabo experimentos de seguimiento o control, a las condiciones establecidas como “mejores”, para verificar la optimización del proceso.

Existen distintos tipos de diseños, el más apropiado para cada caso depende de las características del proceso. El diseño factorial de experimentos es uno de los métodos más utilizados, ya que posibilita el estudio simultáneo de los efectos que varios factores pueden tener en un proceso. De esta forma, al variar los niveles de los factores simultáneamente en vez de hacerlo de uno en uno, se reduce el número de experimentos que es necesario realizar, lo que resulta eficiente en términos de tiempo

y dinero. Además, esta técnica permite determinar la existencia de interacciones entre los factores [Anderson et al., 2000].

En un diseño de experimentos factorial completo las respuestas se miden a todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores experimentales. Cuando se estudian k factores con dos niveles cada uno, se obtiene un total de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ experimentos.

Por ejemplo, para estudiar la influencia de tres factores A, B y C en un proceso, con dos niveles cada uno (A: 1 y 10, B: 1 y 5, C: 5 y 10), es necesario realizar 23 experimentos (8 experimentos). Aplicando el diseño factorial se genera la siguiente matriz de experimentos (**Tabla IV.1**)

Tabla IV.I. Matriz de experimentos. Diseño factorial completo de 3 factores con 2 niveles cada uno.

<u>Orden estándar</u>	<u>Orden de realización de los experimentos</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
2	1	10	1	5
7	2	1	5	10
4	3	10	5	5
3	4	1	5	5
1	5	1	1	5
8	6	10	5	10
6	7	10	1	10
5	8	1	1	10

Como se observa en la **Tabla IV.I** los experimentos han de ser realizados en orden aleatorio. La aleatoriedad satisface los requerimientos estadísticos de independencia en las observaciones, y además, sirve para compensar los efectos que puedan tener variables no controladas sobre el proceso.

En el diseño factorial con dos niveles se pueden incluir puntos centrales y réplicas. Los puntos centrales permiten estudiar la existencia de curvatura en el sistema, aunque para obtener mayor información se recomienda utilizar el diseño factorial con tres niveles. Replicar un experimento consiste en realizarlo repitiendo todos los pasos uno a uno. Las réplicas posibilitan estimar el error cometido en el proceso con mayor precisión.

Si en el ejemplo anterior se añaden puntos centrales y réplicas, el número de experimentos a realizar asciende a $17=2^3 \times 2(\text{réplicas})+1(\text{punto central})$. Se obtiene la matriz de experimentos mostrada en la Tabla VI.2.

Posteriormente, se realiza el análisis estadístico de los resultados, que permite estudiar las interacciones entre dos factores, AB, AC y BC, además de la interacción de los tres factores, ABC. Incluyendo los efectos causados por A, B y C, se obtiene un total de siete efectos. Éste es el mayor número de efectos que se pueden estudiar en un diseño factorial de 8 experimentos, ya que un grado de libertad se usa para estimar la media global.

Tabla IV.II. Matriz de experimentos. Diseño factorial completo de 3 factores con 2 niveles cada uno, punto central y réplicas.

<u>Orden estándar</u>	<u>Orden de realización de los experimentos</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
2	1	10	1	5
15	2	1	5	10
4	3	10	5	5
3	4	1	5	5
1	5	1	1	5
17	6	5,5	3	7,5
12	7	10	5	5
8	8	10	5	10
7	9	1	5	10
9	10	1	1	5
6	11	10	1	10
10	12	10	1	5
13	13	1	1	10
11	14	1	5	5
16	15	10	5	10
14	16	10	1	10
5	17	1	1	10

Análisis de variables

Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis, para el control de métodos analíticos. Los ejemplos de aplicación son múltiples, pudiéndose agrupar, según el objetivo que persiguen, en dos principalmente:

- La comparación de múltiples columnas de datos.
- La estimación de los componentes de variación de un proceso.

La comparación de diversos conjuntos de resultados es habitual en los laboratorios analíticos. Así, por ejemplo, puede interesar comparar diversos métodos de análisis con diferentes características, diversos analistas entre sí, o una serie de laboratorios que analizan una misma muestra con el mismo método (ensayos colaborativos).

También sería el caso cuando queremos analizar una muestra que ha estado sometida a diferentes tratamientos o ha estado almacenada en diferentes condiciones. En todos estos ejemplos hay dos posibles fuentes de variación: una es el error aleatorio en la medida y la otra es lo que se denomina *factor controlado* (tipo de método, diferentes condiciones, analista o laboratorio,...).

Una de las herramientas estadísticas más utilizadas que permite la separación de las diversas fuentes de variación es el análisis de la varianza (ANOVA).

Cuando tengamos un factor, controlado o aleatorio, aparte del error propio de la medida, hablaremos del ANOVA de un factor. En el caso de que estuviésemos desarrollando un nuevo método colorimétrico y quisiéramos investigar la influencia

de diversos factores independientes sobre la absorbancia, tales como la concentración de reactivo A y la temperatura a la que tiene lugar la reacción, entonces hablaríamos de un ANOVA de dos factores. En los casos donde tenemos dos o más factores que influyen, se realizan los experimentos para todas las combinaciones de los factores estudiados, seguido del ANOVA. Se puede deducir entonces si cada uno de los factores o una interacción entre ellos tienen influencia significativa en el resultado.

Para utilizar el ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres tipos de hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

- Cada conjunto de datos debe ser independiente del resto.
- Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.
- Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa.

ANOVA de un factor

El objetivo del ANOVA aquí es comparar los errores sistemáticos con los aleatorios obtenidos al realizar diversos análisis en el laboratorio. El objetivo del ANOVA es comparar los diversos valores medios para determinar si alguno de ellos difiere significativamente del resto.

Se descompone la variabilidad total de los datos en dos fuentes de variación: Seq SS y Adj SS. SST es la suma de las diferencias al cuadrado de cada resultado individual respecto a la media de todos los resultados y por tanto, representa la variación total de los datos.

Una fuente mide las desviaciones entre los resultados individuales, por lo tanto, es una medida de la dispersión. Cuando se divide la fuente por los correspondientes grados de libertad, se obtiene el cuadrado medio.

La otra fuente mide las desviaciones entre los resultados medios y el resultado medio global y, dividido por sus grados de libertad constituye el cuadrado medio.

Se calculan, por tanto, los cuadrados medios de las 2 fuentes como una medida de las dispersiones y se comparan mediante una prueba de hipótesis **F**. Si no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellas, la presencia de errores aleatorios será la causa predominante de la discrepancia entre los valores medios. Si, por el contrario, existe algún error sistemático el valor calculado de **F** será mayor que el valor tabulado **F_{tab}** para el nivel de significación escogido y los grados de libertad mencionados.

Si $F > F_{tab}$, en este caso se podría concluir que al menos uno de los análisis ha producido resultados la media de los cuales difiere de forma estadísticamente significativa del resto de análisis. El valor de probabilidad (**P**) indica aquel valor de a partir del cual el ANOVA no detectaría ninguna diferencia significativa. Así pues, a menor valor de probabilidad, mayor seguridad de que existen diferencias significativas. En el caso de que el valor (**P**) = 0,000, se rechaza la hipótesis nula de que todas las medias son iguales.

El ANOVA puede utilizarse para comparar entre sí las medias de los resultados obtenidos en los análisis.

ANEXO V RESULTADOS DE TODOS LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EN ESTE PROYECTO FIN DE CARRERA.

En el presente Anexo se presentan los resultados completos de todos los experimentos Fenton llevados a cabo en el laboratorio, incluyendo las replicas de cada experimento. Los reactivos, materiales y equipos empleados son los descritos en los apartados anteriores de esta memoria.

En la **Tabla V.I** se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos obtenidos en los experimentos iniciales de este proyecto final de carrera, realizados de acuerdo al procedimiento correspondiente, detallado en la presente de la memoria en apartados anteriores.

Tabla V.I Resultados de parámetros físico-químicos de los experimentos iniciales.

Experimento	Reactores	Fe (ppm)	H2O2 (ppm)	Luz	pH	INICIALES			FINALES			
						Cond (µS/cm)	SS (mg/L)	Turbidez	pH	Cond (µS/cm)	SS (mg/L)	Turbidez
1	1	1	50	on	5,4	186	3	9,3	5,9	240	4	23,3
	2								5,7	230	4	15,3
	3								5,6	233	3	12,5
2	1	1	50	off	5,4	184	3	9,2	5,8	242	3	15,2
	2								5,4	235	4	13,2
	3								5,5	241	3	12,9
3	1	1	20	on	5	215	6	18,9	5,8	239	5	23,8
	2								5,8	227	5	16,5
	3								5,9	228	5	16,2
4	1	1	20	off	5,4	295	2	3,9	5,7	108,4	3	12,5
	2								5,6	107,7	4	17,8
	3								5,9	97,4	4	22,1

En la **Tabla V.II** se muestran los resultados de la desinfección obtenida en los experimentos iniciales de este proyecto.

Tabla V.II Resultados de desinfección de la experimentación inicial.

<u>Experimento</u>	<u>Reactores</u>	<u>Fe (ppm)</u>	<u>H2O2 (ppm)</u>	<u>Luz</u>	<u>Desinfección (log (Nt/No))</u>
1	1	1	50	on	3,80
	2				4,58
	3				4,58
2	1	1	50	off	1,16
	2				0,65
	3				0,80
3	1	1	20	on	2,69
	2				4,59
	3				4,59
4	1	1	20	off	0,67
	2				0,77
	3				0,92

En la **Tabla V.III** se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos obtenidos en los experimentos del proceso Fenton.

Tabla V.III Resultados físico-químicos de los experimentos Fenton.

Experimento	Reactores	Fe (ppm)	H2O2 (ppm)	Luz	INICIALES				FINALES			
					pH	Cond (μS/cm)	SS (mg/L)	Turbidez	pH	Cond (μS/cm)	SS (mg/L)	Turbidez
1	1	5	50	off	5,6	105,4	3	11,44	6,3	109,1	2	10,2
	2								6	110,4	2	14,3
	3								6,3	111,7	1	15,8
2	1	0	50	on	6,3	233,1	2	7,79	4,9	145,0	2	5,8
	2								5,2	176,0	2	3,8
	3								5,4	103,7	2	4,5
3	1	0	50	off	5,2	94,4	2	4,68	4,6	95,2	3	0,8
	2								5,2	92,0	2	3,6
	3								5,4	96,7	2	2,6
4	1	5	50	on	5,6	115,6	2	2	5,9	257,0	3	14,9
	2								6	121,1	3	10,9
	3								5,9	121,3	5	12,5
5	1	5	20	on	5,7	348	2	6,28	6,5	45,3	7	64
	2								6,5	47,1	7	49,9
	3								6,6	46,2	5	33,9
6	1	5	20	off	5,7	348	2	6,28	6,0	75,7	3	21,8
	2								6,6	71,2	9	70
	3								6,6	78,9	9	66
7	1	0	20	on	4,9	174,7	2	5,23	6,1	188,8	2	4,3
	2								6,2	182,2	2	2,7
	3								6,2	185,5	2	3,2
8	1	3	35	on	5,6	319	3	4,56	5,1	34,2	3	24,2
	2								5,9	32,9	5	42,3
	3								5,7	27,3	5	34,1
9	1	3	35	off	5,6	319	3	4,56	4,7	37	3	37,2
	2								5,3	32,4	3	9,6
	3								5,3	31,1	4	24
10	1	0	20	off	5,2	94,4	2	4,68	5,1	91,8	2	3,1
	2								5,1	92,2	2	3,1
	3								5,1	94,1	2	3,1

En la **Tabla V.IV** se muestran los resultados de la desinfección obtenida en los experimentos del proceso Fenton.

Experimento	Reactores	Fe (ppm)	H2O2 (ppm)	Luz	Desinfección (log Nt/No)
1	1	5	50	off	2,3
	2				1,7
	3				2,3
2	1	0	50	on	5,9
	2				5,9
	3				5,1
3	1	0	50	off	1,2
	2				1,5
	3				0,8
4	1	5	50	on	6,2
	2				5,3
	3				3,9
5	1	5	20	on	5,8
	2				5,8
	3				5,8
6	1	5	20	off	1,6
	2				1,9
	3				1,5
7	1	0	20	on	4,1
	2				4,5
	3				4,5
8	1	2,5	35	on	5,1
	2				5,1
	3				5,1
9	1	2,5	35	off	0,09
	2				0
	3				0,07
10	1	0	20	off	0,9
	2				0,7
	3				0,6

Bibliografía

- Andrew D. Eaton.; Lenore S. Clesceri.; Eugene W. Rice.; Arnold E. Greenberg.; “STANDARD METHODS for the examination of water & wastewater”. 21 st Edition, 2005 Centennial Edition.
- Anderson M. J.; Whitcomb P. J. “DOE Simplified. Practical Tools for Effective Experimentation”. Productivity, Inc., Portland, Oregon, 2000.
- Aurelio Hernández Muñoz, 2001. “depuración y desinfección de aguas residuales”. Editorial: Colegio de ingenieros de caminos, canales y puertos.
- Barb, W. G.; Baxendale, J. H.; George, P.; Hargrave, K. R. “*Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide*”. Nature 163, 692-694, 1949.
- Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. L.; Ross, A. B. “*Reactivity of HO₂/O₂- Radicals in aqueous solution*”. Journal of Physical and Chemical Reference Data 14, 1041-1051, 1985.
- Bigda, R. J. “*Consider Fenton’s Chemistry for Wastewater Treatment*”. Chemical Engineering Progress, Diciembre 1995.
- Chou, S. S.; Huang, Y. H.; Lee, S. N.; Huang, G. H.; Huang, C. P. “*Treatment of high strength hexamine-containing wastewater by electro-Fenton method*”. Water Research 33, 751-759, 1999.
- De Laat, J.; Gallard, H. 1999. “Catalytic decomposition of hydrogen peroxide by Fe(III) in homogeneous aqueous solution: Mechanism and kinetic modeling”. Environmental Science & Technology, 33(16), 2726-2732.

Bibliografía

- De Laat, J.; Le, T. G. “*Kinetics and modeling of the Fe(III)/H₂O₂ system in the presence of sulfate in acidic aqueous solutions*”. Environmental Science & Technology 39, 1811-1818, 2005.
- Diao, H.F.; Li, X.Y.; Gu, J.D.; Shi, H.C.; Xie, Z.M. “*Electronic microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction*”. Process Biochemistry 39, 1421–1426, 2004.
- Haber, F.; Weiss, J. “*The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*”. Proceedings of the Royal Society A134, 332-351, 1934.
- Jiang, C.; Pang, S.; Ouyang, F.; Ma, J.; Jiang, J. “*A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment*”. Journal of Hazardous Materials, 2010.
- Kang, N.; Lee, D.S.; Yoon, J. 2002. “*Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols*”. Chemosphere, 47, 915-924.
- Kang, Y. W. & Hwang, K.-Y. “*Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process*”. Water Research 34, 2786-2790, 2000.
- King, D. W. “*Role of carbonate speciation on the oxidation rate of Fe(II) in aquatic systems*”. Environmental Science & Technology 32, 2997-3003, 1998.
- 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), 1-59.
- Martínez, E. C. & López, G. D. “*Tratamiento químico de contaminantes orgánicos. El proceso Fenton*”. Ingeniería Química, 149-153, 2001.

Bibliografía

- Moncayo-Lasso, A.; Sanabria, J.; Pulgarín, C.; Benítez, N. 2009. “*Simultaneous E. coli inactivation and NOM degradation in river water via photo-Fenton process at natural pH in solar CPC reactor. A new way for enhancing solar disinfection of natural water*”. *Chemosphere*, 77(2), 296-300.
- Moreno M., Navarrete P., Virgós L. 1998. “*Conceptos básicos de microbiología de las aguas subterráneas*”. Instituto Tecnológico Geominero de España.
- Pignatello, J.J. 1992. “Dark and photoassisted Fe³⁺-Catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen-peroxide”. *Environmental Science & Technology*, 26(5), 944-951.
- Pilar Valero Lázaro, 2011. “*Determinación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en procesos Fenton y Foto-Fenton*”. Proyecto final de carrera, universidad de Zaragoza.
- Rodríguez-Chueca J., Mosteo R., Ormad M.P., Miguel N., Ovelleiro J.L., 2011. Heterogeneous photo-Fenton processes for disinfection of treated urban wastewater. 20th IOA World Congress – 6° IUVA World Congress.
- Ruppert, G.; Bauer, R.; Heisler, G. “*The photo-Fenton reaction –an effective photochemical wastewater treatment process*”. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 73, 75-78, 1993.
- Saskia Louwen Pérez, 2010. “*Eliminación de enterococos en aguas de salida de depuradoras mediante procesos fenton y foto-fenton*”. Proyecto final de carrera, universidad de Zaragoza.

Bibliografía

- Smith B. A.; Teel A. L.; Watts R. J. “*Mechanism for the destruction of carbon tetrachloride and chloroform DNAPLs by modified Fenton’s reagent*”. Journal of Contaminant Hydrology 85, 229-246, 2006.
- Spuhler, D.; Rengifo-Herrera, J.A; Pulgarín, C. 2010. “*The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing Escherichia coli K12*”. Applied Catalysis B: Environmental, 96(1-2), 126-141.
- Sun, Y.; Pignatello, J. J. “*Chemical treatment of pesticide wastes. Evaluation of Fe (III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4-D at circum-neutral pH*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40, 322-327, 1992.
- Tang, W. Z.; Huang, C. P. “*An oxidation kinetic model of unsaturated chlorinated aliphatic compounds by Fenton’s reagent*”. Journal of Environmental Science and Health A31, 2755-2775, 1996.
- Tortor, G.J.; Funke, B.R.; Case C.L. 1993. “*Introducción a la microbiología*”. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza.
- Tyrrel, R.M.; Keyse, S.M. 1990. “*New trends in photobiology the interaction of UVA radiation with cultured cells*”. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 4(4), 349-361.

Bibliografía

- Von Sonntag, C.; Dowideit, P.; Fang, X.; Mertens, R.; Pan, X.; Schuchmann, M. N.; Schuchmann, H. P. “*The fate of peroxy radicals in aqueous solution*”. Water Science and Technology 35, 9-15, 1997.
- www.mma.es, página principal del ministerio del Medio Ambiente y Medio rural y Marino. Última consulta, julio 2010.
- Walling, C. 1975. “*Fenton’s reagent revisited*”. Accounts. Chemical Research, 9, 125- 131.
- Yoon, J.; Lee, Y. & Kim, S. “*Investigation of the reaction pathway of OH radicals produced by Fenton oxidation in the conditions of wastewater treatment*”. Water Science and Technology 44, 15-21, 2001.
- Zepp, R. G.; Faust, B. C. & Hoigné, J. “*Hydroxyl Radical Formation in Aqueous Reactions (pH 3-8) of Iron (II) with Hydrogen Peroxide: The Photo-Fenton Reaction*”. Environmental Science & Technology 26, 1992.