



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

PROYECTO FINAL DE CARRERA

ELIMINACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* EN AGUAS
NATURALES MEDIANTE TÉCNICAS DE OXIDACIÓN
AVANZADA BASADAS EN OZONO, PERÓXIDO
DE HIDRÓGENO Y DIÓXIDO DE TITANIO

AUTOR:

Javier Esteban Finol

Director:

Jorge Jesús Rodríguez Chueca

Ponente:

Rosa Mosteo Abad

Especialidad:

Química Industrial

Convocatoria:

Septiembre 2013

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias...

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

A Jorge por el apoyo prestado en estos meses para la realización de este proyecto.

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

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

Gracias a todos.

ELIMINACIÓN DE ESCHERICHIA COLI EN AGUAS NATURALES MEDIANTE TÉCNICAS DE OXIDACIÓN AVANZADA BASADAS EN OZONO

RESUMEN

El agua es un recurso renovable muy abundante, sin embargo, las cantidades de agua dulce son finitas. La influencia negativa que sufren los recursos hídricos en los países tecnológicamente avanzados está provocando en las últimas décadas una gran sensibilización por parte de organismos públicos y privados. La reutilización de las aguas se ve como la principal solución para incrementar los recursos existentes.

La posible exposición de las personas a los agentes biológicos, como bacterias patógenas, es uno de los principales factores de riesgo que están asociados al uso del agua. Entre las principales bacterias patógenas causantes de enfermedades de origen hídrico, se pueden destacar los indicadores fecales *Enterococcus sp.* y *Escherichia Coli*, esta última es el objeto de estudio de este proyecto fin de carrera.

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

La figura del peróxido de hidrógeno es fundamental como iniciador en la generación de especies reactivas de oxígeno, siendo éstas las encargadas de reaccionar con los componentes fundamentales de las células, en este caso bacterianas, y conduciendo a éstas a la muerte celular por las lesiones ocasionadas.

El objetivo de este proyecto de investigación es el estudio de la desinfección y eliminación de *E.coli* mediante POAs basados en ozono. Dichos procesos son la combinación de ozono y peróxido de hidrógeno (O_3/H_2O_2), la combinación de ozono y dióxido de titanio (O_3/TiO_2), y la combinación de ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($O_3/H_2O_2/TiO_2$). También se realiza un estudio y aplicación de los modelos matemáticos primarios sobre los resultados de la inactivación de *E.coli* que se obtienen en los distintos procesos de desinfección. Y finalmente se comparan los resultados obtenidos en este proyecto con los obtenidos por Dña. Munia Lanao Maldonado en su tesis doctoral " *Investigación*

de la inactivación de Clostridium perfringens y Enterococcus sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación”.

De los resultados obtenidos se puede afirmar que el uso por separado de peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio adicionados al ozono, mejoran significativamente los resultados de desinfección respecto al tratamiento de ozonización. Mientras que la combinación de estos tres compuestos da resultados de desinfección semejantes al uso del ozono sin combinar.

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

La comparación de los resultados de desinfección y parámetros cinéticos, obtenidos mediante los modelos matemáticos, de dos de los principales indicadores fecales *Enterococcus sp.* y *Escherichia Coli.*, ratifica la mayor sensibilidad de la *E.coli* frente a los procesos de oxidación llevados a cabo en este proyecto.

Índice General

Índice de figuras	III
Índice de tablas	V
Capítulo 1. Introducción y objetivos.....	1
Capítulo 2. Contaminación microbiológica del agua	7
2.1. Gérmenes patógenos de transmisión hídrica.....	9
2.1.1. Bacterias.....	10
2.1.2. Virus	11
2.1.3. Protozoos	11
2.2. Escherichia Coli	11
Capítulo 3. Desinfección del agua.....	15
3.1. Fundamento teórico.....	17
3.2. Desinfección con ozono.....	22
3.3. Marco legislativo	25
3.4. Procesos de oxidación avanzada	26
3.4.1. Clasificación de los procesos de oxidación avanzada.....	27
3.4.2. Introducción teórica de los POAs utilizados	28
Capítulo 4. Procedimiento experimental	33
4.1. Metodología parámetros fisico-químicos	35
4.2. Metodología análisis de <i>E.coli</i>	35
4.2.1. Procedimiento normalizado	35
4.2.2. Medios de cultivo	36
4.2.3. Equipos de laboratorio	37
4.2.4. Diluciones decimales seriadas	37
4.2.5. Método en placa difusa (MPD)	38
4.2.6. Método de filtración de membrana	38
4.2.7. Incubación	40
4.2.8. Recuento e inactivación	40
4.3. Tratamiento de los datos.....	41
4.4. Modelos cinéticos de inactivación microbiana	42
4.4.1. Descripción de modelos	42
4.4.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error	47
4.5. Muestras	49
4.6. Descripción de experimentos. Materiales y reactivos.....	49
4.6.1. Ozono	49
4.6.2. Dióxido de titanio.....	53

4.6.3. Peróxido de hidrógeno	53
4.7. Condiciones de operación de los ensayos propuestos.....	53
Capítulo 5. Resultados	57
5.1. Resultados del tratamiento de ozonización	59
5.2. Resultados del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂).....	62
5.3. Resultados del tratamiento de ozonización catalítica. Ozono combinado con dióxido de titanio (O ₃ /TiO ₂)	65
5.4. Resultados del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio (O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂).....	67
5.5. Modelización cinética	72
Capítulo 6. Conclusiones.....	87
Capítulo 7. Bibliografía.....	93

Índice de figuras

Figura 1. Aspecto de colonias de <i>E.coli</i> en el agar MacConkey	36
Figura 2. Esquema del método de diluciones seriadas.	38
Figura 3. Método de filtración por membrana (<i>Millipore</i>).....	39
Figura 4. Contador de colonias (Interscience Scan 100).	41
Figura 5. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: <i>Gyürék and Finch, 1998</i>).	43
Figura 6. Esquema de generación de ozono mediante descarga eléctrica.	50
Figura 7. Descripción de la instalación de ozonización.....	51
Figura 8. Curva de calibrado del ozonizador para un caudal de 50 L·h ⁻¹ . Potencia de ozonización 1,5 W y presión de oxígeno 0,5 bares.....	53
Figura 9. Inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de ozonización. $N_0 = 3,54 \cdot 10^8$ UFC·100mL ⁻¹	60
Figura 10. Inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con <i>E.coli</i> . $N_0 = 4,35 \cdot 10^8$ UFC·100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04 mM.....	63
Figura 11. Inactivación de <i>E.coli</i> en los tratamiento con O ₃ (×) y O ₃ /H ₂ O ₂ (◆). $N_0 \approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04 mM.	65
Figura 12. Inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de ozono combinado con TiO ₂ sobre la muestra agua fortificada. $N_0 = 4,14 \cdot 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [TiO ₂]= 1 g·L ⁻¹	66
Figura 13. Inactivación de <i>E.coli</i> tras los tratamiento con O ₃ (×), O ₃ /TiO ₂ (◆) y O ₃ /H ₂ O ₂ (▲). $N_0 \approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04 mM.....	67
Figura 14. Inactivación de <i>E.coli</i> . en el tratamiento O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂ sobre la muestra de agua fortificada. $N_0 = 4,35 \cdot 10^8$ UFC·100mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04mM. [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	69
Figura 15. . Inactivación de <i>E.coli</i> tras los tratamiento con O ₃ (×), O ₃ /TiO ₂ (◆), O ₃ /H ₂ O ₂ (▲). H ₂ O ₂ /TiO ₂ /O ₃ (■). $N_0 \approx 10^8$ UFC· 100 mL ⁻¹ . [H ₂ O ₂]=0,04 mM. [TiO ₂]=1 g L ⁻¹	71
Figura 16. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>E.coli</i> en los tratamientos de ozonización (A), peroxona (B), O ₃ /TiO ₂ (C) y O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂ (D).....	76
Figura 17. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de ozonización.	77
Figura 18. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de ozonización combinado con peróxido.....	78

Índice de figuras

Figura 19. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización combinado con TiO_279

Figura 20. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización combinado con TiO_2 y H_2O_280

Índice de tablas

Tabla 1. Bacterias y enfermedades típicas causadas por estas.	17
Tabla 2. Protozoos y enfermedades relacionadas con estos.	18
Tabla 3. Virus y enfermedades relacionadas con estos.	18
Tabla 4. Subproductos de desinfección del cloro y el ozono. (<i>Rivera et al.,2010</i>)	22
Tabla 5. Principales características físicas del ozono.	23
Tabla 6. Valores de concentración por tiempo (CT) para una desactivación del 99% de los microorganismos a 5°C. (<i>Rodríguez, 2003</i>).....	24
Tabla 7. Microorganismos presentes en aguas residuales urbanas, antes y después del tratamiento de depuración.....	26
Tabla 8. Potenciales estándar de oxidación.....	27
Tabla 9. Instrumentación, metodología, rango de medida y error de cada uno de los instrumentos para la caracterización físico-química de las muestras. (<i>Eaton et al., 2005</i>)	35
Tabla 10. Composición del agar MacConkey.....	36
Tabla 11. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos.	37
Tabla 12. Modelos cinéticos de estudio aplicados.....	45
Tabla 13. Condiciones de operación de los tratamientos estudiados.	54
Tabla 14. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra de agua fortificada con <i>E.coli</i>	59
Tabla 15. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de <i>E.coli</i> a lo largo del tiempo.	60
Tabla 16. Resumen de las condiciones en los tratamientos para la eliminación de <i>E.coli</i> y <i>Enterococcus sp.</i>	62
Tabla 17. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con <i>E.coli</i>	62
Tabla 18. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de <i>E.coli</i> a lo largo del tiempo.....	63
Tabla 19. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O ₃ combinado con TiO ₂ sobre el agua fortificada con <i>E.coli</i>	65
Tabla 20. Condiciones del tratamiento de O ₃ combinado con TiO ₂ e inactivación de <i>E.coli</i> a lo largo del tiempo. [TiO ₂]= 1 g L ⁻¹	65

Tabla 21. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂ sobre la muestra agua fortificada con <i>E.coli</i> . [H ₂ O ₂]=0,04mM. [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	68
Tabla 22. Condiciones del tratamiento de O ₃ combinado con TiO ₂ y H ₂ O ₂ sobre la muestra agua fortificada con <i>E.coli</i> . [H ₂ O ₂]=0,04mM. [TiO ₂]=1 g·L ⁻¹	68
Tabla 23. Resumen de los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección estudiados para <i>E.coli</i> en comparación con <i>Enterococcus sp.</i> y <i>C. perfringens</i>	71
Tabla 24. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de ozonización.	72
Tabla 25. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de peroxona.	73
Tabla 26. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de O ₃ /TiO ₂	73
Tabla 27. Parámetros cinéticos del modelo de Hom, modelo bifásico y modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> en el tratamiento de O ₃ /TiO ₂ /H ₂ O ₂	74
Tabla 28. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para <i>Enterococcus sp.</i> y <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de ozonización.....	81
Tabla 29. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para <i>Enterococcus sp.</i> y <i>C. perfringens</i> en el tratamiento con peroxona.....	82
Tabla 30. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para <i>Enterococcus sp.</i> y <i>C. perfringens</i> . en el tratamiento de O ₃ /TiO ₂	83
Tabla 31. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>E.coli</i> con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para <i>Enterococcus sp.</i> en el tratamiento de O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	83

Capítulo 1. Introducción y objetivos

Una afirmación trascendental de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sido la manifestación de que “el goce del grado máximo de salud que se pueda lograr es uno de los derechos fundamentales de todo ser humano sin distinción de raza, religión, ideología política o condición económica y social”. Para la O.M.S. la salud es un “estado de completo bienestar físico, mental y social”, quedando fijado el nivel de salud por el grado de armonía que exista entre el hombre y el medio que sirve de escenario o de recurso a su vida.

La contaminación de las aguas es uno de los factores importantes que rompe esa armonía entre la persona y el medio ambiente, debiendo entonces luchar contra ella para recuperar el equilibrio necesario.

El agua es el compuesto químico más abundante en la biosfera, además de ser una de las sustancias más importantes del medio natural, imprescindible para el sustento de la vida en nuestro planeta. Existen unos reservorios de agua entre los que circula dicho recurso, estimándose que la cantidad de total de agua en nuestro planeta es de unos 1190 mil billones de m³. A pesar de este enorme volumen, apenas el 3% se encuentra como agua dulce y, de ésta última cantidad, la mayor parte está almacenada en forma de hielo en los cascos polares y glaciares, mientras que el resto se encuentra como agua subterránea o superficial.

Aunque el agua es un recurso renovable muy abundante, las cantidades de agua dulce son finitas. La presión negativa causada sobre el ecosistema es especialmente alta en los países tecnológicamente avanzados; por ello, en últimas décadas, ha habido una gran sensibilización por parte de organismos públicos y privados, acerca de la importancia de la calidad de los recursos hídricos en dichos países. En la actualidad, las tecnologías de tratamiento de aguas tienen dos objetivos fundamentales: 1º) adecuar el abastecimiento para que su consumo no provoque daño alguno al organismo humano, y 2º) disminuir el impacto ambiental de las descargas de residuos líquidos provenientes de la agricultura, la industria y la población, y generar residuos finales que cumplan con los flujos y concentraciones de contaminantes estipulados en la legislación vigente.

En la actualidad, los tratamientos de desinfección del agua más comunes son la cloración y la ozonización. Dichas técnicas suelen ser bastantes útiles para la eliminación de contaminantes microbiológicos presentes en el agua, sin embargo, los subproductos de desinfección (THMs en el caso de la cloración), la elevada influencia de la concentración de sólidos en suspensión y materia orgánica (en la desinfección de ozono), y otros inconvenientes que presentan dichos tratamientos, hace que se estudien otras vías de desinfección como los procesos de oxidación avanzada (POAs).

Los POAs nacen, por tanto, de las limitaciones que tienen los tratamientos de desinfección convencionales. Dichas técnicas se basan en la generación de radicales hidroxilo, especies muy potentes con un elevado poder oxidativo y de

desinfección sobre contaminantes y microorganismos presentes en el agua. Los radicales hidroxilos pueden ser generados mediante el uso de sustancias como peróxido de hidrógeno, ozono, catalizadores metálicos, radiación solar, etc.

El objetivo del proyecto es el estudio de tratamientos de oxidación avanzada basados en el ozono como proceso de desinfección y eliminación del indicador bacteriano de contaminación fecal *Escherichia coli*, presente en las aguas del canal imperial de Aragón.

Dicho objetivo se basa en los siguientes objetivos complementarios:

1. Estudio de POAs en la desinfección y eliminación de *E.coli* basados en ozono (O₃), combinación de ozono y peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂), combinación de ozono y dióxido de titanio (O₃/TiO₂), y la combinación de ozono con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio (O₃/H₂O₂/TiO₂).
2. Estudio y aplicación de modelos matemáticos primarios sobre los resultados de la inactivación de *E.coli* obtenidos en los distintos procesos de desinfección.
3. Comparación de los resultados obtenidos en este proyecto de investigación con los obtenidos por Dña. Munia Lanao Maldonado en su tesis doctoral " *Investigación de la inactivación de Clostridium perfringens y Enterococcus sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación*".

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación "Evaluación de procesos en el tratamiento de aguas y fangos de EDARs, para la reducción de contaminantes con riesgo sanitario y ambiental (UZ2012-TEC-06)" financiado por el Banco Santander-Universidad de Zaragoza. Además, cuenta con la financiación DGA-FSE.

Capítulo 2. Contaminación microbiológica del agua

2.1. Gérmenes patógenos de transmisión hídrica

Un problema para la salud pública se encuentra en la propagación de los microorganismos patógenos a través de los suministros de agua. Este problema se da en todos los países del mundo, y los fallos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales y de consumo humano ha originado un gran número de víctimas en todo el mundo. (*Spiro et al., 2004*)

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

El número y desarrollo de bacterias y microorganismos depende de parámetros tales como pH, temperatura, materia orgánica incorporada y existencia de oxígeno.

Todos los microorganismos requieren de un ambiente húmedo para su crecimiento, sin embargo, existe una gran cantidad con diferente metabolismo.

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

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

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

40°C; y los termofílicos, que viven a temperaturas de 50°C a 70°C. En la práctica se pueden encontrar organismos que viven en condiciones de temperatura de 0°C a 70°C.

Los microorganismos son aquellos organismos muy pequeños para poder ser vistos a simple vista. Dentro de este grupo se encuentran un gran número de organismos acuáticos. Los organismos superiores se identifican como plantas o animales. La aplicación de tal diferenciación para identificar a los microorganismos es difícil debido a las estructuras simples de sus células y se ha convenido denominar los protistas, los cuales se dividen a su vez en procariotas y eucariotas. Los procariotas, son estructuras celulares simples y pequeñas (<5µm) con núcleo rudimentario y un cromosoma. Su reproducción es por fisión¹ binaria. Se incluyen dentro de este grupo las bacterias, los actinomicetos² y las algas verde-azules. Los eucariotas, son células más grandes (>20µm) con una estructura más compleja y que contienen varios cromosomas. Su reproducción puede ser asexual o sexual y tienen ciclos de vida muy complejos. En esta clasificación se incluyen los hongos, la mayoría de las algas y los protozoos.

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

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

2.1.1. Bacterias

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

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

² Actinomiceto: Grupo de bacterias de aspecto bacilar o filamentosas que según el medio de desarrollo forman bacilos aislados o largos filamentos con aspecto de micelios fúngicos, por lo que han sido considerados mucho tiempo como hongos.

célula sobrevivir largos periodos de tiempo hasta que de nuevo encuentra un medio idóneo que le permita activarse de nuevo.

El objeto de estudio de este trabajo es una bacteria llamada *E.coli* que será descrita en el apartado 2.2.

2.1.2. Virus

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

2.1.3. Protozoos

Los protozoos son microorganismos unicelulares. La mayoría son de vida libre y pueden encontrarse en el agua de manera natural; sin embargo, varias especies son parásitas y viven de sus hospedadores. En condiciones difíciles se encuentran en forma de quistes³ o huevos. Los huevos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* son los más comunes en aguas con presencia de contaminación fecal. Ambos protozoos son muy persistentes en el medio ambiente y muy resistentes a los tratamientos convencionales de desinfección. (Venczel *et al.*, 1997; EPA, 1999).

2.2. Escherichia Coli

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

³ Quiste: Formación patológica en forma de bolsa o cavidad limitada por una membrana y que contiene algún fluido de diversa naturaleza desde normal hasta neoplásica.

La *E. coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y tal y como se ha expresado en el Capítulo 1, el objeto de estudio de este trabajo. Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1985). Ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos⁴ o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales.

Integran también esta familia de *Enterobacteriaceae* otros géneros como son *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*.

Esta especie pertenece al género *Escherichia*. Se incluyen dentro de este género gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Son inhibidos por KCN e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato.

La *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio (Drasar y Hill, 1974). Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se le considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".

⁴ Peritrico: Rodeado de pelos, se aplica sobre todo a las bacterias provistas de flagelos.

Capítulo 3. Desinfección del agua

3.1. Fundamento teórico

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

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

La definición formal de desinfección del agua se refiere a la destrucción de los organismos causantes de enfermedades o patógenos presentes en ella. Los principales organismos son bacterias, virus y protozoos. En las Tablas 1, 2 y 3 se presentan los más comunes y las enfermedades relacionadas con ellos. (*Arboleda, 2000*)

Tabla 1. Bacterias y enfermedades típicas causadas por estas.

Bacteria	Enfermedades relacionadas
<i>Salmonellas</i>	Tíficas y paratíficas
<i>Shiegellas</i>	Disentería
<i>Vibrio comma</i>	Cólera
<i>Yersinia</i>	Yersiniosis
<i>E.coli</i>	Diarreas

Tabla 2. Protozoos y enfermedades relacionadas con estos.

Protozoos	Enfermedades relacionadas
<i>Amoebas</i>	Endomoebas histólicas, quistes de amibas
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis
<i>Cryptosporidium</i>	Cryptosporidiasis

Tabla 3. Virus y enfermedades relacionadas con estos.

Virus	Enfermedades relacionadas
<i>Enterovirus</i>	Meningitis, conjuntivitis
<i>Astrovirus</i>	Diarreas
<i>Rotavirus</i>	Gastroenteritis

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

Las esporas bacterianas son sin lugar a duda las más resistentes, debido tal vez al estado de deshidratación parcial de su protoplasma⁵.

Los quistes protozoarios, que producen quistes de amebas, le siguen en resistencia. Soportan pH tan altos como 13 y tan bajos como 1. Son hasta 160 veces más resistentes que las bacterias *E.coli* y 9 veces más que los virus más duros a la desinfección con cloro libre. Son, sin embargo, muy susceptibles al calor, ya que temperaturas de 50°C los destruyen en 2 minutos.

Los virus entéricos (*poliovirus*, *coxsakievirus* y *ecovirus*) son también notables por su capacidad para soportar la desinfección debido a su falta de enzimas y otros sistemas sensitivos, pues están constituidos básicamente por un ácido nucleico rodeado de una corteza proteínica. Pueden ser inactivados por el

⁵ Protoplasmas: Constituyente fundamental de las células contenido en el interior de la membrana plasmática y por fuera del núcleo.

calor o ciertas sustancias químicas que son capaces de desnaturalizar su corteza proteínica, la que sobre todo en los virus más pequeños está expuesta directamente a la influencia de los agentes exteriores.

La respiración bacteriana se efectúa en la superficie de la célula, lo que las hace muy sensitivas a los agentes desinfectantes (moléculas o cationes) los cuales tienen la oportunidad de reaccionar o sustituir compuestos vitales para ella.

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

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

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

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

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

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

- Cl₂: es la forma de menor coste de explotación en instalaciones de gran demanda de producto, aunque por su toxicidad es necesario cumplir ciertos requisitos de seguridad en su almacenamiento y dosificación.
- Hipoclorito sódico "lejía"(NaClO), en forma líquida, e Hipoclorito cálcico (Ca(ClO)₂) en forma sólida. Se utiliza en instalaciones más pequeñas.
- Dióxido de cloro (ClO₂). Este reactivo se genera in situ por reacción de cloro o ácido clorhídrico sobre clorito sódico, y su acción desinfectante es comparable a la del cloro molecular. Se suele utilizar en sustitución del cloro en agua que contienen fenoles, para evitar la formación de clorofenoles, de sabor desagradable.
- Las Cloraminas, producidas en la combinación del cloro con amoníaco u otras sustancias nitrogenadas. Son antisépticos muy estables, cuya acción es menos rápida que la del cloro, pero que subsisten en el agua durante un tiempo más prolongado.

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

- Influencia de la concentración de sólidos en suspensión y turbidez en la efectividad del proceso.
- Influencia de la concentración de compuestos nitrogenados en la eficiencia del proceso
- Resistencia de determinados organismos a la cloración.
- Formación de subproductos de la cloración.
- Formación de cloraminas.
- Efecto negativo del cloro residual sobre cultivos.
- La necesidad de decloración⁶ aumenta los costes entre un 20-30%.

⁶ Decloración: proceso por el que se elimina el cloro residual después de un proceso de cloración.

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

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

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

Los THMs son derivados del metano con sustituyentes halogenados. Los más comunes en aguas de bebida son: cloroformo (HCCl_3), bromodiolometano (HCBrl_2), dibromodiolometano (HCBrl_2) y bromoformo (CHBr_3), en este orden de importancia. Estos productos aparecen como subproductos de las reacciones de oxidación del cloro, que reaccionan con compuestos orgánicos precursores como los ácidos húmicos contenidos en la fracción orgánica de las aguas brutas superficiales. Se originan tras una compleja serie de reacciones químicas que conducen a la rotura de los anillos aromáticos y a generar compuestos mono y dicarbonados simples con sustituyentes halogenados, en especial, cloro, bromo y yodo.

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

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

Otros subproductos de la desinfección de cloro son los ácidos haloacéticos (HAA: mono, di y tricloroacéticos, mono y dibromoacéticos,...), formados por reacción del cloro con la materia orgánica presente en agua bruta, y que pueden encontrarse en mayores proporciones que los THMs en función del pH. También se producen Haloacetónitrilos (HAN), haloaldehídos y halocetonas

que son otros subproductos minoritarios. Como producto de la reacción del cloro con compuestos fenólicos aparecen los clorofenoles, siendo los más comunes: 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol.

En la Tabla 4 se muestran los subproductos más comunes que se pueden formar tras los tratamientos con cloro y con ozono.

Tabla 4. Subproductos de desinfección del cloro y el ozono. (Rivera *et al.*, 2010)

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

3.2. Desinfección con ozono

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

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

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

- No se generan subproductos organohalogenados cancerígenos al reaccionar con la materia orgánica del agua, salvo si ésta contiene bromuros, formándose entonces compuestos organobromados también peligrosos para la salud humana.

- Reduce y elimina los problemas de color, olor y sabor de forma más eficaz que el cloro, especialmente los fenoles del agua, sin dejar los olores y sabores residuales característicos del cloro y sus derivados.
- Es un oxidante eficaz en la eliminación de hierro y manganeso y en la oxidación de materias orgánicas, con acción sobre los detergentes.
- Presenta una acción desinfectante muy eficaz, menos sensible a las variaciones de pH y temperatura, y muy rápida, por lo que requiere periodos de contacto muy cortos. Es más fuerte que el cloro frente a esporas y virus, y algo menor frente a bacterias vegetativas.
- Su manejo es menos peligroso que el del cloro, aunque sus costes de inversión y explotación son más elevados.

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

En la Tabla 5 se muestran los valores de las principales características físicas del ozono.

Tabla 5. Principales características físicas del ozono.

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

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

En la Tabla 6 se muestra el parámetro de CT (Concentración desinfectante por Tiempo) para la inactivación del 99% de *E.coli* cuando se trabaja con ozono, dióxido de cloro y cloro libre. Se observa como el menor parámetro CT corresponde con el tratamiento de ozonización.

Tabla 6. Valores de concentración por tiempo (CT) para una desactivación del 99% de los microorganismos a 5°C. (Rodríguez, 2003)

DESINFECTANTE			
Microorganismo	Ozono (pH 6-7)	Dióxido de cloro (pH 6-7)	Cloro libre
<i>E.coli</i>	0,02	0,40-0,75	0,034-0,05

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

- Uso como desinfectante primario en las etapas de preoxidación u oxidación intermedia ya que no tiene poder residual.
- La estabilidad del ozono depende en gran medida de la matriz acuosa, especialmente su pH y del tipo y contenido de materia orgánica del agua.
- Influencia de la concentración de sólidos en suspensión en la efectividad del proceso.
- Influencia de la concentración de materia orgánica en la resistencia de determinados organismos.
- Formación de subproductos.
- Debe ser completado el tratamiento con una etapa de cloración final con la finalidad de prevenir la contaminación microbiana y el desarrollo de biofilms⁷. Ya que pH 8, el pH habitual del agua natural, la vida media del ozono es inferior a una hora, pasando rápidamente a oxígeno disuelto.

⁷ Biofilm: Agregado de microorganismos con abundantes relaciones ecológicas entre ellos, frecuentemente dispuestos en capas, embebidos en una matriz extracelular, adheridos a una superficie viva o inerte.

- Elevado coste energético.

3.3. Marco legislativo

La ley 14/1986 General de Sanidad dispone de la obligatoriedad que tienen las Administraciones públicas sanitarias de guiar sus actuaciones preferentemente a la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades. De tal forma, las actividades y productos que, tanto directa o indirectamente, puedan tener consecuencias negativas para la salud tendrán que ser sometidos a un control sanitario. En lo referente al uso al que va destinado un suministro de agua, las normas de calidad microbiológica requeridas son más o menos exigentes.

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

El la directiva 2006/7/CE sobre la gestión de la calidad de las agua implanta la obligatoriedad de realizar el recuento de *E.coli* y *Enterococos*. Según los resultados obtenidos el agua posee una calidad suficiente, buena o excelente.

La Directiva 2006/112/CE sobre las aguas destinadas a la cría de moluscos, se establece la recomendación de realizar el control de coliformes fecales, para los cuales solo existen valores guía. Con todo, la legislación remarca que a la espera de una directiva relativa a la protección de los consumidores sobre esta clase de productos, el valor tendría que ser obligatoriamente respetado en todas aquellas aguas en la que habitan los moluscos directamente comestibles.

La Directiva 2006/44/CE no indica ningún parámetro microbiológico a controlar en lo que se refiere a la calidad exigida en las aguas aptar para peces.

El RD140/2003, transpuesto del marco legislativo español de la Directiva 98/83/CE, en el que se marcan los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, establece como obligados parámetros microbiológicos de análisis de *E.coli*, *Enterococos* y *Clostridium perfringens* (incluidos los esporos). Además se indica que el recuento de colonias a 22 °C y de coliformes son sólo parámetros indicadores. En el supuesto del incumplimiento de dichos parámetros indicadores, la autoridad sanitaria evalúa el agua como “apta o no para el consumo humano” dependiendo del riesgo para la salud.

Finalmente, el RD 1620/2007 marca el régimen jurídico para la reutilización de las aguas depuradas. Tanto *E.coli* como nematodos deben ser analizados para todos los usos establecidos. La *Legionella* es también obligatorio su análisis para todos los usos establecidos salvo para el uso ambiental, en el que no se contempla su control. En el agua regenerada con fines agrícolas e industriales únicamente se contempla la *Salmonella spp.* Por último, la *Taenia sagitana* y *Taenia solium* es obligatorio su control si el agua se destina a regar pastos para consumo de animales productores de carne, ya que son los hospedadores intermediarios de estos parásitos. (Lanao, 2012)

La Tabla 7 muestra una relación de microorganismos detectados en aguas de entrada y salida de depuradoras. (USEPA, 2004)

Tabla 7. Microorganismos presentes en aguas residuales urbanas, antes y después del tratamiento de depuración.

Organismos · 100 mL ⁻¹	Agua residual antes EDAR	Agua residual después EDAR
Coliformes fecales	10 ⁴ - 10 ⁵	5·10 ³ - 10 ⁴
<i>Enterococos</i>	10 ⁴ - 10 ⁵	2·10 ³ - 5·10 ³
Virus entéricos	10 ³	20 - 650
<i>Giardia</i>	0,5 - 10 ⁴	5 - 2,3·10 ³
<i>Ooquistes Cryptosporidium</i>	0,2 - 10 ³	150

3.4. Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada agrupan a un conjunto de procesos capaces de generar especies reactivas de oxígeno. Dichas especies transitorias poseen un alto poder oxidante y un ataque poco selectivo, capaces de mineralizar o formar compuestos intermedios más biodegradables que los iniciales. (Glaze, 1987)

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

Los radicales hidroxilo (·OH) son especies muy reactivas y atacan a la gran mayoría de las moléculas orgánicas, por lo que se caracterizan por su baja selectividad. Son especies más fuertes que otros oxidantes tradicionales como el

ozono, peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro o cloro. Presentan por tanto un mayor potencial estándar de oxidación como se puede ver en la Tabla 8. (Forero *et al.*, 2005)

Tabla 8. Potenciales estándar de oxidación.

Espece	E_0 (V,25°C)
F ₂	3,03
·OH	2,80
O atómico	2,42
O ₃	2,07
H ₂ O ₂	1,76
MnO ₄ ²⁻	1,67
Cl ₂	1,36
ClO ₂	1,15

3.4.1. Clasificación de los procesos de oxidación avanzada

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

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

- A. Energía procedente de la radiación ultravioleta (UV):
 - Ozonización y radiación ultravioleta (O₃/UV).
 - Peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta (H₂O₂/UV).
 - Ozono, peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta (O₃/H₂O₂/UV).
 - Foto-Fenton (Fe²⁺/H₂O₂/UV).
- B. Energía procedente de ultrasonidos (US):
 - Ozonización y ultrasonidos (O₃/US).
 - Peróxido de hidrógeno y ultrasonidos (H₂O₂/US).
- C. Electroquímica:
 - Oxidación electroquímica.

- Oxidación anódica.
- Electro-Fenton.

Los procesos homogéneos sin aporte de energía son los siguientes:

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

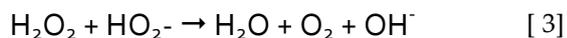
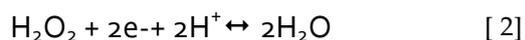
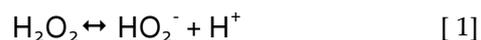
Por último, los procesos heterogéneos se clasifican en:

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

3.4.2. Introducción teórica de los POAs utilizados

Ozonización con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂)

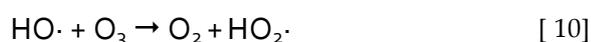
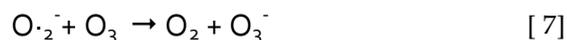
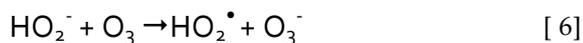
El peróxido de hidrógeno es un ácido débil, posee la característica que en disoluciones acuosas se disocia parcialmente en el ión hidroperóxido (HO₂⁻). Es un poderoso oxidante y un compuesto inestable que dismuta⁸, con una velocidad máxima si se trabaja con el pH de su pK_a. Dismuta según las siguientes reacciones [Ecuación 1-Ecuación 3]:



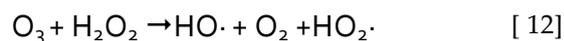
Se puede producir una destrucción adicional de la carga orgánica, si se combinan dos o más oxidantes, de tal manera que se aprovechen los efectos sinérgicos entre ellos.

La descomposición del ozono por transferencia de electrones es iniciada por el peróxido de hidrógeno. La reacción genera radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), de tal forma que se consumen ambos reactivos a través de un complejo mecanismo en cadena [Ecuación 4- Ecuación 11]:

⁸ Dismutación: reacción redox donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido cuando la suma de sus potenciales de los correspondientes pares redox es mayor de 0.



La ecuación global del proceso es la siguiente [Ecuación 12]:



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

Ozonización catalítica (O_3/TiO_2)

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

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

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

- En primer lugar se produce la adsorción simultánea del ozono y la materia orgánica o los subproductos de ozonización en la superficie del catalizador.
- Segundo, se produce la descomposición del ozono en los puntos activos del catalizador, generándose especies radicalarias más reactivas que el propio ozono. Estas especies oxidan los compuestos adsorbidos.
- Tercero, los productos finales de la oxidación son desorbidos, pues su afinidad con el catalizador es menor.

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

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

Capítulo 4. Procedimiento experimental

4.1. Metodología parámetros físico-químicos

La Tabla 9 muestra la metodología normalizada de análisis de los parámetros físico-químicos utilizados en la caracterización de las muestras analizadas durante los tratamientos estudiados, así como la instrumentación relacionada, el rango de medida y el error de dicha instrumentación.

Tabla 9. Instrumentación, metodología, rango de medida y error de cada uno de los instrumentos para la caracterización físico-química de las muestras. (Eaton et al., 2005)

Parámetro	Instrumento	Marca	Modelo	Rango medida	Error	Método Normalizado
pH Temperatura	pH-metro	Crison	GLP 21	2 a 16 -20 a 150 °C	$\leq 0,02$ $\leq 0,3$ °C	Método estándar ¹ 4500- HB
Conductividad	Conductímetro	Crison	Basic 30	0,01 a 19.999 $\mu\text{s cm}^{-1}$	$\leq 0,5$ $\mu\text{s cm}^{-1}$	Norma UNE 27888:1994
Turbidez	Turbidímetro	Hanna	LP 2000	00 a 50 NTU 50 a 10 ³ NTU	0,2 NTU	Norma ISO 7027: 1999
Absorbancia	Espectro- fotómetro UV/Visible	Thermos- pectronic	Helios α	-3 a 6 A	$\pm 0,005$ A	-----
Peróxido de hidrógeno residual	Test indicador de peróxidos (tiras reactivas)	Merck	Mercko quant®	0,5 a 25 mg L ⁻¹	-----	-----
Ozono residual	Test colorimétrico	Merck	Microq uant®	0,05 a 4,00 mg L ⁻¹	$\pm 0,1$ mg L ⁻¹	-----

4.2. Metodología análisis de *E.coli*

El indicador bacteriano de contaminación fecal objeto de estudio en el presente trabajo de investigación es la *Escherichia Coli*.

4.2.1. Procedimiento normalizado

El cultivo y recuento de *E.coli* se realiza siguiendo en gran parte el procedimiento descrito en la Norma Española UNE-EN 9308-1: "Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana."

Esta norma UNE ha sido adoptada íntegramente de la Norma Internacional ISO 9308-1:2000.

4.2.2. Medios de cultivo

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

El medio de cultivo es un ambiente artificial diseñado por el hombre para proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano en el laboratorio. En función del tipo de medio, se encuentran en estado líquido, sólido o semisólido. El medio sólido, es el que se utilizan en esta investigación, se presentan de manera diversa, pero la forma más común es desecada en forma de polvo fino o granular. Para su reconstitución, se suspende la cantidad precisa de polvo en agua destilada y se lleva a ebullición. Posteriormente, se esteriliza durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C en el autoclave. Tras finalizar el proceso de autoclavado, los frascos con el agar líquido se colocan en el baño termostático a 50 °C y se mantienen hasta su utilización. Si el medio de cultivo preparado no se utiliza inmediatamente, se guarda refrigerado y etiquetado durante un periodo no superior a un mes.

El medio que se utiliza para el crecimiento microbiano de *E.coli* es el agar MacConkey. Este es un medio selectivo diferencial utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Se utiliza con frecuencia para el aislamiento de coliformes. En la Tabla 10 se muestra la composición del agar MacConkey y en la Figura 1 el aspecto de colonias de *E.coli* en el medio de cultivo que se utiliza.

Tabla 10. Composición del agar MacConkey.

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



Figura 1. Aspecto de colonias de *E.coli* en el agar MacConkey

4.2.3. Equipos de laboratorio

Los equipos utilizados en el análisis microbiológico de *E.coli* se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos.

Instrumento	Marca	Modelo	Función
Estufas de cultivo	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Cultivo bacteriológico.
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Mantenimiento de ágares en estado líquido.
Autoclave	J.P. Selecta	437-P	Esterilización del material.
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Análisis microbiológico.
Mechero bunsen	-----	-----	Crear condiciones de esterilidad.
Agitador Vortex	Velp Scientifica	ZX3	Mezcla de soluciones en tubos.
Contador de colonias	Interscience	Scan 100	Contar las colonias que se ha formado

4.2.4. Diluciones decimales seriadas

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

A partir del agua natural (dilución 0), se toma 1 mL de la muestra con micropipeta y se transfiere a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9 % NaCl, estéril. A continuación, se homogeneiza en un vortex, obteniéndose de esta forma la dilución 1:10 (o dilución -1). Para hacer las diluciones sucesivas, se toma 1 mL de la dilución precedente bien homogeneizada y se lleva a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9% NaCl, todo ello en ambiente de trabajo estéril, proporcionado con un mechero Bunsen. La Figura 2 refleja el procedimiento de diluciones decimales seriadas de manera gráfica. (Lanao, 2012)

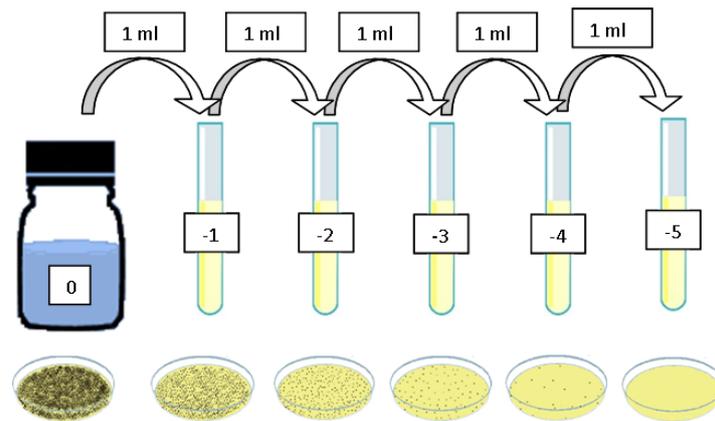


Figura 2. Esquema del método de diluciones seriadas.

4.2.5. 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 $600 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. Una vez ya se ha extendido la muestra por el Agar uniformemente se procede a la incubación de las placas de Petri en la estufa durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 42 ± 2 °C según establece la norma (UNE EN ISO 9308-1:2000).

4.2.6. Método de filtración de membrana

Se trata de una de las herramientas más versátiles en el análisis microbiológico del agua. El uso del método de filtración por membrana permite examinar grandes volúmenes de aguas en los que la concentración esperada de bacterias es inferior a $600 \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1}$.

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 es humedecer el filtro con suero fisiológico (NaCl 0,9 %) dejando pasar una cierta cantidad de suero a través del filtro y dejando el resto dentro del embudo para pasar a continuación la muestra original a filtrar. Por último se coge el filtro con las pinzas estériles y se transfiere a la placa Petri. Con el objetivo de asegurar la

obtención de placas con un número apropiado de colonias para el recuento (entre 20 y 200 UFC·L⁻¹) se filtran varios volúmenes.

Cuando ya se ha depositado el filtro en la placa Petri se procede a incubar las placas de Petri en la estufa durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 42 ± 2 °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.

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

Mediante el uso de pinzas previamente flameadas, y en presencia de una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, se coloca el filtro de membrana estéril (Millipore) de 0,45 µm de poro sobre el soporte de filtración (Figuras 3.a y 3.b). Una vez se haya adaptado el embudo (Figura 3.c), y tras humedecer el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada al 0,9% de NaCl estéril, se vierte la muestra previamente homogeneizada (Figura 3.d). Las muestras comprendidas entre 30 y 100 mL se añaden directamente al embudo de filtración, pero para las muestras entre 1 y 30 mL, se añaden primero al embudo entre 20-30 mL de agua destilada y a continuación, la muestra a filtrar.

Finalmente, se retira el embudo (Figura 3.e) y la membrana se transfiere al fondo de una placa de Petri pequeña (45 cm Ø) (Figura 3.f).

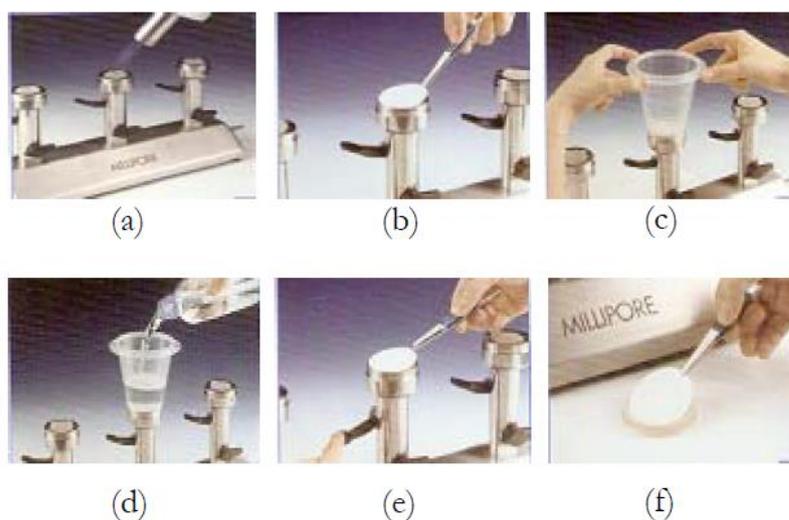


Figura 3. Método de filtración por membrana (Millipore).

4.2.7. Incubación

Las placas de Petri se invierten y se introducen en la estufa de incubación durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 42 ± 2 °C según establece la norma (UNE EN ISO 9308-1:2000).

4.2.8. Recuento e inactivación

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

El recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias con frecuencia crecen unidas en cadena o agrupadas. Por consiguiente, a menudo una colonia no se produce como resultado de una única bacteria. Para reflejar esta realidad los recuentos en placa se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) (Tortora *et al.*, 2007). Los datos de cada experimento realizado se expresan en UFC·100 mL⁻¹.

Es importante que el número de colonias que aparecen en las placas no sea demasiado grande, pues algunas colonias se pueden fusionar dando estimaciones erróneas. También se debe evitar que el número de colonias sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. Cuando no se detecta ningún microorganismo en la placa sembrada, el valor que se toma es 1 UFC·100 mL⁻¹ para permitir el cálculo posterior con logaritmos (Madigan *et al.*, 2003). Para obtener el número apropiado de colonias se diluye la muestra, tal y como se explica en el apartado 4.2.4

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la [Ecuación 13], donde F_d es el factor de dilución, es decir, la inversa de la dilución seleccionada.

$$\frac{\text{UFC}}{100 \text{ mL}} = \frac{\text{UFC}}{\text{mL muestra filtrado}} \cdot 100 \text{ mL} \cdot F_d \quad [13]$$

Para calcular la inactivación bacteriana y por tanto, evaluar la eficacia de un tratamiento en la desinfección de una muestra, se utilizan unidades logarítmicas. Para ello se utiliza la [Ecuación 14], donde N_0 es la población inicial bacteriana y N_t la población que sobrevive en un determinado tiempo t , ambos parámetros medidos en UFC·100 mL⁻¹.

$$\text{Inactivación bacteriana} = \text{Log}_{10} \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \quad [14]$$



Figura 4. Contador de colonias (Interscience Scan 100).

4.3. Tratamiento de los datos

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

Se seleccionan las placas que albergan un intervalo de colonias entre 15 y 150. Por debajo de ese límite inferior, el error es elevado y hay peligro de dar resultados ajenos a la realidad. Por encima del límite superior, las colonias presentan problemas de fusión.

Los resultados de inactivación bacteriana que se obtienen en los diferentes ensayos se expresan a partir de la media [Ecuación 15]. En las gráficas con barras de error se representa la media de los diferentes ensayos más menos su desviación estándar [Ecuación 16].

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N_r} \quad [15]$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_r} (X_i - \bar{X})^2}{N_r - 1}} \quad [16]$$

4.4. Modelos cinéticos de inactivación microbiana

4.4.1. Descripción de modelos

La microbiología predictiva es una parte esencial de la microbiología que pretende conocer la respuesta de las poblaciones microbianas frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos. Combina conocimientos de diferentes disciplinas (matemáticas, microbiología, ingeniería y química) con el objetivo común de desarrollar modelos matemáticos que describan y permitan predecir el ritmo de inactivación de los microorganismos de una determinada población, sometidos a condiciones tecnológicas o medioambientales determinadas (Gómez, 2005).

Dentro de los tipos modelos matemáticos existentes, este estudio de investigación se centra en los modelos de inactivación, modelos que estudian el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso. La inactivación bacteriana en aguas ha sido bastante estudiada en la última década aplicando una gran variedad de modelos cinéticos de desinfección. La modelización cinética nace con la finalidad de simplificar e idealizar fenómenos complejos (Lee y Nam, 2002). Con ella se consigue obtener una expresión matemática que facilite el diseño adecuado de un sistema de desinfección.

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

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

Modelo de Chick-Watson (1908)

Chick (1908) formula la primera cinética de inactivación de primer orden para la modelización de las gráficas de inactivación lineales. Con ella intenta explicar el proceso de desinfección como si de una reacción química se tratara. Considera que este proceso es análogo a una reacción química de primer orden en la que la velocidad de la reacción depende de las concentraciones relativas del desinfectante y los microorganismos, estando el desinfectante en exceso. Este modelo se expresa mediante la [Ecuación 17] donde N_t es el número de

bacterias supervivientes en el instante t , N_0 es el número de bacterias inicial ($t=0$) y k es la constante de velocidad de la reacción.

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad \Rightarrow \quad \text{Ln} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot t \quad [17]$$

En el mismo año Watson (1908) incluye una modificación al modelo de Chick, incorporando el efecto de la concentración del desinfectante en el proceso de desinfección. El modelo de Chick-Watson se representa por la [Ecuación 18], donde C es la concentración del desinfectante y n es el número de moléculas de desinfectante necesarias para la inactivación microbiana o también descrito como coeficiente de dilución, un factor empírico que suele considerarse la unidad. (Pernitsky et al., 1995; Li, 2004)

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot C \cdot N \quad \Rightarrow \quad \text{Ln} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t \quad [18]$$

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

Sin embargo, estos modelos lineales no permiten explicar desviaciones observadas en muchos procesos de inactivación microbiana, como se refleja en la Figura 5.

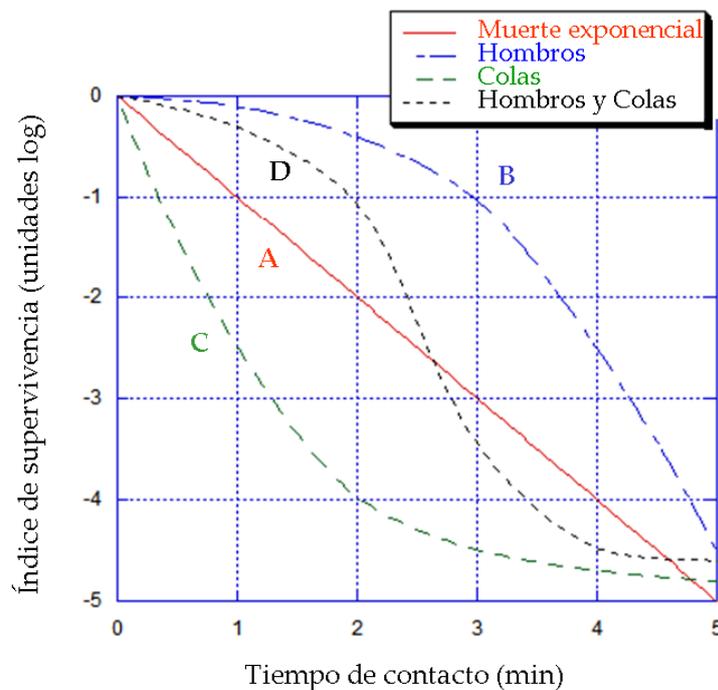


Figura 5. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: Gyürék and Finch, 1998).

La curva de inactivación A representa la cinética de primer orden o muerte exponencial, en la que la velocidad de inactivación es constante e independiente del tiempo de tratamiento. La curva B muestra un hombro inicial (shoulder) o fase "lag" en la que una fracción de microorganismos supervivientes se mantiene constante en los primeros instantes del tratamiento, produciéndose seguidamente un descenso lineal de los mismos. Se atribuye a una mezcla inadecuada del desinfectante en la muestra, un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos de acción bacterianos o a una resistencia inicial de los microorganismos al ataque del desinfectante. Las curvas C se caracterizan por una fase de inactivación lineal inicial rápida seguida de una disminución de las poblaciones lenta, lo que se traduce en la formación de una cola o tailing-off (*Gyürék y Finch, 1998*). Al igual que en el fenómeno de los hombros, existen varias teorías acerca de la aparición de colas. Puede ser debido a agrupaciones de microorganismos, a la presencia de subpoblaciones con una resistencia variable al desinfectante, bien de carácter innato o como respuesta a una adaptación al medio, o también, a que se produzca una disminución en la concentración del desinfectante durante el tratamiento. Finalmente, las curvas D presentan ambas desviaciones lineales, mostrando una fase inicial de hombro seguida de una fase lineal de inactivación y finalizando con un fenómeno de cola (curvas sigmoideas).

A partir de estas teorías se desarrollan cinéticas alternativas que permiten describir curvas de supervivencia no lineales y que han sido aplicados por numerosos autores para describir el comportamiento de diversos microorganismos en el campo de la desinfección (*Cho et al., 2003; Boyle et al., 2008; Gomes et al., 2009; Azzellino et al., 2011*).

La Tabla 12 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. La selección de estos modelos se realiza en base al principio de parsimonia según el cual los modelos han de ser tan simples como sea posible, es decir, con el menor número de parámetros posible (*Gómez, 2005*). La bondad del ajuste puede mejorar en gran medida añadiendo más parámetros al modelo; sin embargo, en ocasiones, aumentar mucho el número de parámetros puede llevar a que las predicciones no tengan sentido.

Tabla 12. Modelos cinéticos de estudio aplicados.

Modelo cinético	Ecuación integrada	Coefficientes cinéticos	Referencias
Modelo de Hom	$Log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -K \cdot t^m$	K, n, m	Hom, 1972
Modelo bifásico	$Log \frac{N_t}{N_0} = Log [P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - P) e^{-k_2 \cdot t}]$	P, k ₁ , k ₂	Pruitt y Kamau, 1993
Modelo de Mafart	$Log \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p$	δ, p	Mafart et al., 2002

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

Modelo de Hom (1972)

Hom, tras analizar los resultados de diversos experimentos de cloración sobre sistemas algales-bacterianos y observar que respondían a cinéticas curvilíneas más que a lineales, generalizó de manera empírica la ley de Chick-Watson mediante la [Ecuación 19], donde *k* es la constante de velocidad de inactivación de primer orden, *C* es la concentración del desinfectante, *n* el coeficiente de dilución y *m* una constante empírica del modelo (Li, 2004; Méndez et al., 2008). En el caso de que la concentración sea constante, el modelo se simplifica integrándose esta concentración en una constante de velocidad aparente (*k_{ap}*= *k* · *Cⁿ*) dando lugar a la [Ecuación 20], siendo esta *k_{ap}* una constante de pseudo-primer orden (min⁻¹) (Malato et al., 2009).

Este modelo no considera que el agua tenga una demanda de desinfectante y por tanto, que la concentración del mismo disminuya a lo largo del tratamiento (Haas y Joffe, 1994).

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot m \cdot C^n \cdot N \cdot t^{m-1} \quad \Leftrightarrow \quad Log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m \quad [19]$$

$$Log \frac{N_t}{N_0} = -k_{ap} \cdot t^m \quad [20]$$

El nivel de inactivación predicho por el modelo de Hom es una función no lineal de C y t , que dependen de los parámetros del modelo n y m , respectivamente. Este modelo puede describir las curvas A-D de la Figura 5 y se simplifica al modelo Chick-Watson para $n=1$ y $m=1$. Cuando m es menor que la unidad, se visualiza un efecto de cola o tailing-off.

Modelo Bifásico de Pruitt y Kamau (1993)

En 1993, Pruitt y Kamau establecen un modelo bifásico basado en la existencia de dos poblaciones microbianas que presentan una sensibilidad al tratamiento diferente, siguiendo en ambos casos una cinética de inactivación de primer orden. La expresión matemática del modelo se define por la [Ecuación 21], donde P significa la fracción de microorganismos supervivientes correspondientes a la subpoblación 1, $(1-P)$ es la fracción de supervivientes de la subpoblación 2, k_1 representa la constante de inactivación de la población sensible y k_2 es la constante de inactivación de la población resistente.

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} \left[P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1-P) \cdot e^{-k_2 \cdot t} \right] \quad [21]$$

Modelo de Mafart (2002)

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

El modelo asume que la inactivación microbiana se debe a la incapacidad de la célula para resistir las duras condiciones impuestas por algún tipo de estrés, después de cierto tiempo; también asume que la población es heterogénea, es decir, que cada célula tarda un tiempo diferente en morir. En definitiva, es un modelo que implica la existencia de una distribución de resistencias dentro de la población microbiana. La resistencia sigue una distribución de probabilidad de Weibull, definida por la [Ecuación 22].

Mafart (2002) modifica la ecuación Weibull según la [Ecuación 23], donde δ es el parámetro de escala y se corresponde con el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana y p es el

parámetro de forma n indica la forma de la curva de la ecuación, ya que ésta toma formas convexas cuando n es mayor que 1 y cóncavas cuando es menor que 1.

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

$$f(t) = \frac{n}{b} \left(\frac{t}{b} \right)^{n-1} e^{-\left(\frac{t}{b} \right)^n} \quad [22]$$

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad [23]$$

4.4.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error

Para obtener los coeficientes cinéticos de cada modelo descritos anteriormente, es necesario ajustar los valores experimentales a las correspondientes ecuaciones mediante técnicas de regresión no lineal. Los parámetros de los modelos se ajustan a ecuaciones mediante algoritmos interactivos basados en el método de los mínimos cuadrados (Pernistky *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2003). En la actualidad, muchos programas informáticos estadísticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utiliza la herramienta Solver y la herramienta de GInaFiT del programa Microsoft Excel (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool).

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

El coeficiente de determinación, R^2 , se utiliza como una medida global de la calidad del ajuste. Este coeficiente informa sobre la proporción de variabilidad total de la variable dependiente que es explicable por el modelo. Cuanto más cercano sea el valor R^2 a 1, mejor es la precisión predictiva del modelo, y por tanto, más concuerdan los valores predichos con los valores observados. La ecuación del coeficiente de determinación viene determinada

por la [Ecuación 24], donde \tilde{y}_i son los valores estimados \bar{y} es la media de los valores reales (Gómez, 2005).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad [24]$$

El error cuadrático medio, ECM, se define como la raíz cuadrada de la media del cuadrado de los residuos (diferencia entre los valores observados y los valores estimados) y viene determinado por la [Ecuación 25], donde n es el tamaño de la muestra. Un valor de ECM igual a 0 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los valores reales.

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y)^2}{n}} \quad [25]$$

Para comparar modelos diferentes se representan gráficamente los valores observados frente a los valores estimados. Si el modelo se ajusta perfectamente a los datos, los puntos se encuentran distribuidos a lo largo de la línea de equivalencia. La bondad del modelo será mayor cuanto más próximos estén los puntos a dicha línea (Gómez, 2005).

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

4.5. Muestras

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

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

Se decide que para poder determinar la influencia de los tratamientos de desinfección objeto de estudio se debe aumentar de manera artificial la concentración bacteriana originaria presente en el agua natural, partiendo así de una muestra fortificada. Para obtener dichas muestras fortificadas, se debe en primer lugar esterilizar las botellas de vidrio de Pyrex de 1L y todo aquel material que va estar en contacto con el agua natural para eliminar las bacterias presentes. Posteriormente, a partir de cultivos puros de *E.coli* que se encuentran en el laboratorio y tras la preparación de suspensiones bacterianas concentradas se añaden a las muestras de agua natural (Lanao, 2012). Las concentraciones iniciales de *E.coli* de la muestras fortificadas objeto de estudio van desde $3,04 \cdot 10^8 \text{ UFC} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ hasta $4,80 \cdot 10^8 \text{ UFC} \cdot 100\text{mL}^{-1}$.

4.6. Descripción de experimentos. Materiales y reactivos

4.6.1. Ozono

El ozono se genera “in situ” en el laboratorio mediante un ozonizador Fischer modelo 500. El equipo consta de dos electrodos entre los que se establece un alto voltaje y por los que fluye una corriente de oxígeno puro. En la descarga eléctrica que se produce, se genera oxígeno atómico que al combinarse con el molecular produce una molécula de ozono (Figura 6).

La descripción completa de la instalación de ozonización se detalla a continuación y se completa con la Figura 7.

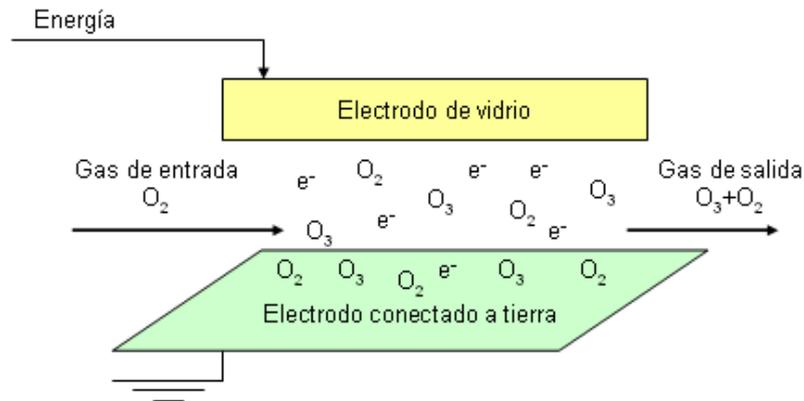


Figura 6. Esquema de generación de ozono mediante descarga eléctrica.

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

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

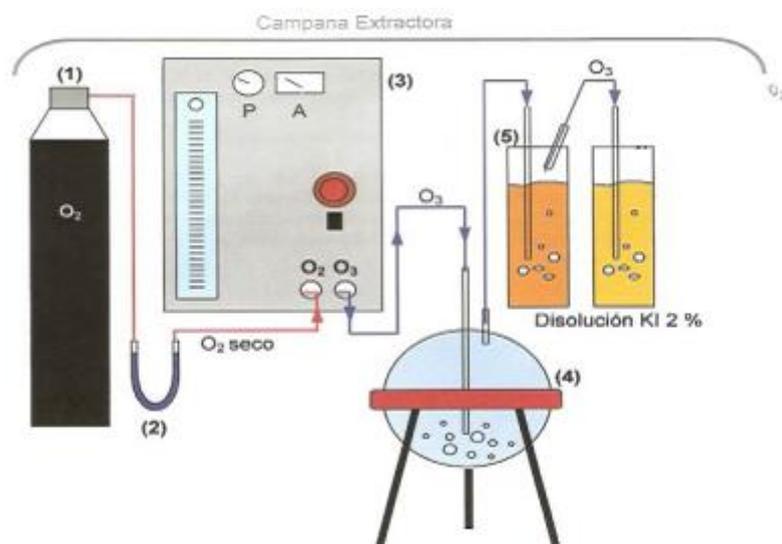


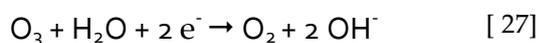
Figura 7. Descripción de la instalación de ozonización.

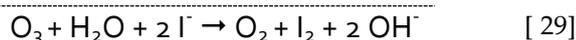
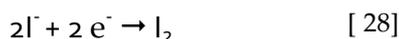
El O_3 consumido por la muestra se define por la [Ecuación 26]. El ozono residual disuelto en el agua se mide siguiendo la metodología mostrada en el apartado 4.1 del presente proyecto.

$$O_3 \text{ consumido} = O_3 \text{ introducido} - (O_3 \text{ no consumido} + O_3 \text{ residual disuelto}) \quad [26]$$

Para determinar la cantidad de ozono que se produce por unidad de oxígeno introducido, se realizan una serie de ensayos con caudales variables de oxígeno y con diferentes intervalos de tiempo, determinándose en cada caso la cantidad de ozono que se genera. Para ello se conectan tres borboteadores en serie directamente a la salida del ozonizador conteniendo cada uno 250 mL de KI al 2%. Durante un tiempo fijado, se hace pasar por el ozonizador un caudal de oxígeno de 50 y 100 L h⁻¹. La potencia de ozonización utilizada es 1,5 W y la presión de oxígeno aplicada es 0,5 bares.

La cantidad de ozono producida se calcula por el método iodométrico (*Kolthoff y Belcher, 1957*). Este método consiste en tomar muestras de la disolución de KI de los borboteadores para cada uno de los caudales de oxígeno y de los intervalos de tiempo utilizados y proceder a su valoración con tiosulfato sódico. Cuando el ozono reacciona con el yoduro, el ozono se reduce a oxígeno y el yoduro se oxida a yodo (I_2); la cantidad de ozono producida corresponde estequiométricamente con la cantidad de yodo generada en la disolución de KI [Ecuación 27-Ecuación 29]:





El procedimiento analítico consiste en la valoración del yodo formado con una disolución de tiosulfato sódico. Se añade 1ml de HCl 1N, ya que se requiere medio ácido para la valoración. Se comienza a valorar hasta que el color pardo rojizo que aparece como consecuencia del I₂ formado se torna amarillo pálido. En este momento se añade el indicador de almidón, puesto que si se añadiera a la muestra inicial, en la que la cantidad de yodo es muy superior, se formaría un complejo que impediría valorar el yodo correctamente. Al añadir el almidón, aparece un color morado que virará a incoloro tras haberse alcanzado el punto de equivalencia.

La cantidad de ozono generado, en mg·h⁻¹, se calcula según la [Ecuación 30] donde V es el volumen del agente valorante (tiosulfato sódico) consumido, N es la normalidad del tiosulfato, V' es el volumen de yoduro potásico utilizado en la valoración, t es el tiempo (en minutos) de funcionamiento del ozonizador y 24, el peso equivalente del ozono.

$$mgO_3h^{-1} = V \cdot N \cdot \left(\frac{250}{V'}\right) \cdot 24 \cdot \left(\frac{60}{t}\right) \quad [30]$$

Como se trabaja con tres borboteadores en serie, los mgO₃·h⁻¹ totales son la suma de los mg O₃·h⁻¹ retenidos por cada borboteador.

El agente valorante, tiosulfato sódico, al no ser patrón primario, se debe estandarizar con dicromato potásico para determinar exactamente su concentración (*Eaton et al., 2005*). Para ello, se toman 80 ml de agua destilada a la que se añaden 1 mL de HCl 1N, 1 g de KI y 10 mL de K₂Cr₂O₇ 0,1N. Esta mezcla debe permanecer 6 minutos en oscuridad antes de ser valorada con la disolución de tiosulfato que se va a estandarizar. Igualmente, se valora hasta que el color pardo rojizo pasa a amarillo y tras la adición del almidón, se valora hasta la desaparición del color morado. La normalidad real del tiosulfato sódico se calcula según la [Ecuación 31].

$$N_{Na_2S_2O_3} = \frac{1}{mL Na_2S_2O_3} \quad [31]$$

En la Figura 8 se representa la curva de calibrado del ozonizador para una un caudal de 50 L·h⁻¹. Se observa que el valor de R² de la recta de ajuste es próximo a 1 por lo que se utiliza la [Ecuación 32] de la recta de calibrado para el cálculo del ozono generado (introducido).

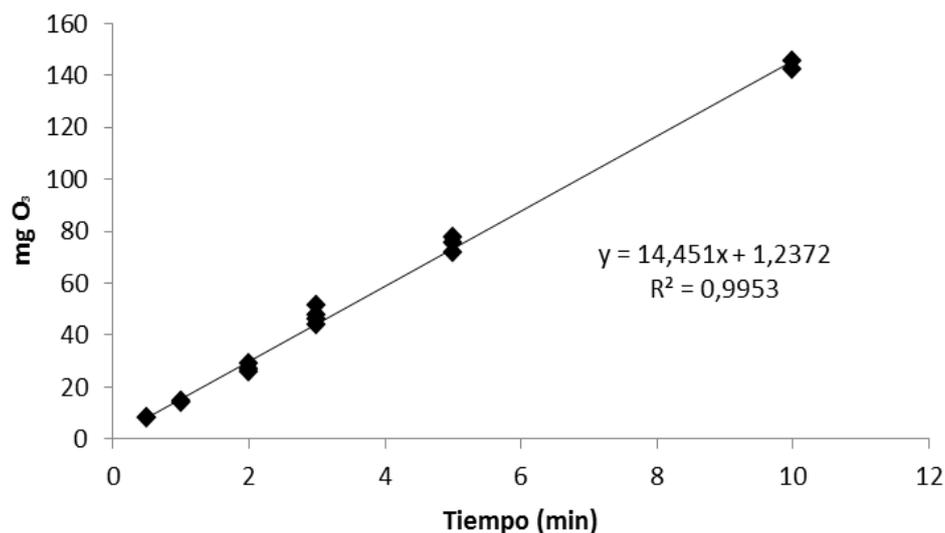


Figura 8. Curva de calibrado del ozonizador para un caudal de 50 L·h⁻¹. Potencia de ozonización 1,5 W y presión de oxígeno 0,5 bares.

$$O_3 \text{ generado (mgO}_3) = 14,451 \cdot T(\text{min}) + 1,2372 \quad [32]$$

4.6.2. Dióxido de titanio

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

4.6.3. Peróxido de hidrógeno

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

4.7. Condiciones de operación de los ensayos propuestos

El caudal de oxígeno seleccionado para los ensayos es 50 L·h⁻¹ y la dosis de ozono generada con este caudal de oxígeno es de 289 mgO₃·h⁻¹.

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

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

El reactor utilizado para los distintos tratamientos es un reactor de vidrio de Pyrex con forma cilíndrica y una capacidad de 0,750 L. Cada reactivo se adiciona directamente al reactor de vidrio instantes antes de comenzar la dosificación de ozono. Para evitar que el TiO₂ se deposite en el fondo del reactor a lo largo del experimento, se introduce un imán magnético en el reactor.

Cada experimento realizado corresponde con un tiempo de muestreo hasta un máximo de 10 minutos con el fin minimizar el error que se produce al tomar volúmenes de muestra. De cada experimento se toman muestras con el fin de evaluar la efectividad de los tratamientos sobre la población bacteriana a tratar. El ozono residual en las muestras tomadas se neutraliza con tiosulfato sódico 1N para evitar que estas dosis residuales sigan ejerciendo su efecto bactericida sobre las poblaciones supervivientes. Del mismo modo en los tratamientos en los que interviene el peróxido de hidrogeno se utiliza catalasa⁹ con una concentración de 0,1g·L⁻¹ para descomponerlo.

Cada tratamiento consta de 5 ensayos, a excepción del O₃/H₂O₂ en el que se realizan 6 ensayos. Cada ensayo corresponde a un tiempo y se realizan por duplicado.

En la Tabla 13 se muestran los experimentos realizados así como las condiciones de operación.

Tabla 13. Condiciones de operación de los tratamientos estudiados.

Tratamientos	Ozonización	O ₃ /H ₂ O ₂	O ₃ /TiO ₂	O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂
Numero de experimentos	10	12	10	10
Intervalos de tiempo	1-4-7-10	1-2-4-6-10	1-4-7-10	1-4-7-10
Concentración de H ₂ O ₂	-	4,55·10 ⁻³ mL _{H₂O₂} ·L ⁻¹ muestra	-	4,55·10 ⁻³ mL _{H₂O₂} ·L ⁻¹ muestra
Concentración de TiO ₂	-	-	1g _{TiO₂} ·L ⁻¹ muestra	1g _{TiO₂} ·L ⁻¹ muestra

⁹ Catalasa: Enzima oxidante que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno atómico.

Capítulo 5. Resultados

5.1. Resultados del tratamiento de ozonización

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *E.coli* antes y después del tratamiento de ozonización.

Tabla 14. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra de agua fortificada con *E.coli*.

Experimento		Ozonización
Condiciones F-Q		
Iniciales	pH	7,68
	Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)(20°C)	894
	Turbidez (U.N.T)	5,49
	S.S ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	9
Finales	pH	8,02
	Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)(20°C)	1253
	Turbidez (U.N.T)	80
	S.S ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	61

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

En la

Tabla 15 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *E.coli* y el O_3 consumido, expresado en $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para cada tiempo de muestreo. Esta cantidad de ozono consumido por la muestra se calcula por la diferencia entre el ozono introducido y el ozono en exceso, tal y como se detalla en el apartado 4.6.2.

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

Se observa que al finalizar el tratamiento no se consigue una inactivación total de la población inicial.

Tabla 15. Condiciones del tratamiento de ozonización e inactivación de *E.coli* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	1	4	7	10
N _t (UFC 100mL ⁻¹)	3,54·10 ⁸	1,39·10 ⁵	1,25·10 ⁴	6,08·10 ³	4,65·10 ³
Log(N _t /N ₀)	0	-3,61	-4,57	-4,88	-4,97
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	10,69	30,08	55,09	62,18

La Figura 9 muestra los resultados gráficos del tratamiento de ozonización en el que se representa la inactivación de *E.coli* en función del ozono (mgO₃·L⁻¹) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos realizados. La mayor desviación obtenida en este tratamiento corresponde a un valor de ± 0,52 unidades.

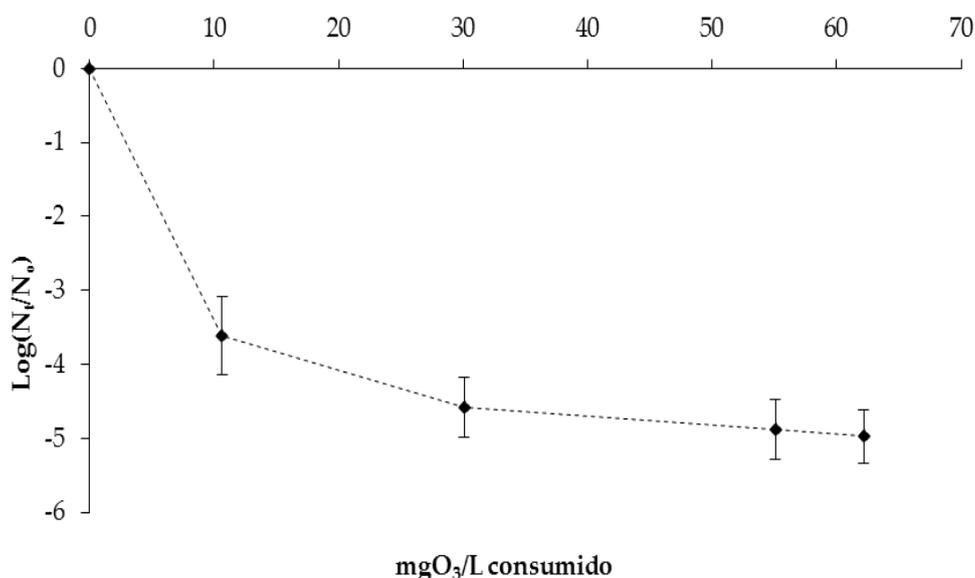


Figura 9. Inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización. N₀= 3,54·10⁸ UFC·100mL⁻¹.

Para alcanzar 4 unidades logarítmicas de inactivación (o una reducción del 99,99%) la dosis de ozono necesaria es de 19 mg O₃ L⁻¹. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos recomienda una reducción de 6 logaritmos para el control de la bacterias (USEPA, 2004), sin embargo, la elección de tomar como referencia 4 unidades logarítmicas de inactivación se debe principalmente a 2 razones. La primera, se debe a que, tal y como se documenta en la Tabla 7, la carga biológica de las aguas del Canal Imperial de Aragón, antes de su tratamiento de potabilización, puede alcanzar niveles de

hasta 10^4 UFC·100 mL⁻¹. Y la segunda, está relacionada con la tesis Doctoral de Dña. Munia Lanao con la que se comparan los resultados obtenidos, ya que son 4 las unidades logarítmicas de inactivación que toma como referencia para obtener la dosis de ozono necesaria para alcanzar dicha inactivación.

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

Se establece como referencia una dosis de 3 mg·L⁻¹ de ozono, dosis utilizada habitualmente en ETAPs en España (Mosteo et al., 2009). La eliminación logarítmica alcanzada de *E.coli* en el tratamiento de ozonización es de 1 unidad logarítmica.

Si se considera una desinfección total de la muestra tras los 10 minutos de tratamiento, la ozonización consigue recuentos bacterianos finales bajos debidos principalmente a la presencia de materia orgánica. (Lanao, 2012)

La comparación de los resultados obtenidos en este tratamiento con los obtenidos por Dña. Munia Lanao en su tesis para la eliminación de *Enterococcus* sp. y células vegetativas de *C. perfringens*. indican que para un nivel de inactivación de 4 órdenes de magnitud, la dosis de ozono necesaria para la eliminación de *E.coli* es superior respecto a la dosis requerida para la eliminación de *Enterococcus* sp. y *C. perfringens*. Las dosis requeridas para este nivel de inactivación son aproximadamente 19 mg·L⁻¹ de ozono, 12,4 mg·L⁻¹ de ozono y 3,6 mg·L⁻¹ de ozono para *E.coli*, *Enterococcus* sp. y *C. perfringens* respectivamente. Si se comparan con la dosis de referencia de 3 mg·L⁻¹ de ozono, se observa que se produce una desinfección menor en el tratamiento con la *E.coli* respecto a *Enterococcus* sp. y células vegetativas de *C. perfringens*. Esta conclusión se sostiene con los reducciones logarítmicas obtenidas para *E.coli*, *Enterococcus* sp. y *C. perfringens* que son 1 unidad logarítmica, 1,4 unidades logarítmicas y 2,8 unidades logarítmicas respectivamente.

Se puede afirmar por tanto que la resistencia de *E.coli* para una misma dosis de ozono y una misma inactivación es mayor. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las condiciones en que tienen lugar dichos tratamientos no son las mismas, tanto el volumen tratado, como el caudal de oxígeno y la dosis de ozono generada son distintos. La Tabla 16 resume las condiciones en que tienen lugar los distintos tratamientos.

Tabla 16. Resumen de las condiciones en los tratamientos para la eliminación de *E.coli* y *Enterococcus sp.*

Condiciones	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
Volumen de muestra (L)	0,75	1,5
Caudal de O ₂ (L·h ⁻¹)	50	100
Dosis de O ₃ generado (mgO ₃ ·h ⁻¹)	289	578

5.2. Resultados del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂)

En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *E.coli* antes y después del tratamiento con peroxona.

Tabla 17. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con *E.coli*.

Condiciones F-Q		Experimentos	O ₃ /H ₂ O ₂
Iniciales	pH		7,44
	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)		894
	Turbidez (U.N.T)		3,67
	S.S (mg·L ⁻¹)		1
Finales	pH		8,12
	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)		1253
	Turbidez (U.N.T)		87
	S.S (mg·L ⁻¹)		71

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

En la Tabla 18 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *E.coli* y el O₃ consumido, expresado en mgO₃·L⁻¹ para cada tiempo de muestreo. Se observa que al finalizar el tratamiento no se consigue una inactivación total de la población inicial.

Tabla 18. Condiciones del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno e inactivación de *E.coli* a lo largo del tiempo.

Tiempo (min)	0	1	2	4	7	10
Nt (UFC 100mL ⁻¹)	4,35·10 ⁸	2,48·10 ⁴	4,89·10 ³	1,48·10 ³	1,26·10 ³	1,31·10 ²
Log(N _t /N ₀)	0	-4,25	-4,95	-5,49	-6,14	-6,78
mg O ₃ · L ⁻¹ consumido	0	10,64	17,07	29,91	42,76	68,46

La Figura 10 muestra los resultados gráficos del tratamiento de O₃ combinado con H₂O₂ en el que se representa la inactivación de *E.coli* en función del ozono (mgO₃·L⁻¹) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos realizados. Se observa que las mayores desviaciones de los datos obtenidos en este tratamiento se encuentran entorno a ± 0,62 unidades. Se obtiene por tanto, una desviación mayor que en el caso del ozono, sin embargo, las mayores desviaciones corresponden a los últimos datos, no así en el caso del ozono, que la desviación es más o menos constante en los diferentes ensayos.

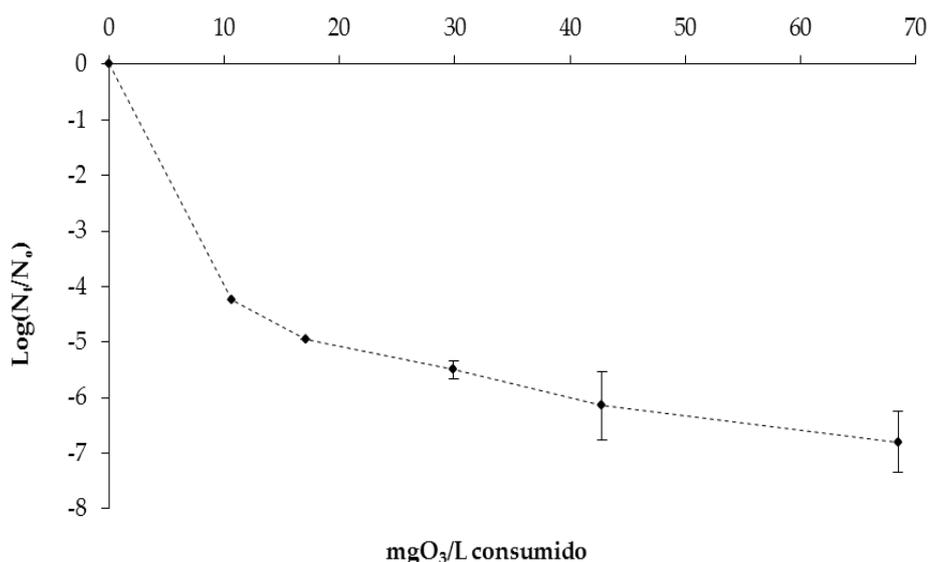


Figura 10. Inactivación de *E.coli* en el tratamiento de peroxona sobre la muestra de agua fortificada con *E.coli*. N₀= 4,35·10⁸ UFC·100 mL⁻¹. [H₂O₂]=0,04 mM.

Se observa que la inactivación es mayor que en el caso de la ozonización. Se produce una continuada reducción logarítmica hasta llegar a una desinfección cercana a las 7 unidades logarítmicas. La presencia de peróxido de hidrógeno tras este tratamiento es prácticamente nula ya que se neutraliza con catalasa.

El orden de inactivación fijado en el apartado 5.1 de 4 unidades logarítmicas de inactivación se alcanza cuando la dosis de ozono es de 10 mg O₃ L⁻¹. Esta dosis es aproximadamente la mitad de la dosis necesaria para alcanzar la misma desinfección en el tratamiento de ozonización. Por lo tanto se pone de manifiesto el efecto positivo de la combinación de ozono y peróxido en la desinfección.

Si se toma como referencia una dosis de 3 mg O₃·L⁻¹ la inactivación es de 1 unidades logarítmicas, es decir, se consigue una desinfección igual para esta dosis respecto al tratamiento de ozonización. Sin embargo, la reducción logarítmica con este tratamiento, tomando dosis de ozono mayores, es muy superior al tratamiento basado en ozono.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos por Dña. Munia Lanao se observa que el orden de inactivación fijado de 4 unidades logarítmicas para *E.coli* se alcanza cuando la dosis de ozono es más del doble de la requerida para la inactivación de *Enterococcus* sp. y casi 4 veces mayor de la requerida para la inactivación de *C. perfringens*. Si se comparan con la dosis de referencia de 3 mg·L⁻¹ de ozono, se observa que se produce una desinfección menor en el tratamiento con la *E.coli* respecto a *Enterococcus* sp. y células vegetativas de *C. perfringens* ya que los resultados obtenidos de inactivación son para *E.coli*, *Enterococcus* sp. y *C. perfringens* de 1 unidad logarítmica, 2,7 unidades logarítmicas y 4,5 unidades logarítmicas respectivamente. Se debe tener en cuenta, tal y como se afirma en el apartado 5.1, que las condiciones en las que tienen lugar dichos tratamientos son diferentes.

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

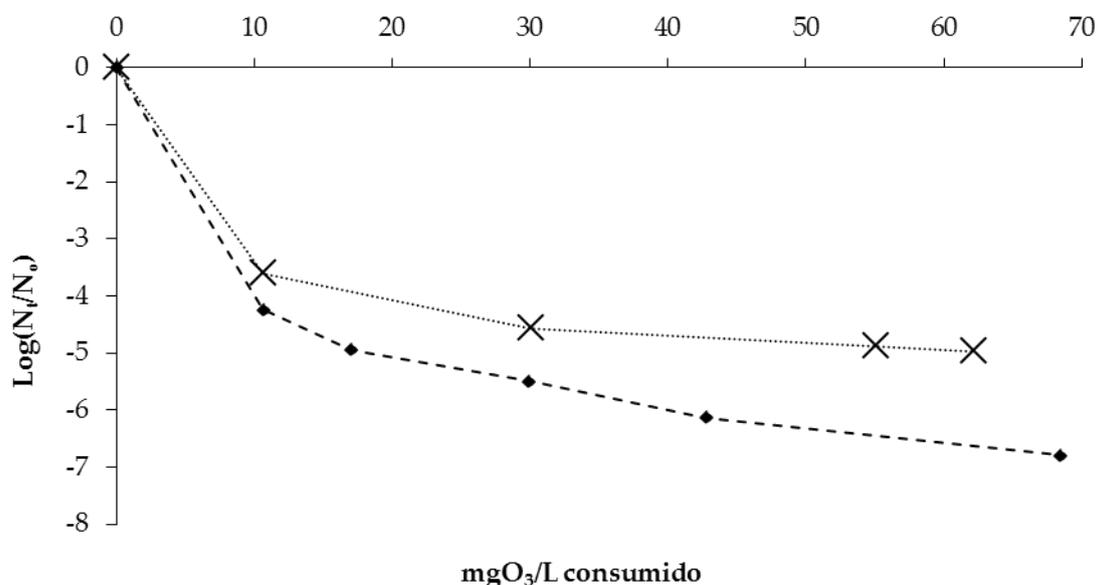


Figura 11. Inactivación de *E.coli* en los tratamiento con O₃ (×) y O₃/H₂O₂ (◆). N₀ ≈ 10⁸ UFC· 100 mL⁻¹. [H₂O₂]=0,04 mM.

5.3. Resultados del tratamiento de ozonización catalítica.

Ozono combinado con dióxido de titanio (O₃/TiO₂)

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *E.coli* antes y después del tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

Tabla 19. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ sobre el agua fortificada con *E.coli*.

Experimentos		O ₃ /TiO ₂
Condiciones F-Q		
Iniciales	pH	7,75
	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)	894
	Turbidez (U.N.T)	133
	S.S (mg·L ⁻¹)	9
Finales	pH	8,18
	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)	778
	Turbidez (U.N.T)	299
	S.S (mg·L ⁻¹)	24

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

En la Tabla 20 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *E.coli* y el O₃ consumido, expresado en mgO₃·L⁻¹ para cada experimento que corresponde con un tiempo. Se observa que al finalizar el tratamiento no se consigue una inactivación total de la población inicial.

Tabla 20. Condiciones del tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ e inactivación de *E.coli* a lo largo del tiempo. [TiO₂]= 1 g L⁻¹.

Tiempo (min)	0	1	4	7	10
Nt (UFC 100mL ⁻¹)	4,14·10 ⁸	2,78·10 ⁴	3,16·10 ³	9,18·10 ²	1,92·10 ²
Log(N/N ₀)	0	-4,14	-5,18	-5,48	-6,19

mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	4,08	20,22	36,36	52,5
--	---	------	-------	-------	------

La Figura 12 muestra los resultados gráficos del tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ en el que se representa la inactivación de *E.coli* en función del ozono (mgO₃·L⁻¹) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos realizados. Se puede observar que las mayores desviaciones de los datos obtenidos en este tratamiento se encuentran entorno a ± 0,19 unidades. Se obtiene por tanto, una desviación mucho menor que en los tratamientos con ozono y ozono combinado con peróxido de hidrógeno.

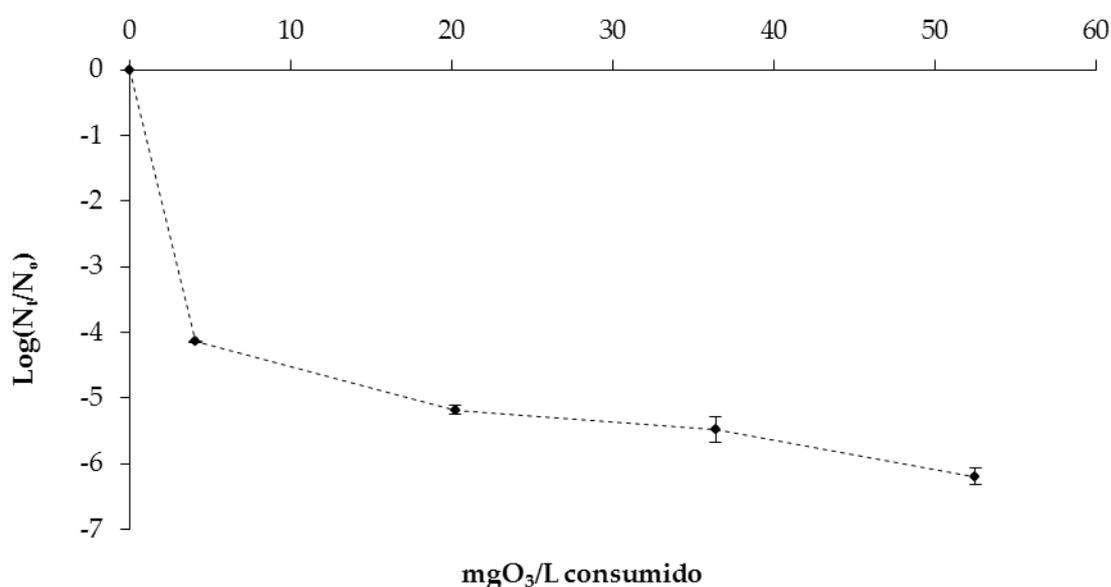


Figura 12. Inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozono combinado con TiO₂ sobre la muestra agua fortificada. N₀ = 4,14·10⁸ UFC· 100 mL⁻¹. [TiO₂]= 1 g·L⁻¹.

La dosis de ozono necesaria en este tratamiento es aproximadamente la mitad de la dosis necesaria para alcanzar la misma desinfección con el tratamiento de ozonización. En consecuencia, se reitera el efecto positivo de la combinación de ozono con dióxido de titanio en la desinfección.

Para alcanzar un nivel de inactivación de 4 unidades logarítmicas, la dosis de ozono necesaria es 4 mg·L⁻¹, dosis aproximadamente 5 veces inferior a la necesaria para el tratamiento de ozonización, y 2,5 veces inferior a la observada en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno. Si se compara la inactivación para una dosis de 3 mgO₃·L⁻¹ con la obtenida en los otros tratamientos se reitera el efecto positivo de este tratamiento ya que se obtiene una desinfección de 3 unidades logarítmicas mientras que en los

anteriores tratamientos tan solo se obtienen desinfecciones próximas a 1 unidad logarítmica.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos por Dña. Munia Lanao se observa que el orden de inactivación fijado de 4 unidades logarítmicas para la *E.coli* se alcanza cuando la dosis de ozono es inferior a la requerida para la inactivación de *Enterococcus* sp. pero muy similar a la requerida para la inactivación de *C. perfringens.*, siendo las dosis de ozono de $4 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, $6,5 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ y $4,15 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para la *E.coli*, *Enterococcus* sp. y *C. perfringens.* respectivamente. Sin embargo al comparar la inactivación para una dosis de referencia de $3 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, se obtiene una inactivación mayor para la *E.coli* respecto a los *Enterococcus* sp., y similar respecto a *C. perfringens.* siendo sus valores de inactivación de 3, 2,7 y 3,1 respectivamente.

La Figura 13 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozonización, ozono combinado con peróxido de hidrógeno y ozono combinado con dióxido de titanio.

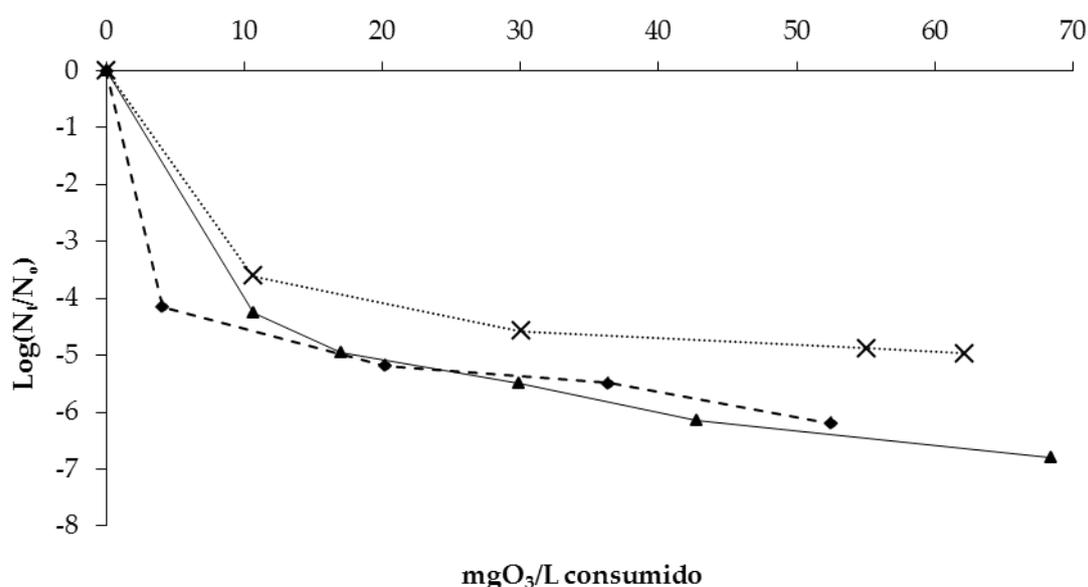


Figura 13. Inactivación de *E.coli* tras los tratamiento con O_3 (\times), O_3/TiO_2 (\blacklozenge) y $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (\blacktriangle).
 $N_0 \approx 10^8 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. $[\text{TiO}_2]=1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,04 \text{ mM}$.

5.4. Resultados del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$)

En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros físico-químicos en las muestras de agua fortificadas con *E.coli* antes

y después del tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio.

Tabla 21. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂ sobre la muestra agua fortificada con *E.coli*. [H₂O₂]=0,04mM. [TiO₂]=1 g·L⁻¹.

Experimentos		O ₃ /H ₂ O ₂ / TiO ₂
Condiciones F-Q		
Iniciales	pH	7,68
	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)	894
	Turbidez (U.N.T)	5,49
	S.S (mg·L ⁻¹)	9
Finales	pH	8,02
	Conductividad (μS·cm ⁻¹)(20°C)	1253
	Turbidez (U.N.T)	87
	S.S (mg·L ⁻¹)	71

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

La presencia de peróxido de hidrógeno tras este tratamiento es prácticamente nula ya que se neutraliza, de igual forma que en el apartado 5.2, con catalasa.

En la Tabla 22 se muestra el recuento de colonias, las reducciones logarítmicas de *E.coli* y el O₃ consumido, expresado en mgO₃·L⁻¹ para cada tiempo de muestreo. Se observa que al finalizar el tratamiento no se consigue una inactivación total de la población inicial.

Tabla 22. Condiciones del tratamiento de O₃ combinado con TiO₂ y H₂O₂ sobre la muestra agua fortificada con *E.coli*. [H₂O₂]=0,04mM. [TiO₂]=1 g·L⁻¹.

Tiempo (min)	0	1	4	7	10
N _t (UFC 100mL ⁻¹)	4,35·10 ⁸	1,09·10 ⁶	5,60·10 ⁴	7,18·10 ³	5,89·10 ³
Log(N _t /N ₀)	0	-3,20	-4,40	-4,90	-5,08
mg O ₃ ·L ⁻¹ consumido	0	4,14	19,44	34,74	50,04

La Figura 14 muestra los resultados gráficos del tratamiento de O_3 combinado con H_2O_2 y TiO_2 en el que se representa la inactivación de *E.coli* en función del ozono ($mgO_3 \cdot L^{-1}$) consumido por la muestra, así como la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos realizados. Se puede observar que las mayores desviaciones de los datos obtenidos en este tratamiento se encuentran entorno a $\pm 0,95$ unidades. Se obtiene por tanto, en este tratamiento, la mayor desviación por lo que se puede afirmar que este ensayo posee un error mayor.

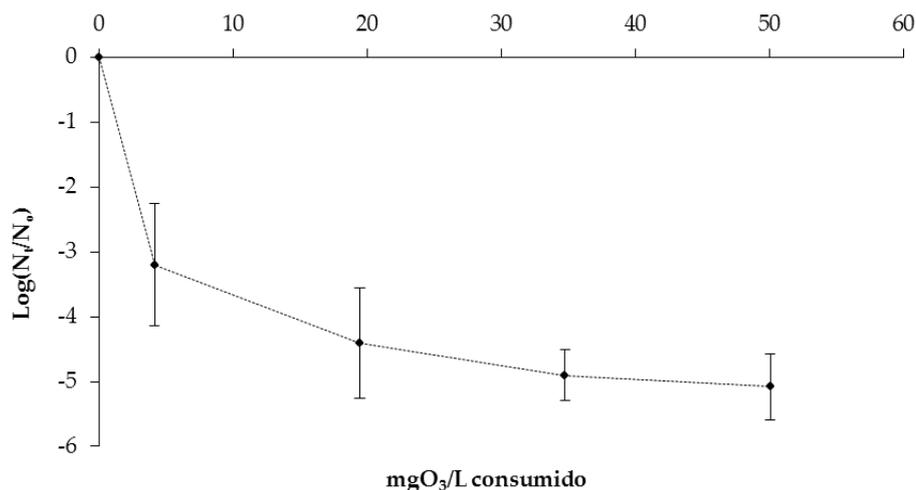


Figura 14. Inactivación de *E.coli* en el tratamiento $O_3/H_2O_2/TiO_2$ sobre la muestra de agua fortificada. $N_0 = 4,35 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100mL^{-1}$. $[H_2O_2] = 0,04mM$. $[TiO_2] = 1 g \cdot L^{-1}$.

Se observa que para una inactivación de referencia de 4 unidades logarítmicas la dosis de ozono necesaria es $15 mgO_3 \cdot L^{-1}$. Esta dosis de ozono es inferior a la que se obtiene para la misma inactivación en el tratamiento de ozonización y superior respecto a los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y ozono combinado con dióxido de titanio. Si se toma como referencia una dosis de ozono de $3 mgO_3 \cdot L^{-1}$ la inactivación que se obtiene es de 2,2 unidades logarítmicas. Esta inactivación es superior a la que se obtiene en el tratamiento de ozonización y ozono combinado con peróxido de hidrógeno, pero inferior a la que se obtiene en el tratamiento de ozono combinado con dióxido de titanio.

Los resultados obtenidos en este tratamiento se asemejan a los obtenidos por Dña. Munia Lanao en su tesis. En ambos casos se puede afirmar que la adición de H_2O_2 y TiO_2 por separado y en conjunto, mejoran la desinfección obtenida con respecto al tratamiento de ozonización en solitario.

Esta combinación no supone una mejora sobre el tratamiento de O_3 combinado con TiO_2 ni desde el punto de vista de inactivación ni desde el

punto de vista de dosis de ozono, pero si supone una mejora sobre el tratamiento de O₃ combinado con H₂O₂ ya que la inactivación que se obtiene para dosis bajas de ozono es superior en el tratamiento de combinación de ozono con H₂O₂ y TiO₂ que de ozono combinado con H₂O₂. Sin embargo, se debe destacar que los resultados de inactivación final que se obtienen en el tratamiento de ozono combinado con H₂O₂ son más altos que en el tratamiento de ozono combinado con H₂O₂ y TiO₂.

Si comparamos la dosis de ozono necesaria en este tratamiento para una inactivación de 4 unidades logarítmicas respecto al tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno se obtiene conclusiones semejantes a las obtenidas por Dña. Munia Lanao ya que en ambos casos la dosis de ozono requerida es superior en el tratamiento de ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. Sin embargo, la única diferencia que existe con las afirmaciones de Dña. Munia Lanao para este tratamiento, es la mejora que supone este tratamiento sobre el ozono combinado con peróxido de hidrógeno para una misma dosis de O₃. Debido a que la inactivación obtenida para una dosis de 3 mgO₃·L⁻¹ es superior en este tratamiento de combinación de O₃/H₂O₂/TiO₂ respecto al tratamiento de O₃ combinado con H₂O₂, siendo las inactivaciones obtenidas de 2,2 unidades logarítmicas y 1 unidad logarítmica para la combinación de O₃/H₂O₂/TiO₂ y la combinación de O₃/H₂O₂ respectivamente.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos por Dña. Munia Lanao se observa que el orden de inactivación fijado de 4 unidades logarítmicas para la *E.coli* se alcanza cuando la dosis de ozono es aproximadamente 1,5 veces más de la requerida para la inactivación de *Enterococcus* sp., siendo dichas dosis de 15 mgO₃·L⁻¹ y 10 mgO₃·L⁻¹ para *E.coli* y *Enterococcus* sp. respectivamente. Si se compara la inactivación para una dosis de referencia de 3 mgO₃·L⁻¹, se obtienen inactivaciones de 2,2 unidades logarítmicas tanto para *E.coli* como para *Enterococcus* sp.

La Figura 15 muestra una comparación gráfica de los valores obtenidos en los tratamientos de ozonización, ozono combinado con peróxido de hidrógeno, ozono combinado con dióxido de titanio y ozono combinado.

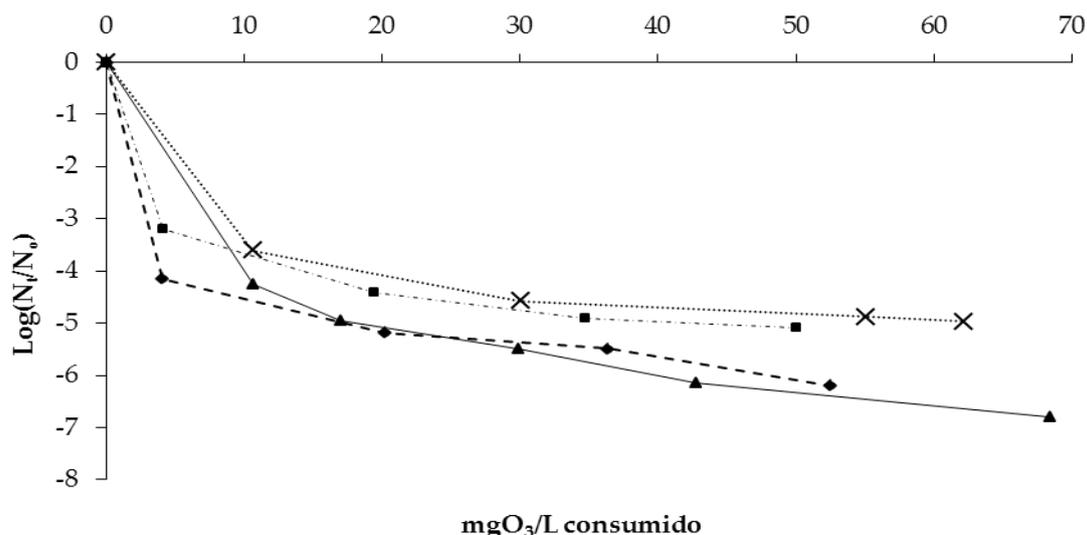


Figura 15. . Inactivación de *E.coli* tras los tratamiento con O₃ (×), O₃/TiO₂ (♦), O₃/H₂O₂ (▲). H₂O₂/TiO₂/O₃ (■). N₀ ≈ 10⁸ UFC· 100 mL⁻¹. [H₂O₂]=0,04 mM. [TiO₂]=1 g L⁻¹.

En la Tabla 23 se muestran un resumen de los resultados de los parámetros (dosis de ozono necesaria para una inactivación de 4 unidades logarítmicas de inactivación e inactivación para una dosis de 3 mgO₃·L⁻¹) que se han explicado en este Capítulo 5 en los apartados 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4.

Tabla 23. Resumen de los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección estudiados para *E.coli* en comparación con *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*.

Tratamiento	Microorganismo	Dosis de Ozono necesario para la inactivación de 4 unidades logarítmicas (mgO ₃ ·L ⁻¹)	Inactivación para una dosis de 3 mgO ₃ ·L ⁻¹ (unidades logarítmicas)
Ozonización	<i>E.coli</i>	19	1
	<i>Enterococcus sp.</i>	12,4	1,4
	<i>C. perfringens</i>	3,6	2,8
O ₃ /H ₂ O ₂	<i>E.coli</i>	10	1
	<i>Enterococcus sp.</i>	5,7	2,7
	<i>C. perfringens</i>	2,7	4,5
O ₃ /TiO ₂	<i>E.coli</i>	4	3
	<i>Enterococcus sp.</i>	6,5	2,7
	<i>C. perfringens</i>	4,25	4,25
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	<i>E.coli</i>	15	2,2
	<i>Enterococcus sp.</i>	10	2,2

5.5. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *E.coli* obtenidos durante los tratamientos de ozonización, peroxona, ozono combinado con dióxido de titanio y ozono combinado con peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio O₃/H₂O₂/TiO₂, se analizan a través de 3 modelos matemáticos, el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

Las Tablas 23, 24, 25 y 26 recogen los valores de los parámetros cinéticos obtenidos tras aplicar los modelos matemáticos seleccionados sobre las curvas de inactivación de la *E.coli* durante los tratamientos de ozonización, peroxona, ozono combinado con dióxido de titanio y ozono combinado con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno, respectivamente.

Tabla 24. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización.

Modelo de Hom					
<i>E.coli</i>	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m	ECM	R ²	
	3,27	0,20	0,24	0,99	
Modelo bifásico					
<i>E.coli</i>	f	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	R ²
	0,99997	8,48	0,15	0,044	0,99
Modelo de Mafart					
<i>E.coli</i>	p	δ (min)	ECM	R ²	
	0,30	0,08	0,61	0,95	

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

Tabla 25. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de peroxona.

Modelo de Hom					
<i>E.coli</i>	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m		ECM	R^2
	4,24	0,20		0,06	0,99
Modelo bifásico					
<i>E.coli</i>	f	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R^2
	1,00	10,10	0,53	0,089	0,99
Modelo de Mafart					
<i>E.coli</i>	p	δ (min)		ECM	R^2
	0,37	0,08		0,59	0,94

Tabla 26. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de O_3/TiO_2 .

Modelo de Hom					
<i>E.coli</i>	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m		ECM	R^2
	4,10	0,17		0,13	0,99
Modelo bifásico					
<i>E.coli</i>	f	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R^2
	0,99	20,32	0,50	0,15	0,99
Modelo de Mafart					
<i>E.coli</i>	p	δ (min)		ECM	R^2
	0,17	$2,22 \cdot 10^{-4}$		0,13	0,99

Tabla 27. Parámetros cinéticos del modelo de Hom, modelo bifásico y modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de O₃/TiO₂/H₂O₂.

Modelo de Hom					
<i>E.coli</i>	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m		ECM	R ²
	3,27	0,20		0,085	0,99
Modelo bifásico					
<i>E.coli</i>	f	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	R ²
	0,99	7,51	0,26	0,07	0,99
Modelo de Mafart					
<i>E.coli</i>	p	δ (min)		ECM	R ²
	1,13	0,65		0,95	0,81

Los valores de las constantes de velocidad de inactivación (k_{ap} en el modelo de Hom y k_1 y k_2 en el modelo bifásico) son inferiores en el tratamiento de ozonización con respecto a los tratamientos peroxona, O₃/TiO₂, a excepción del valor de K_{ap} en el modelo de Hom y de K_1 en el bifásico del tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂ que es el mismo y menor respectivamente. El valor del parámetro δ del modelo de Mafart es inferior en el tratamiento de O₃/TiO₂ y O₃/H₂O₂/TiO₂ por lo que alcanzan la unidad logarítmica de inactivación en menor tiempo que en el proceso de ozonización, cuyo valor coincide con el obtenido en el tratamiento con peroxona.

A partir de los resultados del R² (explicado en el apartado 4.4.2) se puede afirmar que la precisión predictiva de la mayoría de los modelos es buena, ya que se obtienen valores muy cercanos a 1. Sin embargo, la precisión predictiva del modelo Mafart, excepto para el tratamiento con O₃/TiO₂, no es buena en comparación con los otros modelos.

Se puede afirmar a partir los valores obtenidos del ECM (explicado en el apartado 4.4.2) que los resultados predichos se asemejan a los resultados reales. Sin embargo, no se puede afirmar que exista un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los valores reales en todos los modelos ya que los valores del ECM para algunos modelos son más cercanos a 1 que a 0. Los valores del ECM del modelo Mafart para los tratamientos con peroxona y O₃/TiO₂/H₂O₂ son un perfecto ejemplo.

En la Figura 16 se refleja de manera gráfica los ajustes de los modelos aplicados sobre la curva de inactivación de *E.coli* frente a los distintos tratamientos estudiados.

Las Figura 17, 18, 19 y 20 muestran la otra forma de poder observar los ajustes de los modelos aplicados sobre los resultados que se han obtenido experimentalmente mediante la representación de los valores observados de inactivación y los estimados mediante los modelos cinéticos.

Se observa que no todos los resultados observados se ajustan a los modelos cinéticos aunque si se aproximan a éstos. Los resultados del tratamiento de ozonización se ajustan bien con el modelo bifásico pero no con el modelo de Mafart. Del mismo modo, en el tratamiento con peroxona, la nube de puntos que corresponde con los resultados observados se ajusta mejor con el modelo bifásico y con el modelo Hom que con el modelo Mafart. Por otro lado, los resultados del tratamiento de combinación de ozono y dióxido de titanio, se ajustan bien con los tres modelos matemáticos. Y finalmente, igual que ocurre con los resultados del tratamiento de combinación de ozono y peróxido de hidrógeno, la nube de puntos que corresponde con los resultados del tratamiento de combinación de ozono, dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno se ajusta bien a los modelos bifásico y Hom, mientras que se observa un pero ajuste de los resultados observados con el modelo Mafart.

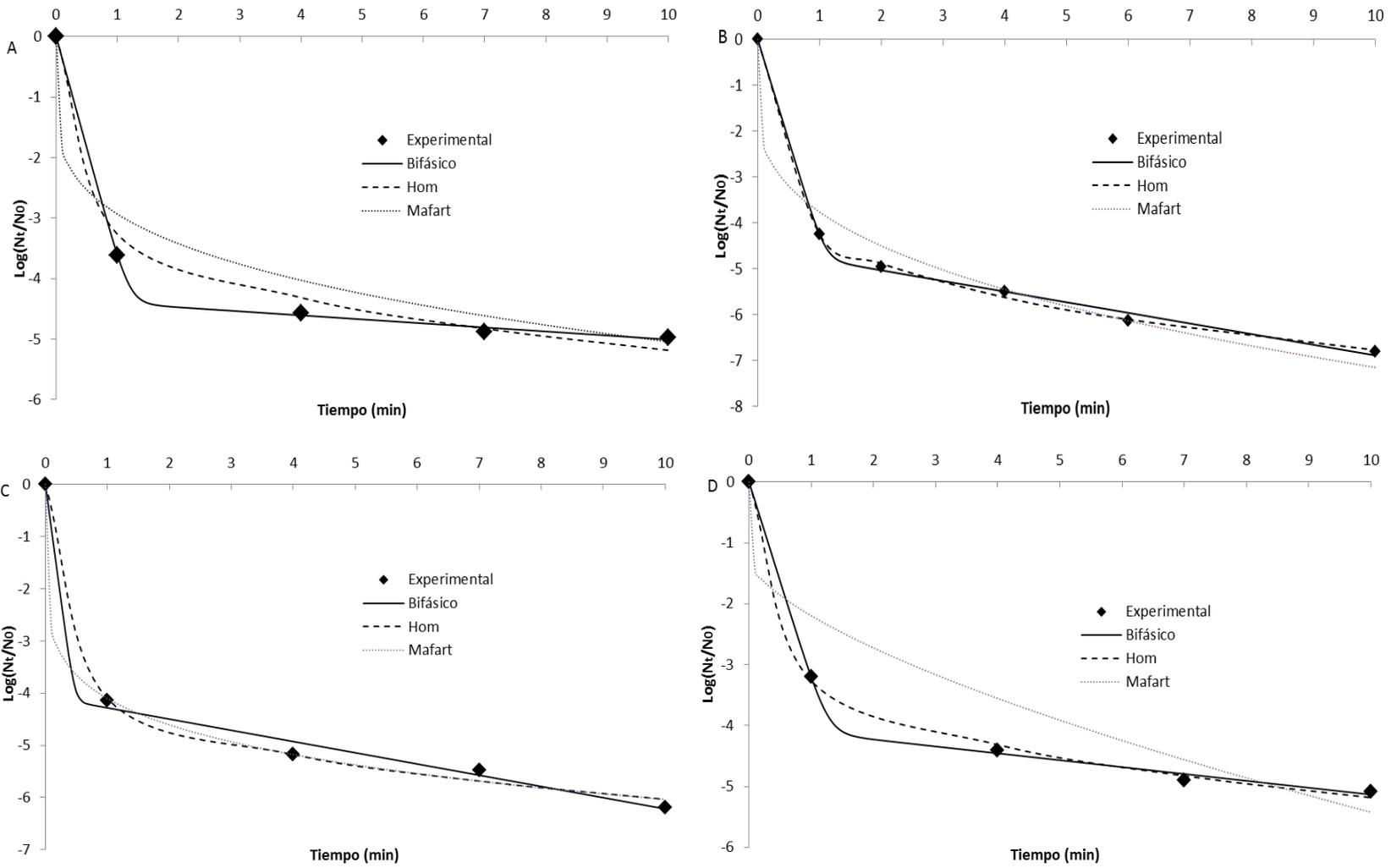


Figura 16. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *E. coli* en los tratamientos de ozonización (A), peroxona (B), O_3/TiO_2 (C) y $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ (D).

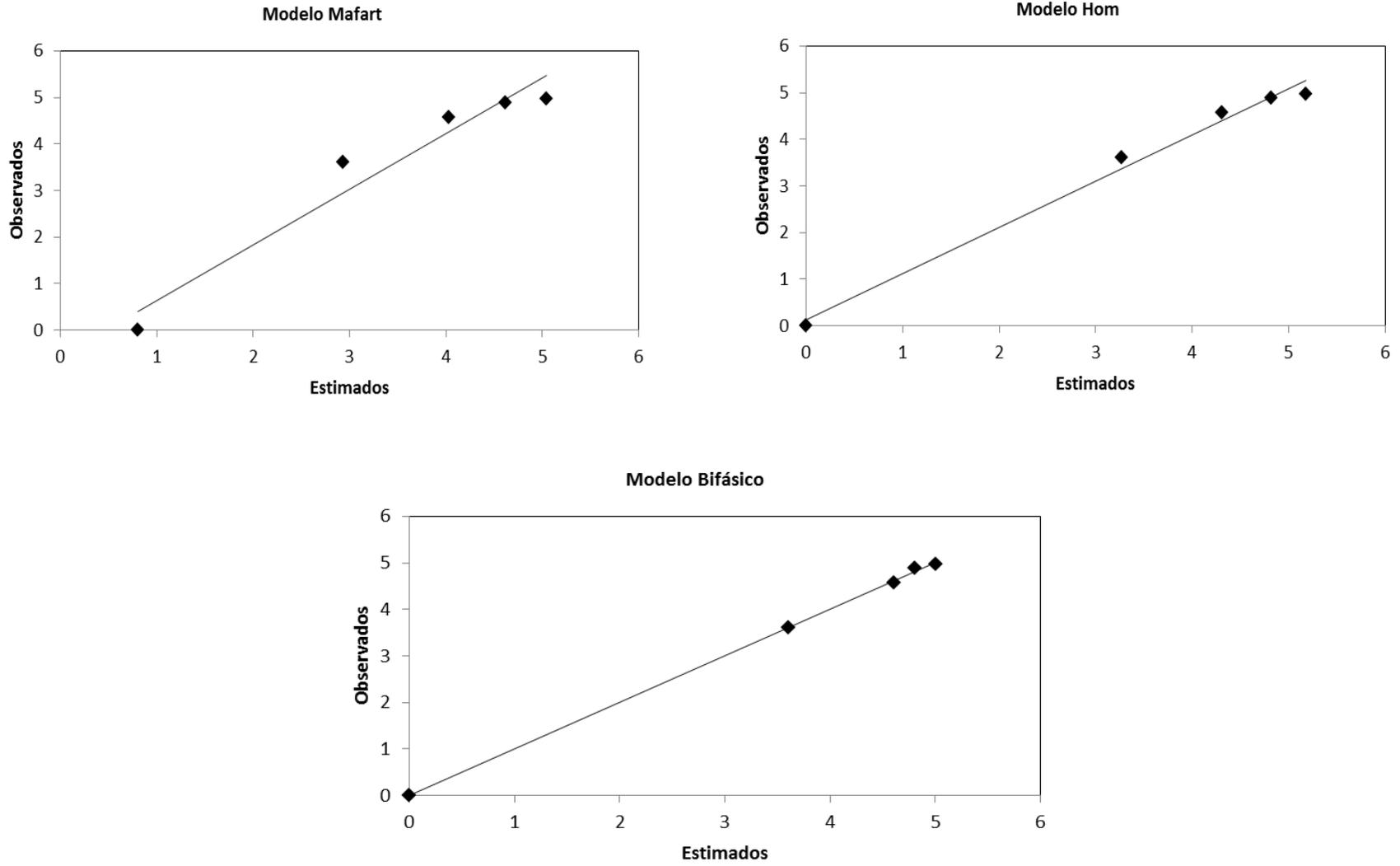


Figura 17. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización.

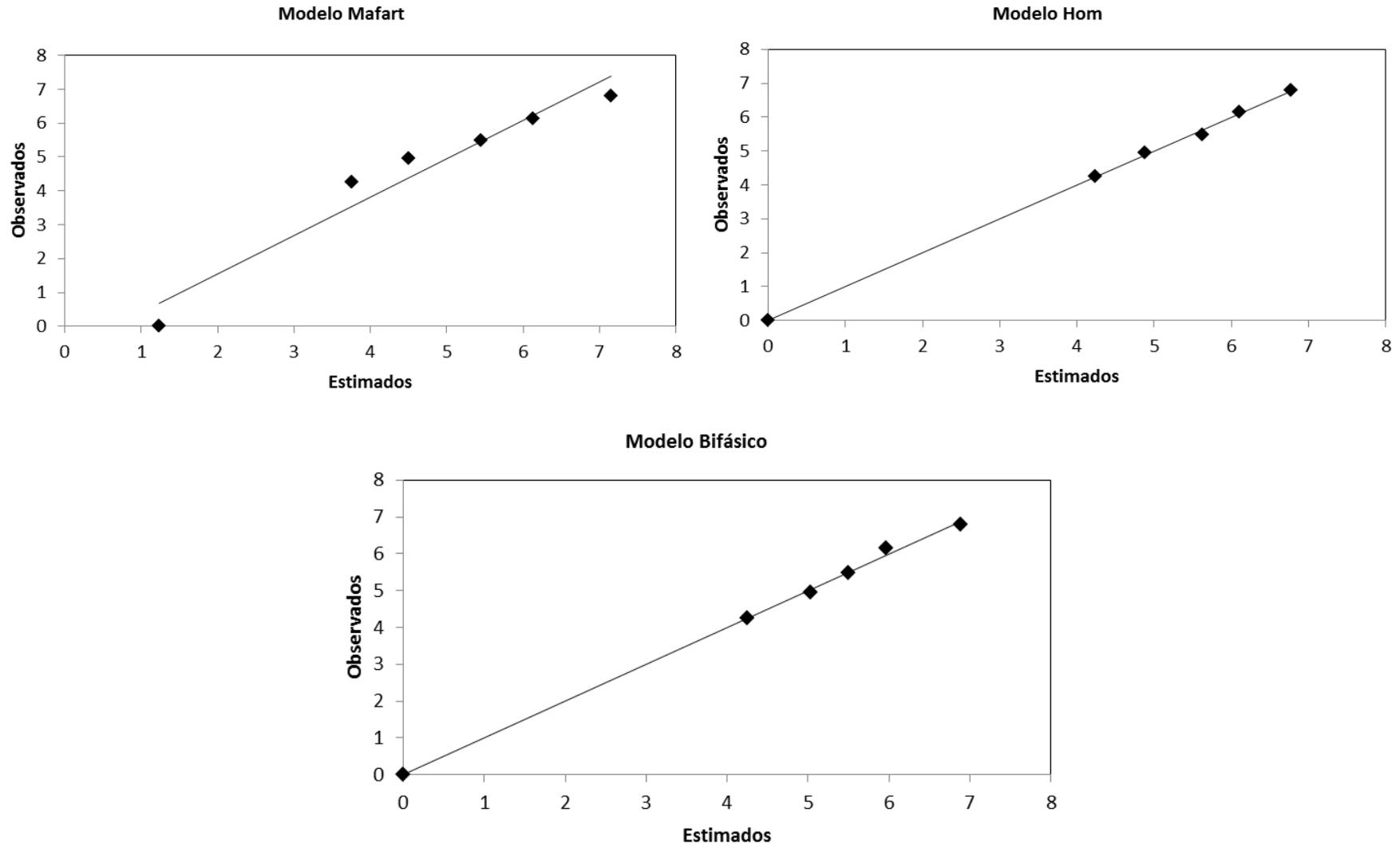


Figura 18. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización combinado con peróxido.

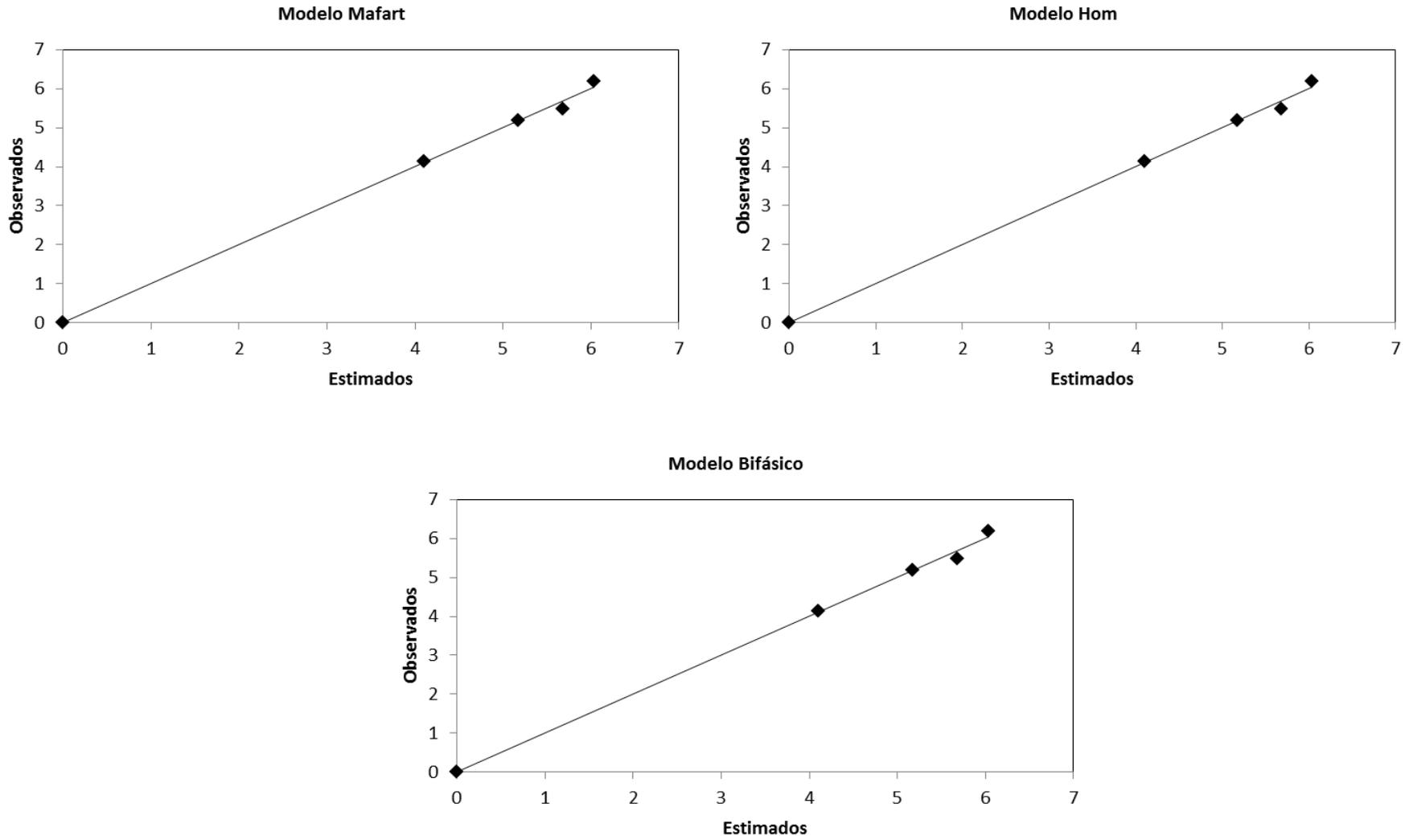


Figura 19. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización combinado con TiO₂.

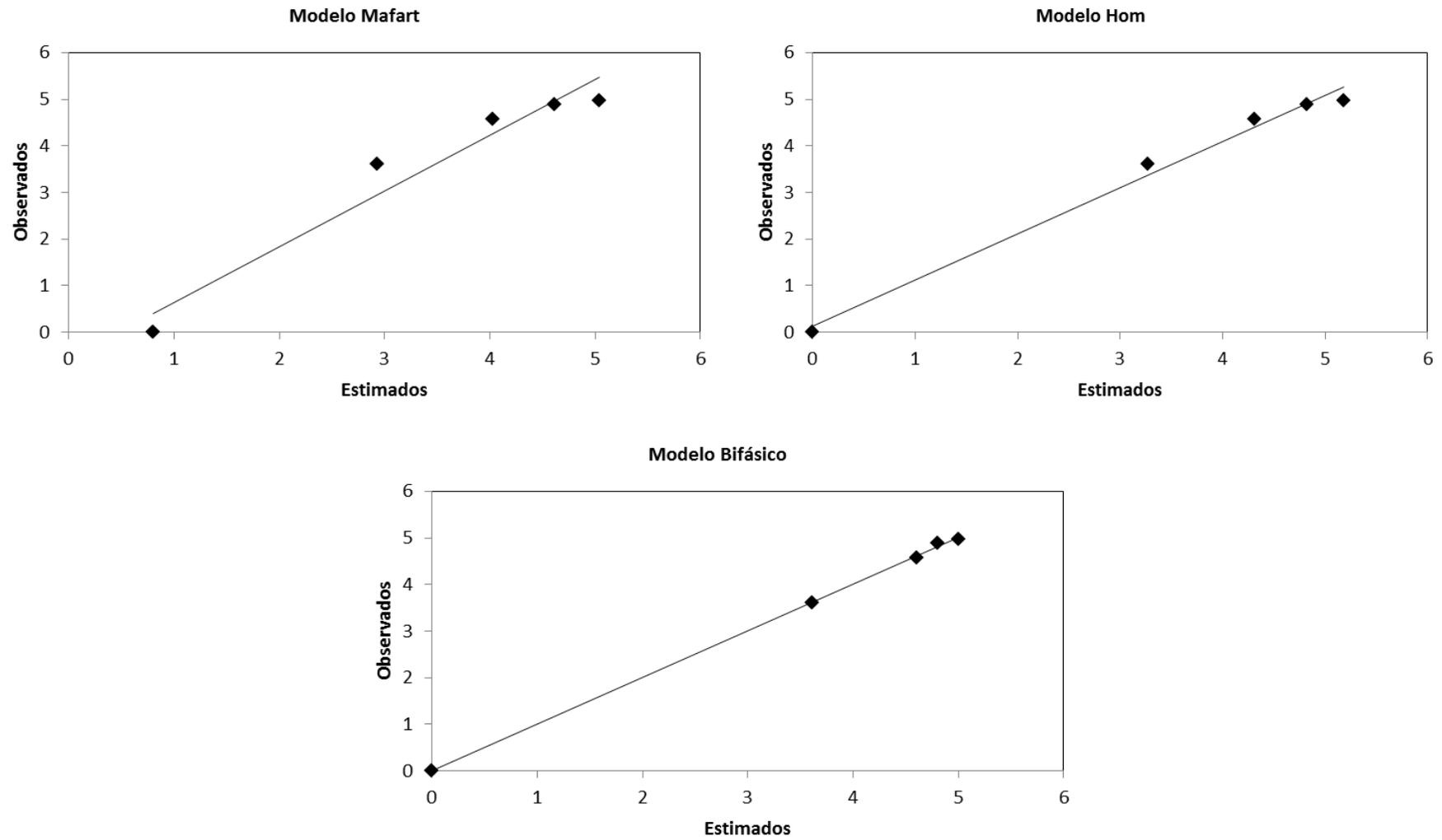


Figura 20. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *E.coli* en el tratamiento de ozonización combinado con TiO_2 y H_2O_2 .

En la Tablas 27, 28, 29 y 30 se comparan los parámetros obtenidos en los modelos cinéticos para *E.coli* con los parámetros obtenidos por Dña. Munia Lanao para *Enterococcus sp.* y *C. perfringens*.

Tabla 28. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *E.coli* con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento de ozonización.

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m		ECM	R²
<i>E.coli</i>	3,268	0,20		0,24	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	3,001	0,26		0,69	0,94
<i>C. perfringens</i>	2,623	0,36		1,13	0,78
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R²
<i>E.coli</i>	0,99997	8,48	0,15	0,044	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,999993	3,862	0,185	0,49	0,98
<i>C. perfringens</i>	0,99997	7,990	0,226	0,77	0,91
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)		ECM	R²
<i>E.coli</i>	0,30	0,08		0,61	0,95
<i>Enterococcus sp.</i>	0,23	0,002		0,74	0,93
<i>C. perfringens</i>	0,36	0,07		1,14	0,78

Tabla 29. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *E.coli* con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para *Enterococcus sp.* y *C. perfringens* en el tratamiento con peroxona.

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1}$)	m		ECM	R²
<i>E.coli</i>	4,24	0,20		0,06	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	4,321	0,21		0,58	0,96
<i>C. perfringens</i>	5,346	0,05		0,08	0,99
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	R²
<i>E.coli</i>	0,999973	10,10	0,53	0,089	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,999998	5,98	0,24	0,94	0,95
<i>C. perfringens</i>	0,999996	12,83	0,17	0,27	0,99
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)		ECM	R²
<i>E.coli</i>	0,37	0,08		0,59	0,94
<i>Enterococcus sp.</i>	0,21	0,001		0,58	0,96
<i>C. perfringens</i>	0,07	$5 \cdot 10^{-11}$		0,10	0,99

Tabla 30. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *E.coli* con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para *Enterococcus sp* y *C. perfringens*. en el tratamiento de O₃/TiO₂.

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m		ECM	R ²
<i>E.coli</i>	4,10	0,17		0,13	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	4,072	0,22		0,58	0,95
<i>C. perfringens</i>	2,77	0,36		0,90	0,86
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	R ²
<i>E.coli</i>	0,999914	20,32	0,50	0,15	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,9999991	6,04	0,19	0,94	0,94
<i>C. perfringens</i>	0,999995	8,78	0,25	1,05	0,96
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)		ECM	R ²
<i>E.coli</i>	0,17	2,22·10 ⁻⁴		0,13	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,22	0,001		0,58	0,95
<i>C. perfringens</i>	0,37	0,06		0,90	0,86

Tabla 31. Comparación de los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *E.coli* con los obtenidos por Dña. Munia Lanao para *Enterococcus sp.* en el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂.

Modelo de Hom					
Microorganismo	k_{ap} (min ⁻¹ · mg L ⁻¹)	m		ECM	R ²
<i>E.coli</i>	3,27	0,20		0,085	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	3,18	0,19		0,26	0,97
Modelo bifásico					
Microorganismo	f	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	R ²
<i>E.coli</i>	0,999901	7,51	0,26	0,07	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,99991	5,93	0,18	0,16	0,99
Modelo de Mafart					
Microorganismo	p	δ (min)		ECM	R ²
<i>E.coli</i>	1,13	0,65		0,95	0,81
<i>Enterococcus sp.</i>	0,19	0,002		0,26	0,97

Si se comparan los valores de las constantes de velocidad de inactivación (k_{ap} en el modelo de Hom y k_1 y k_2 en el modelo bifásico) se observa que se obtienen valores más altos sobre la inactivación de *E.coli* respecto a *Enterococcus sp.* tanto en los tratamientos de ozonización como O_3/TiO_2 y $O_3/H_2O_2/TiO_2$. Aunque que en el tratamiento de O_3/H_2O_2 el valor de k_1 y k_2 sigue la evolución anterior, mayor para *E.coli* que para *Enterococcus sp.*, el valor de k_{ap} es mayor para *Enterococcus sp.* que para *E.coli*.

La comparación de las constantes de velocidad de inactivación, para *C. perfringens* y *E.coli* da resultados similares a los obtenidos anteriormente para la comparación *Enterococcus sp* con *E.coli*, obteniendo valores más altos sobre la inactivación de *E.coli* respecto a *C. perfringens* tanto en los tratamientos de ozonización como O_3/TiO_2 , mientras que para el tratamiento de O_3/H_2O_2 los valores de k_{ap} y k_1 son mayores para *C. perfringens* que para *E.coli*.

El valor del parámetro δ del modelo de Mafart, que indica el tiempo necesario para conseguir 1 unidad logarítmica de inactivación, es inferior en casi todos los tratamientos para la eliminación de *Enterococcus sp.* a excepción del tratamiento O_3/TiO_2 que es inferior para la eliminación de *E.coli*. Si se compara el valor del parámetro δ para *C. perfringens* se obtiene un resultado similar al anterior para *Enterococcus sp.*, es decir, es inferior en casi todos los tratamientos para la eliminación de *C. perfringens*. a excepción del tratamiento O_3/TiO_2 que es inferior para la eliminación de *E.coli*.

Los tratamientos de eliminación más efectivos son O_3/H_2O_2 y O_3/TiO_2 para estos tres microorganismos, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y no el ozono consumido.

Si se comparan los valores del ECM obtenidos en los distintos tratamientos para *E.coli* y *Enterococcus sp.* se observa que existe un mayor acuerdo entre los valores predichos y los valores reales en los modelos para la eliminación de *E.coli* que para *Enterococcus sp.* ya que dichos valores son menores en los tratamientos en los que se elimina *E.coli* que en los que se eliminan *Enterococcus sp.* Sin embargo, los valores del ECM en el modelo Mafart para la eliminación de *E.coli* en los tratamientos de O_3/H_2O_2 y $O_3/H_2O_2/TiO_2$ son mayores a los obtenidos para la eliminación de *Enterococcus sp.* en estos mismos tratamientos.

Al comparar los valores del ECM obtenidos en los tratamientos para *C. perfringens* y *E.coli* da resultados similares a los obtenidos al comparar *E.coli* y *Enterococcus sp.* ya que se obtiene un mayor acuerdo entre los valores predichos y los reales en los distintos modelos para la eliminación de *E.coli* que para *C. perfringens*. Excepto, los valores del ECM en el modelo Mafart para la eliminación de *E.coli* en el tratamientos de O_3/H_2O_2 ya que son mayores a los obtenidos para la eliminación de *C. perfringens*. en este mismo tratamiento.

Respecto a los valores del R^2 se puede afirmar que existe una mayor precisión predictiva de la mayoría de los modelos en los tratamientos estudiados para la eliminación de *E.coli* que para la eliminación de *Enterococcus* sp. salvo excepciones. Dichas excepciones están relacionadas con el modelo Mafart en los tratamientos con O_3/H_2O_2 y $O_3/H_2O_2/TiO_2$ ya que se obtienen valores más altos de R^2 para la eliminación de *Enterococcus* sp.

Finalmente si se comparan los valores de R^2 para *C. perfringens* y *E.coli* se obtienen resultados similares a los obtenidos al comparar *E.coli* y *Enterococcus* sp., a excepción del valor de R^2 del tratamiento de O_3/H_2O_2 en los modelos bifásico y Hom que son iguales para ambos microorganismo, y menor el valor de R^2 para *E.coli* en el modelo Mafart.

Capítulo 6. Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer, como resultado de los distintos tratamientos que se han llevado a cabo a lo largo de este proyecto fin de carrera, son las siguientes.

- Se puede conseguir eliminar de las aguas *E.coli* de manera eficaz usando POAs de manera alternativa a los procesos convencionales.
- Las características físico-químicas de las muestras estudiadas tras los distintos tratamientos varían de la siguiente forma. El pH aumenta ligeramente su valor mientras que la turbidez y los sólidos en suspensión aumentan en mayor medida sus valores respecto a los iniciales. La conductividad aumenta su valor en los tratamientos de ozonización, O_3/H_2O_2 y $O_3/H_2O_2/TiO_2$, mientras que en el tratamiento O_3/TiO_2 disminuye su valor.
- Si se tiene en cuenta que la carga biológica de las aguas del Canal Imperial de Aragón, antes y después de su tratamiento de potabilización puede alcanzar niveles de hasta 10^4 UFC·100 mL⁻¹, se puede afirmar con los resultados que se han obtenido que la inactivación bacteriana en todos los tratamientos es equivalente a una eliminación superior del 99,99%.
- Los tratamientos de ozonización, O_3/H_2O_2 , O_3/TiO_2 y $O_3/H_2O_2/TiO_2$ consiguen inactivar de manera efectiva las poblaciones de *E.coli*.
- La adición al ozono de H_2O_2 y TiO_2 por separado mejora los resultados de inactivación respecto al tratamiento de ozonización. Sin embargo, la combinación de estos tres compuestos en un mismo tratamiento da resultados de inactivación finales, semejantes al proceso de ozonización.
- Se puede afirmar por los resultados de desinfección que se han obtenido que la generación de especies reactivas del oxígeno no se ve potenciada directamente al combinar peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio en un mismo tratamiento con ozono.
- Si se utiliza ozono o combinación de éste con otros elementos como desinfectante del agua, se observa que la presencia de materia orgánica disminuye la acción bactericida del ozono al competir las bacterias presentes en el agua con las especies reactivas generadas.
- Los mejores resultados de inactivación de *E.coli* se obtienen con los tratamientos con peroxona y O_3/TiO_2 . Mientras que se obtiene una inactivación similar en los tratamientos con ozono y $O_3/H_2O_2/TiO_2$, salvo a concentraciones bajas de ozono que se obtiene mejores resultados con la combinación de $O_3/H_2O_2/TiO_2$.

- Se obtiene buenos resultados de desinfección para dosis de ozono bajas en el tratamiento O₃/TiO₂, mientras que los mejores resultados de desinfección final se obtienen en el tratamiento con peroxona.
- La *E.coli* presenta curvas de inactivación que no responden a funciones lineales sino que presentan cola.
- Los resultados obtenidos en el laboratorio se ajustan bien a los modelos matemáticos Hom, Mafart y bifásico.
- A partir de los resultados del R² y del ECM se puede afirmar que la precisión predictiva y la semejanza a los resultados reales de la mayoría de los modelos es buena. Sin embargo, la precisión predictiva del modelo Mafart, excepto para el tratamiento con O₃/TiO₂, no es tan buena en comparación con los otros modelos.
- La sensibilidad y velocidad de inactivación de *E.coli* en comparación con *Enterococcus* sp. y *C. perfringens* para los tratamientos estudiados es mayor.

Capítulo 7. Bibliografía

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ewing WH. The genus *Escherichia coli*. En: Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th. Ed. New York, Elsevier, 1985, p. 93-134.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lanao M., Ormad M.P., Goñi P., Miguel N., Mosteo R., Ovelleiro J.L. 2010. Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂. Solar Energy 84, 703-709.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rodríguez F.J. Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Ed. Díaz de Santos, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

