



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

MÁSTER EN QUÍMICA INDUSTRIAL
GUILLERMO MARTÍNEZ CARNICER

MEMORIA DE TRABAJO FIN DE MÁSTER

**“Inactivación de gérmenes
patógenos mediante procesos
combinados $O_3/S_2O_8^{2-}$, O_3/HSO_5 ,
 O_3/H_2O_2 ”**

DIRECTORES

ROSA MOSTEO ABAD

JORGUE RODRÍGUEZ CHUECA

LUGAR DE REALIZACIÓN

CAMPUS RIO EBRO, UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

SEPTIEMBRE DE 2019

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo:

Rosa Mosteo Abad y Jorge Rodríguez Chueca: su experiencia y empuje han sido fundamentales para la ejecución de mi Trabajo de Fin de Máster, así mismo, su flexibilidad y espíritu de superación y mejora continua han hecho que me pueda desarrollar como investigador.

A los compañeros del laboratorio de Agua y Salud Ambiental que en todo momento se han ofrecido a prestarme la ayuda necesaria para el desarrollo de este trabajo de investigación y que han hecho que los días de trabajo, y en ocasiones, los fallos experimentales, sean más llevaderos.

A mis padres Carmen y Jesús, que siempre han estado ahí en los buenos y en los malos momentos y que tanto apoyo me han dado para conseguir el Máster de Química Industrial, este gran reto de mi vida, y que con sus actos y valores hacen sentirme orgulloso de ser su hijo.

A los compañeros del máster y a los de toda la vida, que con su apoyo han hecho que este año de duro esfuerzo haya resultado mucho más ameno.

SUMMARY

This study has been carried out with the “Water and Environmental Health” research group of the University of Zaragoza, and is within the lines of investigation focused on the development of wastewater disinfection techniques using Advanced oxidation processes, in this specific case, a process of disinfection of two bacteria, *Escherichia coli* and *Enterococcus sp.*, through a novel advanced oxidation process based on the combination of ozone with persulfate salts, in that case, peroxydisulfate of sodium and potassium monopersulfate.

Escherichia coli and *Enterococcus sp.* are considered indicator bacteria of pathogenic microorganisms in wastewater and therefore have been widely used in the development of different disinfection processes.

Thanks to an in-situ ozone generation plant and persulfate salts, a comparison has been made between the effectiveness of disinfection of ozone treatments alone and ozone combined with two persulfate oxidants.

Using a series of substances called “scavengers”, the disinfection pathways of the oxidants used were studied.

Using microbiological techniques, it was possible to know the effect of bacterial deactivation processes as a function of time, and as a function of the concentration of the oxidants used.

Finally, the effect of the combination of the oxidizers investigated in real samples from an industrial wastewater plant was studied.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se ha realizado con el grupo de investigación de “Agua y Salud Ambiental” de la Universidad de Zaragoza, y se encuentra en el marco del progreso de líneas de investigación enfocadas al desarrollo de técnicas de desinfección de aguas residuales empleando procesos avanzados de oxidación. En este caso concreto, se ha llevado a cabo un proceso de desinfección de dos bacterias, *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.*, mediante un novedoso proceso de oxidación avanzada basado en la combinación de ozono con sales de persulfato, en nuestro caso, el peroxidisulfato de sodio y el monopersulfato de potasio.

La *Escherichia coli* y los *Enterococcus sp.* se consideran bacterias indicadoras de microorganismos patógenos en aguas residuales y por ello se han empleado ampliamente en el desarrollo de diferentes procesos de desinfección.

Gracias a una planta de generación de ozono *in-situ* y las sales de persulfato se ha llevado a cabo una comparación entre la eficacia de desinfección de los tratamientos con ozono en solitario y ozono combinado con dos oxidantes de tipo persulfato.

Empleando una serie de sustancias denominadas “*scavengers*” que actúan como captadoras de radicales se estudió la vías de desinfección de los oxidantes empleados.

Empleando técnicas microbiológicas se pudo conocer el efecto de los procesos de desactivación bacteriana en función del tiempo, y en función de la concentración de los oxidantes empleados.

Para finalizar, se estudió el efecto de la combinación de los oxidantes investigados en muestras reales de salida de una estación de depuración de aguas residuales.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
3. Procedimiento experimental	
3.1. Metodología analítica	
3.1.1. Análisis de parámetros microbiológicos	
3.1.1.1. Equipos.....	5
3.1.1.2. Medios.....	6
3.1.1.3. Método de siembra y método de filtración.....	6
3.1.1.4. Incubación.....	6
3.1.1.5. Recuento e inactivación.....	7
3.1.1.6. Estudio de la repetibilidad.....	8
3.1.2. Análisis de parámetros físico-químicos.....	8
3.2. Muestras	
3.2.1. Muestras en suero fisiológico.....	9
3.2.2. Muestras reales de salida de EDAR.....	10
3.3. Experimentos de desinfección	
3.3.1. Agentes oxidantes.....	10
3.3.2. Contribución de los oxidantes en la desinfección.....	12
3.3.3. Procedimiento general de los tratamientos de desinfección.....	12
4. Resultados y discusión	
4.1. Efecto del tipo de bacteria.....	13
4.2. Efecto del agente oxidante.....	15
4.3. Contribución de los oxidantes a la desinfección.....	16
4.4. Efecto de la matriz acuosa.....	19
5. Conclusiones.....	22
6. Referencias.....	23
Anexos	
1. Metodología experimental.....	26
2. Ozonización.....	30
3. Parámetros físico-químicos.....	33

1. Introducción

Cada vez más, los recursos hídricos están sometidos a un estrés debido a su uso excesivo, lo que lleva a la escasez de agua y al deterioro de la calidad de la misma. (FAO, 2018) En este contexto, una reutilización más amplia de las aguas residuales tratadas aparece como una solución alternativa al uso de agua potable o “prepotable” para algunas aplicaciones (OMS, 2014).

Por lo tanto, la reutilización de aguas residuales puede ayudar a reducir la presión sobre los recursos de agua dulce, reduciendo y evitando la contaminación de las aguas superficiales, así como la sobreexplotación de los acuíferos.

La alta carga microbiana de origen fecal que se encuentra en las aguas residuales urbanas, puede reducirse en cierta medida a través de los procesos que se realizan en una planta convencional de aguas residuales, especialmente durante el proceso de tratamiento biológico. Sin embargo, las aguas residuales tratadas todavía contienen concentraciones relativamente altas de bacterias indicadoras, como *E. coli* o los *Enterococcus sp.*, lo que indica la posible presencia de otros microorganismos patógenos (Campos-pinilla et al, 2008)(Mosteo et al, 2013) (Larrea-murrell et al, 2013)(López et al, 2019).

El objetivo principal de este trabajo de investigación es el estudio de varios procesos de oxidación avanzada (AOPs), que podrían ser adecuados como alternativas o complementos a los tratamientos de desinfección convencionales. Este trabajo fin de máster se centra en la eliminación de los indicadores bacterianos de contaminación fecal (*E. coli* y *Enterococcus sp.*) presente en los efluentes de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), con el objetivo de lograr que el agua recuperada sea susceptible de ser reutilizada.

Las aguas residuales urbanas se regulan mediante la Directiva 91/271/CEE, en esta aparecen los valores máximos permitidos de DBO₅, DQO y sólidos en suspensión, pero no hay datos relativos al control bacteriológico, (Levantesi et al, 2010)(Mosteo et al, 2013). Por ello, en 2007, se publicó en España el Real Decreto 1620/2007, que establece el régimen jurídico de reutilización de las aguas depuradas, de acuerdo con el artículo 109.1 del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto

Legislativo 1/2001, de 20 de Julio. También establece el término de aguas regeneradas, que son, aguas depuradas que han sido sometidas a un proceso adicional o complementario de desinfección. Este Real Decreto también establece los límites máximos admisibles que puede haber en las aguas regeneradas respecto de diferentes parámetros como la *Escherichia coli*, entre otros.

A raíz del Real Decreto 1620/2007 empiezan a crearse estaciones de regeneración de aguas en todo el territorio nacional que cuentan con procesos de desinfección de aguas. Estos procesos convencionalmente consistían en métodos de radiación ultravioleta combinada con hipoclorito de sodio o, si se quiere tener un agua de mayor calidad, procesos de ultrafiltración (Plan Nacional de reutilización de aguas, 2010).

Entre los procesos convencionales destaca el uso del cloro y sus derivados los cuales llevan a cabo su acción desinfectante por medio del ácido hipocloroso HClO y el ion hipoclorito ClO⁻ y su efectividad depende de la cantidad de estos componentes que el compuesto clorado forme al estar en solución acuosa. El problema que presenta esta técnica es que si en el agua hay presente materia orgánica se formarán compuestos organoclorados, sustancias que son carcinógenas (Olmedo Sanchez, 2008). Por el otro lado, en la cloración al emplearse el cloro o sus derivados en exceso esto da lugar a que haya un cloro residual que puede continuar desinfectando durante un determinado periodo de tiempo (Del Barrio Vergara, 2017).

Otra técnica convencional de desinfección es la radiación ultravioleta, mediante unas lámparas que emiten intensamente en la línea de emisión de 254 nm resultando letal para cierto tipos de microorganismos, pero no para otros que poseen una estructura celular resistente, inconveniente de este proceso de desinfección, las ventajas que presenta este método de desactivación bacteriana frente al resto, es que no se agregan desinfectantes químicos al agua ni promueve la formación de subproductos mutagénicos ni carcinógenos. (Wright et al, 1998)(Pietrobon Tarrán, 2012).

Ante los diferentes inconvenientes de estos procesos convencionales, en las últimas dos décadas se han investigado nuevas técnicas de desinfección más eficaces y limpias como son los procesos avanzados de oxidación (POAs) aumentando de manera exponencial el número de publicaciones sobre los mismos como se refleja en la Figura

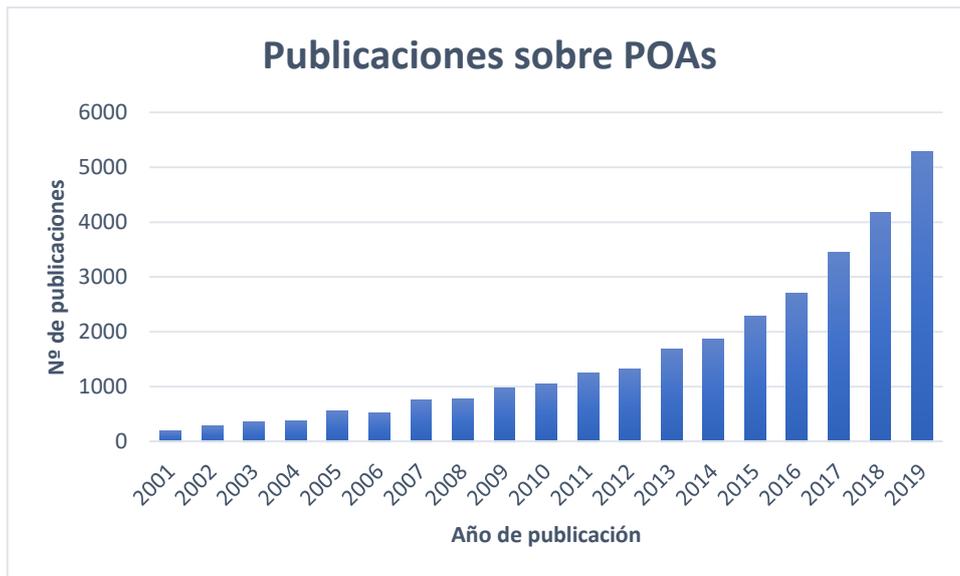


Figura 1. Publicaciones desde el año 2001 (fuente: Expert research en Science Direct; palabras clave: “AOP”, “AOPs” o “advanced oxidation”).

Los POAs se basan en procesos físico-químicos capaces de producir cambios en la estructura de los microorganismos o contaminantes (Domènech et al, 2004). El concepto de POAs lo estableció inicialmente Glaze y sus colaboradores (Glaze et al, 1987), quienes los definieron como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Cruz González, 2015)(Dong et al, 1993).

Algunas de las ventajas que presentan los POAs es que no generan subproductos de reacción, o se forman en bajas concentraciones, generalmente mejoran las propiedades organolépticas del agua tratada, eliminan efectos sobre la salud de desinfectantes y oxidantes residuales como el cloro y otra ventaja que presentan es que son útiles para tratar contaminantes biológicos que resisten otros tratamientos, marco en el que se engloba este trabajo de investigación.

Dentro de los POAs destacan los procesos de ozonización que se han ido aplicando en desinfección de aguas desde años. Habitualmente el oxidante empleado en combinación con el ozono es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Valero Lázaro, 2017), aunque existen otros oxidantes como es el caso de las sales de persulfato. El interés que hay en el uso de este tipo de sales radica en su capacidad de producir radicales sulfato ($\text{SO}_4^{\cdot-}$) (Deniere et al, 2018) que puedan actuar en combinación con los

radicales hidroxilo generados por el ozono mejorando de esta manera el poder de desinfección del tratamiento.

Los procesos de oxidación avanzada basados en radicales sulfato han aumentado en popularidad en los últimos años debido a su alta capacidad y adaptabilidad para la degradación de contaminantes emergentes. Las sales de persulfato pueden ser activadas por diferentes vías como la vía térmica, UV o mediante radicales hidroxilo entre otros, dando lugar a los radicales sulfato que son oxidantes fuertes y capaces de degradar eficazmente diversos contaminantes (Wang et al, 2018).

2. Objetivos

Este trabajo fin de máster tiene por objetivo principal evaluar la eficacia de procesos basado en ozono/persulfatos como alternativa a los métodos de desinfección convencionales de las bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.*

Este objetivo principal engloba a su vez otros objetivos secundarios:

- Llevar a cabo un estudio y calibración de la producción de ozono “*in-situ*” en el laboratorio.
- Poner en marcha técnicas microbiológicas de crecimiento y conteo de colonias bacteriológicas.
- Estudiar la evolución de las colonias bacterianas, *E. coli* y *Enterococcus sp.*, en muestras de agua sintéticas a lo largo del proceso de desinfección objeto de estudio.
- Comparar la eficacia de desinfección de los tratamientos con ozono en solitario y ozono combinado con dos oxidantes de tipo persulfato, peroxidisulfato de sodio (PS) y monopersulfato de potasio (PMS).
- Estudiar las vías de desinfección empleando “scavengers”.
- Evaluar la aplicación del tratamiento de desinfección seleccionado en aguas reales de salida de depuradora.

3. Procedimiento *experimental*

3.1. Metodología analítica

3.1.1. Parámetros microbiológicos

El desarrollo de todos los análisis bacteriológicos tiene una serie de etapas comunes: en primer lugar, la preparación de las muestras, así como la preparación de los medios de cultivo, la esterilización de todo el material que se requiera gracias a un autoclave a (121°C y 1 bar durante 15 minutos), la siembra de las muestras, la incubación de las mismas y finalmente el recuento de las colonias formadas. Para evitar la contaminación de las muestras y evitar la invalidez de los resultados, se trabaja en una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen.

Las técnicas y materiales que se han empleado en el desarrollo de este trabajo se describen en los siguientes apartados:

3.1.1.1. Equipos

La Tabla 1 muestra una relación de todos los equipos que se emplean a lo largo del presente trabajo:

Tabla 1. Relación de equipos empleados

<i>Equipo</i>	<i>Marca</i>	<i>Modelo</i>	<i>Función</i>
Autoclave	J.P. Selecta	437-P	Esterilización del material
Placa calefactora	Fisher	AREX	Calentamiento de medios
Vortex	Velp Scientifica	ZX3	Mezcla de soluciones en los tubos
Mechero Bunsen	-	-	Crear atmósfera inerte
Ozonizador	Fisher	500	Generación de ozono
Micropipeta	Gilson	Pipetman Classic	Medición de volúmenes
Estufa	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Cultivo microbiológico
Contador de colonias	Interscience	Scan 100	Recuento de colonias
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Control de la temperatura de medios
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Análisis microbiológico

3.1.1.2. Medios

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento microbiano son ambientes artificiales diseñados para proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento de un(os) determinado(s) microorganismo(s) (Rojas, 2011). En este trabajo fin de máster se emplean dos medios que quedan reflejados en la Tabla 2. En el Anexo I se explica el proceso de creación de las placas de Petri con los medios indicados.

Tabla 2. Medios empleados.

<i>Bacteria</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Suplemento</i>
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey (<i>Scharlau</i>)	-
<i>Enterococcus sp.</i>	Agar Slanetz & Bartley (<i>Scharlau</i>)	TTC 10 mL/L

3.1.1.3. Método de siembra y método de filtración

Para poder llevar a cabo la incubación bacteriana y el posterior recuento de estas, las bacterias se han de colocar en placas de Petri con medio de cultivo en ellas. El método de siembra empleado sigue el método estándar 9215.C (Eaton et al, 2005) y se va a emplear cuando la población bacteriana es elevada, hasta las 300 UFC/100ml. Por su parte, si el número de colonias esperadas no es muy elevado, de 20 a 200 UFC/100ml se empleará el método de filtración (Rojas, 2011; Valero Lázaro, 2017). Ambos procedimientos de trabajo están desarrollados en el Anexo I.

Puesto que no conocemos de antemano con exactitud la concentración de bacterias en la muestra, y con el objetivo de obtener fracciones representativas de ésta, se realizan diluciones decimales seriadas de la muestra inicial, como se muestra en el Anexo I. Similar en ambos método, realizaremos las disoluciones seriadas de manera que filtraremos o sembraremos las diluciones que nos interesen para cada tiempo.

3.1.1.4. Incubación

Una vez las placas han sido sembradas, se introducen en la estufa a la temperatura adecuada y el tiempo requerido para el crecimiento bacteriano (tabla 3). Las placas se van a colocar en la estufa boca abajo para evitar que el agua que condensa en la tapa de la placa caiga sobre el medio de cultivo.

Tabla 3. Condiciones de incubación.

Bacteria	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación (h)
<i>Enterococcus sp.</i>	36 ± 2	44 ± 4
<i>E. coli</i>	44,0 ± 0,5	21,3 ± 3

3.1.1.5. Recuento e inactivación

Con el método de recuento el objetivo es distinguir entre las células viables y las no viables (Rojas, 2011). En este tipo de conteo de placas, las colonias no siempre van a provenir de una sola célula, sino que, en ocasiones, las colonias son el resultado de una agrupación de células; así mismo, no todas las células bacterianas serán capaces de formar colonias, ya que no van a crecer en los medios de cultivo. Teniendo en cuenta esto, es recomendable hablar en unidades formadoras de colonias (UFC), unidad que, corresponde como mínimo a una bacteria formando una colonia, así como, también a un grupo de estas que han sido las formadoras de la misma. En este trabajo los resultados se expresan como UFC/100mL.

El número de colonias a contar no ha de ser demasiado grande ya que, si lo es, las colonias podrían fusionarse entre sí dando lugar a errores en las estimaciones, así como no puede ser muy pequeño para que el conteo de las mismas sea significativo.

Tras realizar el recuento de las UFC sobre las propias placas, para conocer el número de UFC/100ml empleamos la ecuación [1] en donde Fd , es el factor de dilución que será la inversa de la dilución seleccionada.

$$UFC/100\ ml = UFC/ml\ en\ la\ placa\ analizada \times Fd \times 100\ ml \quad [1]$$

Una vez obtenidos los valores de UFC/100mL los resultados se expresan en unidades logarítmicas mediante la ecuación [2] en la que N_o es la población inicial de bacterias y N_t es la población bacteriana en el tiempo determinado t , ambos conceptos expresados en unidades de UFC/100 mL.

$$Inactivación\ bacteriana = Log (Nt/No) \quad [2]$$

Estas unidades logarítmicas también pueden expresarse como porcentajes de inactivación para tener una mejor comprensión de la inactivación. La tabla 4 muestra las diferentes correlaciones entre los logaritmos y los porcentajes.

Tabla 4. Correlación unidades logarítmicas de inactivación-porcentaje de inactivación

<i>Unidades logarítmicas de inactivación</i>	<i>Porcentaje de inactivación</i>
0,5 log	68 %
1 log	90 %
2 log	99 %
3 log	99,9 %
4 log	99,99%
5 log	99,999 %

3.1.1.6. Estudio de la repetibilidad

Para poder validar nuestros resultados en el conteo de las UFC tras los métodos de siembra y filtración se tiene en cuenta el coeficiente de variación. Este ha sido calculado previamente en estudios anteriores por el grupo de investigación de “Agua y Salud Ambiental” de la Universidad de Zaragoza para ambas bacterias de estudio (Ibarz, 2008; Rodríguez-Chueca, 2013). Los coeficientes de variación quedan recogidos en la tabla 5.

Tabla 5. Coeficientes de variación

Bacteria	Método	CV (%)
<i>Escherichia coli</i>	Siembra en superficie	1,1
<i>Escherichia coli</i>	Filtración de membrana	2,3
<i>Enterococcus sp.</i>	Siembra en superficie	1,6
<i>Enterococcus sp.</i>	Filtración de membrana	6,5

En el Anexo I queda reflejado el desarrollo para el cálculo del coeficiente de variación.

3.1.2. Parámetros físico-químicos

La tabla 6 muestra los parámetros que se midieron, así como los instrumentos y métodos normalizados que se emplearon. En el Anexo III estos parámetros se encuentran desarrollados.

Tabla 6. Parámetros físico-químicos estudiados.

Parámetro	Instrumento	Marca	Modelo	Rango	Error	Método Normalizado
Conductividad	Conductímetro	Thermo Scientific	Orion	0,01-19.999 μ S/cm	$\leq 0,02\mu$ S/cm	UNE-EN ISO 27888:1994
pH	pH-metro	Crison	GLP 21	2,00-16,00	$\leq 0,02$	SM 4500 HB
DQO	Fotómetro multiparamétrico	Hanna	HI 83099	0-1500 mg/L	± 1 mg/L	EPA 410.4
COT	Analizador TOC	Shimadzu	TOC-V _{CSH}	CT: 0-25.000 mg/L	5 - 10 %	SM 5310 B

3.2. Preparación de muestras

3.2.1. Muestras en suero fisiológico

Hay ocasiones en las que las muestras no contienen las bacterias de estudio de manera natural, o si las contienen, su concentración es muy baja como para poder determinar el efecto de la desinfección sobre las mismas.

Para poder aumentar la concentración bacteriana se va a llevar a cabo un proceso denominado "fortificación". A partir de cepas puras de las bacterias, y por la técnica de "agotamiento" en placas de agar nutritivo obteniendo cultivos puros de las bacterias para que más tarde estas se añadan a las muestras, obteniendo así muestras fortificadas. El procedimiento de fortificación se recoge en el Anexo I.

En este trabajo de investigación se trabajará con las bacterias de *Escherichia coli* y de *Enterococcus sp.*, disponibles en el laboratorio del grupo de referencia del Gobierno de Aragón "Agua y Salud Ambiental" de la Universidad de Zaragoza, centrándose mayormente en esta segunda debido a la falta de experimentación con la misma con respecto a la *E. coli*, que internacionalmente es el microorganismo más utilizado en este tipo de estudios. (Cho et al, 2010).

El objetivo es tener en todos los ensayos una concentración inicial de cada bacteria de 10^7 - 10^8 UFC/100mL, pero hay que tener en cuenta que debido a la dificultad que presenta la preparación de la suspensión concentrada, así como la preparación de las placas con las cepas puras, la concentración inicial entre ensayos puede variar ligeramente.

3.2.2. Muestras reales de salida de EDAR

En el presente trabajo, además de emplear muestras sintéticas también se ha analizado una muestra de agua de salida de la depuradora. Sobre la muestra se realiza un proceso de fortificación bacteriana como se hace con las muestras de suero fisiológico, así mismo se realiza un estudio de diferentes parámetros físico-químicos al inicio y al final del proceso de desinfección. La tabla 7 muestra los parámetros analizados antes del tratamiento.

Tabla 7. Parámetros físico-químicos antes del tratamiento.

<i>Parámetros estudiados</i>	
Conductividad	1505 $\mu\text{S}/\text{cm}$
pH	8,6
COT	16,5 mg/L
DQO	10,75 mg/L

3.3. Experimentos de desinfección

3.3.1. Agentes oxidantes

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación, y con el objetivo de llevar a cabo procesos avanzados de oxidación, se combina ozono (O_3) con dos oxidantes de tipo persulfato. El ozono empleado se genera *in-situ* gracias a un ozonizador Fischer modelo 500 localizado en el laboratorio del grupo “Agua y Salud Ambiental” de la Universidad de Zaragoza, los fundamentos y el proceso de producción de ozono queda recogido en el Anexo II. Las condiciones de trabajo se mantienen constantes durante todos los experimentos, estas fueron de 1 bar de presión, un caudal de oxígeno de 50 L/h y una potencia de trabajo de 3 W lo que se traducía en una cantidad de ozono introducida de manera constante de 7320 mgO_3/h . Los experimentos se llevaron a cabo con un volumen de muestra de 1 L y a la temperatura ambiente del laboratorio, 23°C, durante el tiempo establecido para cada uno de ellos.

El proceso por el que se forman los radicales hidroxilo por parte del ozono queda reflejado en las reacciones [3-7] (Kuo et al, 1999) (Rodríguez-Chueca et al, 2015).

Iniciación



Propagación



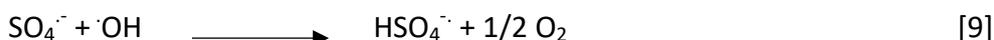
Terminación: Una combinación de $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} y $\cdot\text{OH}$

Los compuestos persulfato empleados en este trabajo de investigación son el Peroxidisulfato de sodio (PS) y el Monopersulfato de potasio (PMS), ambos compuestos son sales precursoras de radicales $\text{SO}_4^{\cdot-}$. El PMS y el PS se degradan lentamente en ambientes acuáticos y es por ello que se emplean *in-situ* en el tratamiento de suelos y aguas (Pelayo Torices et al, 2018). Las características de ambos compuestos persulfato quedan descritas en la tabla 8.

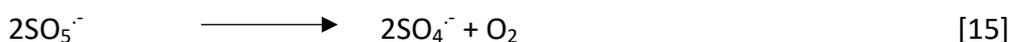
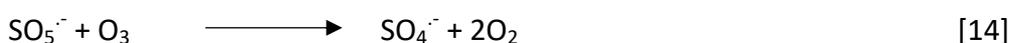
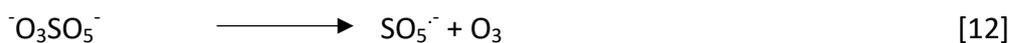
Tabla 8. Sales de persulfato

Reactivo	Marca	CAS-Nº	Peso molecular	Concentración empleada
Peroxidisulfato de sodio (PS)	PanReac	7775-27-1	238,09 g/mol	0.01-0.5 mM
Monopersulfato de potasio (PMS)	Alfa Aesar	70693-62-8	615,50 g/mol	0.01-0.5 mM

El PS dará lugar a la formación de radicales sulfato tras su activación mediante los radicales hidroxilo mediante las siguientes reacciones [8-10] (Yang et al, 2016).



Por su parte, las reacciones por las que el PMS genera radicales sulfato son las siguientes [11-17] (Deniere et al, 2018):



3.3.2. Contribución de los oxidantes en la desinfección

Para comprobar la contribución de los principales oxidantes que participan en el proceso de desactivación bacteriana durante las experimentaciones de O₃/PS y O₃/PMS se añadió terbutanol e isopropanol como atrapadores de radicales (scavengers). El terbutanol es capaz de atrapar los radicales hidroxilo (producidos por el ozono) pero no los radicales sulfato ($k_{\text{OH}\cdot} = 5,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{SO}_4^{\cdot-}} = 8,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y el isopropanol atrapa ambos radicales ($k_{\text{OH}\cdot} = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{SO}_4^{\cdot-}} = 8,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Ahmad et al, 2012). Ambos atrapadores se añadieron al reactor de reacción en exceso con respecto a los radicales, aproximadamente en unas proporciones 1:10 (mol/mol).

3.3.3. Procedimiento general de los procesos de desinfección

Como se describe en el apartado 3.2 se emplean dos tipos de muestra: suero fisiológico y agua de salida de una depuradora. Ambas matrices se fortifican con ambas bacterias con el objetivo de tener una concentración bacteriana inicial de 10^7 - 10^8 UFC/100mL.

Las experimentaciones se llevan a cabo haciendo uso de la planta piloto de generación de ozono y que se encuentra descrita en profundidad en el Anexo II. Los ensayos se realizan con 1 L de muestra que se coloca en un reactor de vidrio de 2 L de capacidad y a temperatura ambiente (23°C). A este reactor se le introducen los oxidantes persulfato necesarios en función de la experimentación y la corriente de ozono. Las condiciones de trabajo con respecto al ozono son similares para todos los ensayos (7320 mgO₃/h). Una vez se observa borboteo de ozono en el reactor comienza la

reacción y a partir de ese momento se toman muestras y se determina el ozono consumido para determinados tiempos, analizando tanto el consumo de ozono como la concentración microbiana en las muestras tomadas.

Por su parte, el ozono en exceso recogido en los borboteadores de yoduro de potasio, como se explica en el Anexo II es valorado con tiosulfato sódico.

La Tabla 9 recoge todos los experimentos que se han llevado a cabo en este trabajo fin de máster, cada uno de ellos por duplicado, indicando la bacteria de estudio, el oxidante empleado, si se ha usado un atrapador de radicales (“scavenger”), los tiempos de muestreo y la matriz empleada.

Tabla 9. Tabla de experimentos.

Experimento	Matriz	Bacteria	Oxidante	Scavenger	Tiempos de muestreo (min)
1	Suero fisiológico	<i>Escherichia coli + Enterococcus sp.</i>	O ₃	No	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
2	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PS (0,5mM)	No	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
3	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PS (0,01mM)	No	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
4	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PMS (0,5mM)	No	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
5	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PMS (0,01mM)	No	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
6	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PS (0,5mM)	Isopropanol	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
7	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PS (0,5mM)	Terbutanol	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
8	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PMS (0,5mM)	Isopropanol	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
9	Suero fisiológico	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PMS (0,5mM)	Terbutanol	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
10	Muestra EDAR	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PMS (0,5mM)	No	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20
11	Muestra EDAR	<i>Enterococcus sp.</i>	O ₃ + PS (0,5mM)	No	0 / 0,5 / 2 / 5 / 10 / 20

Así mismo en la Tabla 10 se reflejan los tiempos de muestreo de los experimentos y el método que se empleó para llevar a cabo la incubación y posterior conteo de las UFC.

Tabla 10. Tiempos de muestreo y método empleado.

Tiempo de toma de muestra (min)	0	0,5	2	5	10	20
Método empleado	M. de siembra	M. de filtración				

4. Resultados y discusión

4.1 Efecto del tipo de bacteria

La Tabla 11 recoge los resultados obtenidos del conteo de UFC para los diferentes tiempos de muestreo en un tratamiento con ozono en solitario a una muestra de suero fisiológico que contenía ambas bacterias de estudio, la *E. coli* y los *Enterococcus sp.*, además también se muestra el consumo de ozono en dichos tiempos.

Tabla 11. Resultados de la ozonización en una muestra con ambas bacterias.

Tiempo (min)	UFC contadas		mg O ₃ consumido
	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	
0	6	50	0
0,5	-	9	42,69
2	-	8	120,61
5	-	5	208,93
10	-	2	398,63
20	-	1	568,03

En el tratamiento de ozonización se ve como la desinfección de la bacteria *Escherichia coli* es completa para las condiciones de trabajo establecidas. Esto es debido a que los *Enterococcus sp.* son bacterias Gram positivas y con ello más resistentes a la desactivación que la *E. coli* que son Gram negativas. Esta diferencia en la resistencia a la desactivación es probable que se deba a que la estructura de estas bacterias, en concreto la pared celular de los *Enterococcus sp.*, que está formada por una capa más gruesa de peptidoglicanos que la de la *E. coli*, lo que aumentaría su resistencia. Por el contrario, los mecanismos celulares de reparación parecen ser similares en ambas bacterias (Valero et al, 2017). Es por ello que si los *Enterococcus sp.* son desactivados, la *E. coli* también lo será. Estos resultados concuerdan con otros estudios de desinfección realizados con ambas bacteria en otras condiciones de trabajo (Valero Lázaro, 2017). La Figura 2 muestra la desactivación de las colonias bacterianas de *Enterococcus sp.*.

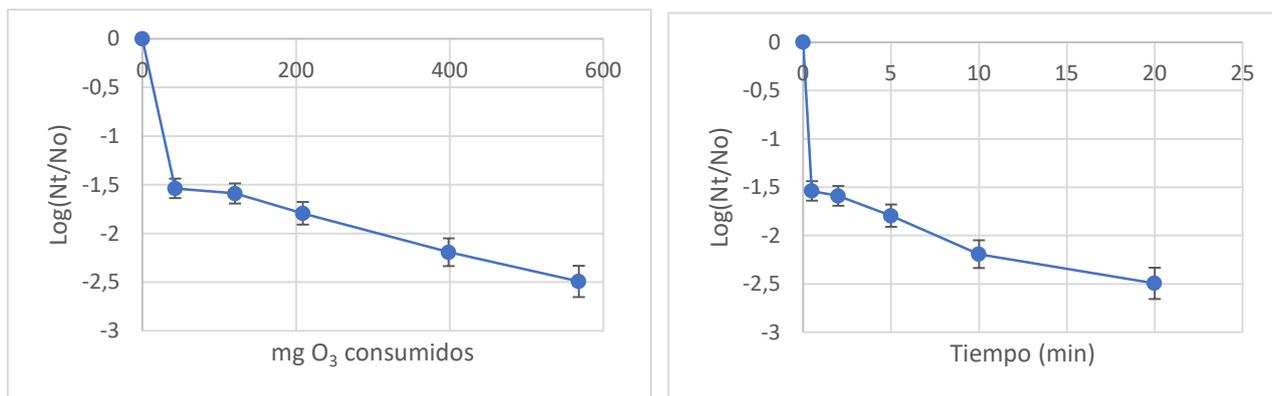


Figura 2. Desactivación de las colonias bacterianas de *Enterococcus sp.*

Paralelamente se estudió cual era el efecto de los oxidantes, PMS y PS por sí solos en las muestras de agua sin emplear ozono. Los tratamientos se llevaron a cabo durante 20 minutos con una concentración inicial similar a la empleada en los ensayos anteriores, es decir, de 10^7 - 10^8 UFC/100 mL. Puesto que no se disponía de una introducción de ozono en el tratamiento, no se llevó a cabo la activación de los oxidantes, y por ello la desactivación bacteriana fue prácticamente nula. Los resultados de los ensayos quedan recogidos en la Tabla 12.

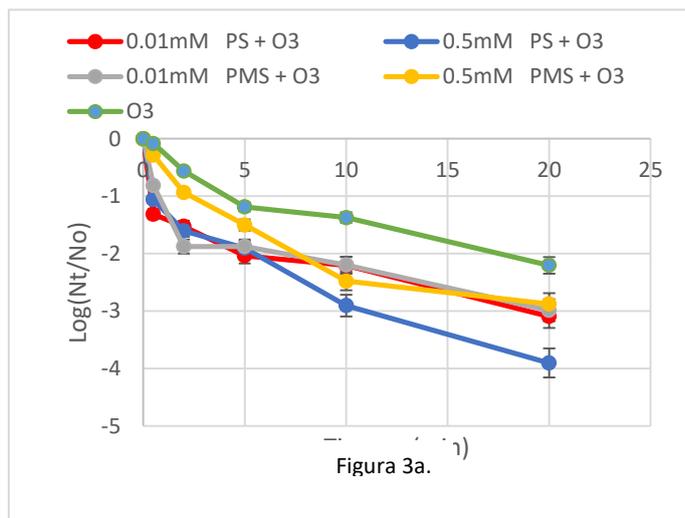
Tabla 12. Desinfección de las sales de persulfatos sin activarse.

<i>Enterococcus sp.</i>		
Oxidante	<i>Peroxidisulfato de sodio</i>	<i>Monopersulfato de potasio</i>
Log (Nt/No) a los 20 min	-0,05	-0,19

En definitiva, los oxidantes no tienen un poder desactivante sin ser activados previamente.

4.2 Efecto del agente oxidante

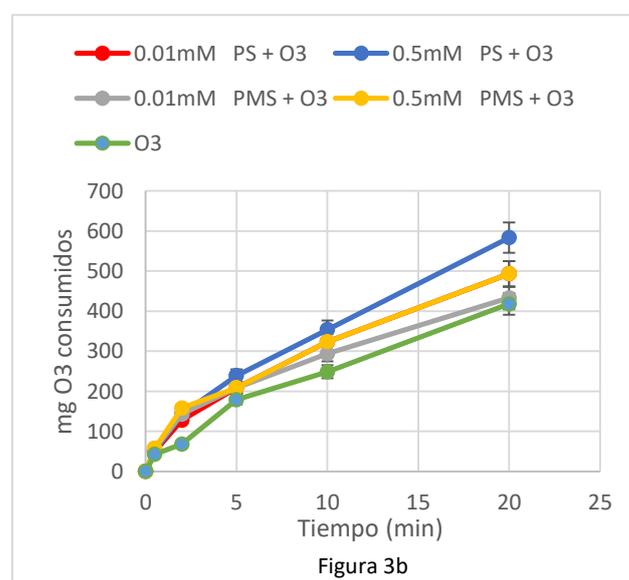
Tras comprobar el efecto que se produce al realizar el tratamiento sobre los dos tipos de bacteria problema (*E.coli* y *Enterococcus sp.*), el objetivo fue comparar la actividad desactivante del ozono trabajando en solitario o combinado con los oxidantes mencionados en el apartado 3.3.1, el PMS y el PS.



La figura 3a representa la comparativa de la desactivación de los *Enterococcus sp.*, para los experimentos sin y con oxidantes añadidos en función del tiempo. También se muestra una comparativa del ozono consumido para cada caso, reflejada en la figura 3b.

En una primera aproximación se comprueba como el uso de oxidantes de manera combinada tiene unos efectos desactivantes superiores al uso de ozono en solitario. Estos resultados concuerdan con los datos teóricos de los potenciales de oxidación de los radicales que participan ya que el conjunto de los radicales $\cdot\text{OH}$ y los radicales $\text{SO}_4^{\cdot-}$ tienen un poder oxidante superior y esto es debido a que los radicales sulfato en comparación con los hidroxilo tienen un potencial redox mayor, 2.5-3.1 V frente a 2.8 V así como una mayor selectividad y tiempo de vida media. (Wang et al, 2018).

Como se puede observar, el PS induce una desactivación de la bacteria *Enterococcus sp.*, mayor que la inducida por el PMS, llegando a obtener reducción de casi 4 unidades logarítmicas en el caso de mayor concentración, 0.5mM de PS, lo que se traduce en una reducción de colonias bacterianas de hasta un 99,99%, requiriendo para ello un tratamiento de 20 minutos.



El diferente comportamiento de ambos oxidantes es fácilmente comprensible teniendo en cuenta las ecuaciones [8-17] de formación de los radicales a partir de cada una de las especies (Sun et al, 2016), en las que se ve como la activación del PS da lugar a dos radicales sulfato, frente al radical sulfato e hidroxilo que se forma por

activación del PMS. Teniendo en cuenta que la pared celular de las bacterias gram positivas como el *Enterococcus sp.*, es resistente y los radicales sulfato son más potentes que los hidroxilo a la hora de llevar a cabo la desactivación, los aspectos teóricos concuerdan con los experimentales obtenidos (Valero et al, 2017).

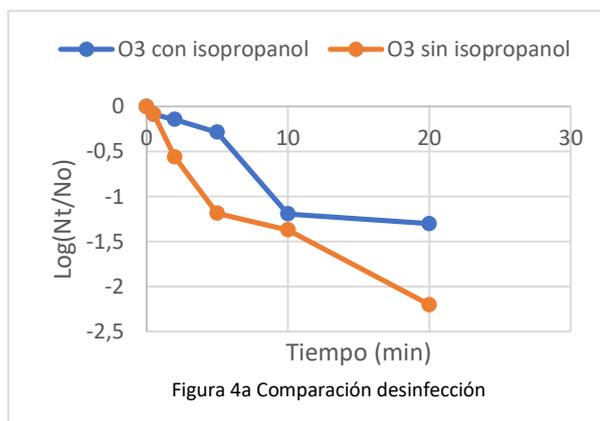
4.3 Contribución de los oxidantes a la desinfección

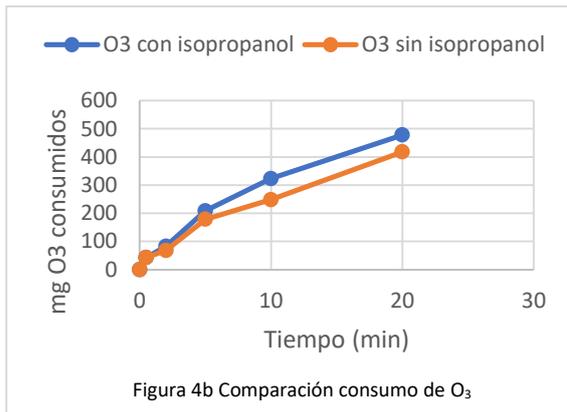
Cuando se trabaja con muestras de agua, es común que haya una serie de especies que inactiven a los radicales formados, consumiéndolos y evitando de esta manera que actúen sobre las bacterias objetivo o cortando las reacciones en cadena de formación de más radicales. Con el objetivo de conocer las vías de desinfección de los compuestos oxidantes, se llevaron a cabo una serie de experimentos con unas sustancias denominadas “scavengers”. En primer lugar, se estudia el efecto del isopropanol como “scavenger” de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y radicales sulfato ($\text{SO}_4^{\cdot-}$).

En el ensayo en el que combinaban el ozono con el isopropanol, se ven que los resultados de desactivación fueron menores que si no se emplease el scavenger (figura 4a). Esto se debe a que la eliminación de las colonias bacterianas se debe exclusivamente al ozono, que tiene un potencial de oxidación menor al del radical hidroxilo, 2,07 V frente a 2,80V, y no al ozono junto con los radicales hidroxilo. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos por Deniere et al, (2018), en donde también empleaban scavengers en POAs

basados en sales de persulfato. Otro punto de estudio fue el consumo de ozono entre los ensayos con y sin el scavenger. Atendiendo a las ecuaciones de la Tabla 8 por las que se forman los radicales hidroxilo a partir del ozono, y teniendo en cuenta que la desactivación bacteriana se debe exclusivamente al ozono, el consumo

del mismo será superior; de hasta 60 mg de O_3 en el mismo tiempo de tratamiento. La figura 4b muestra esta variación del consumo de ozono entre los diferentes experimentos.





Para los casos de uso de isopropanol con los oxidantes a estudiar, sólo se vieron resultados con el PS. En el ensayo con PMS, como su actividad desactivante se debe a la generación de radicales hidroxilo y sulfato, y el isopropanol afecta a ambos, no se da la desactivación bacteriana. Por su parte,

en el ensayo con PS, la eliminación de las colonias sí que se produjo, pero en una magnitud menor a que si no se usasen scavengers llegando hasta las 3,69 unidades logarítmicas, lo que se traduce en una desactivación superior al 99.9% de las UFC. Así mismo, como ocurrió con el caso del tratamiento con ozono e isopropanol, el consumo de ozono fue de 135 mg superior, debido a que el ozono se empleaba tanto en la desactivación de las bacterias como en la formación de radicales hidroxilo y en la activación del oxidante PS. En la siguiente figura 5 se muestra la comparativa entre los ensayos con y sin scavengers para los tratamientos con PS.

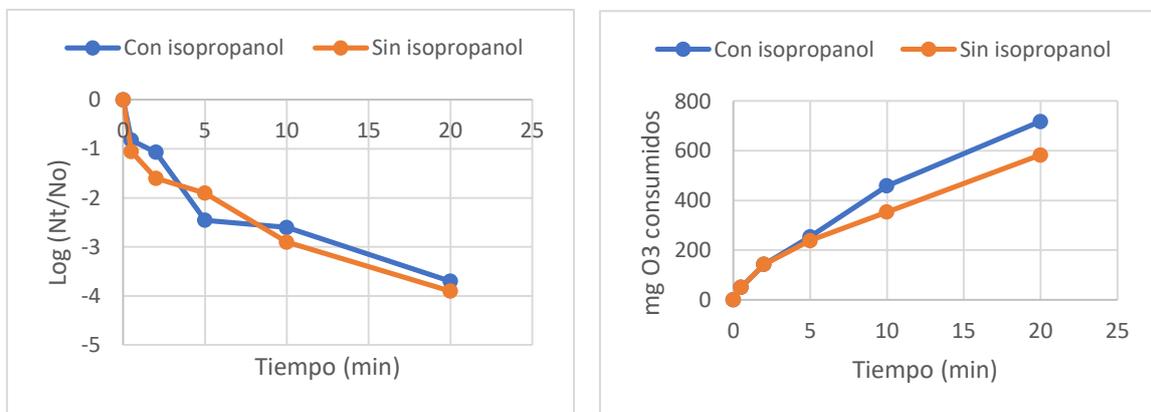


Figura 5. Comparación de la desinfección y consumo de O₃ de O₃/PS con y sin isopropanol

El siguiente scavenger que se empleó fue el terbutanol, este es capaz de inhibir los radicales hidroxilo, que se forman en los diferentes ensayos (Deniere et al, 2018). Para comprobar su efecto, este se añade en exceso en el reactor de reacción.

En primer lugar, se estudia si el terbutanol por sí mismo sin añadir ningún oxidante tiene algún efecto desactivante en las colonias bacterianas. Tras 30 minutos, se toma una muestra para conocer por el método de siembra las UFC/100ml, obteniendo una inactivación de 0,75 unidades logarítmicas, hecho que no es relevante en términos de desactivación bacteriana.

Los siguientes ensayos se llevan a cabo con las combinaciones de ozono con PS y ozono con PMS en las condiciones óptimas de cada oxidante, es decir, 0.5mM de cada uno de ellos. Tras realizar los tratamientos con los dos oxidantes, se comprueba que para el caso del PMS sí que se produjo un efecto contraindicado para la desactivación ya que no se llevó a cabo la inactivación bacteriana y en los diferentes tiempos en los que se tomaba muestra para analizar la desactivación fue nula en todos ellos, hecho que concuerda con estudios anteriores realizados con PMS empleando terbutanol como scavenger (Deniere et al, 2018). Por su parte, para el caso del PS, la desactivación fue notable, pero menor que si se trabajase sin el scavenger.

La razón de este hecho se debe a que en el caso del PMS, el terbutanol es capaz de atrapar los radicales hidroxilo y los radicales sulfato formados no son capaces de llevar a cabo la desactivación bacteriana, por el otro lado, para el caso del PS, en un primer momento, como la formación de radicales sulfato es mayor, estos en combinación con el ozono son los que sí que dan lugar a la desactivación.

Los resultados obtenidos con este segundo oxidante se recogen en la figura 6, en donde se ve que la diferencia entre ambas desactivaciones es de -0.65 unidades logarítmicas.

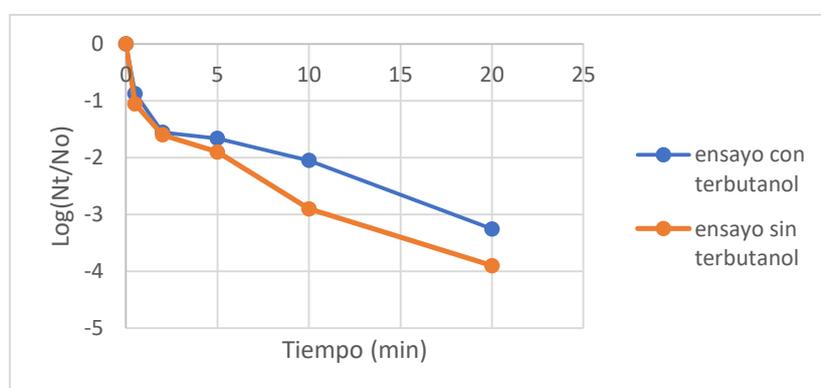


Figura 6. Comparación de la desinfección de O₃/PS con y sin terbutanol

4.4 Efecto de la matriz acuosa

La figura 7a muestra los resultados de la desinfección de una muestra de aguas de salida de depuradora fortificadas con *Enterococcus sp.* mediante los tratamientos combinados de O₃/PS y O₃/PMS. Por su parte, la figura 7b muestra la comparación del ozono consumido en ambos tratamientos.

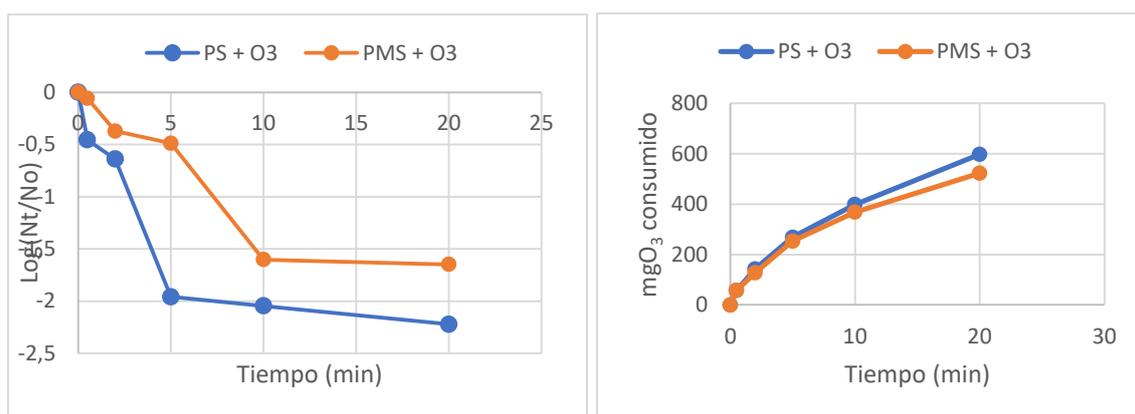


Figura 7a. Comparación de las desinfecciones

Figura 7b. Comparación en los consumos de O₃

Observando la figura 7a de desactivación bacteriana se ve como la curva comienza con un pequeño hombro para ambos casos, PMS/O₃ y PS/O₃. Este retraso en la inactivación puede deberse a distintos motivos como una mala difusión de los oxidantes en la muestra, una resistencia bacteriana inicial o puede deberse a la presencia de materia orgánica oxidable en la muestra (Huber et al., 2005)(Geeraerd et al, 2000) (Lanao Maldonado, 2012). Lo más probable es que en este periodo inicial el ozono fuese consumido por la materia orgánica presente, esto además se apoya en el estudio del TOC, el cual ha disminuido desde los 10,75 mg/L a 6,84 mg/L en el caso del tratamiento con PMS/O₃ y a 6,59 mg/L para el tratamiento con PS/O₃.

La siguiente fase de las gráficas es una parte lineal en la que se llega a valores de desinfección de -1,6 unidades logarítmicas en el caso de la combinación de PMS/O₃ y de -2 unidades para el conjunto de PS/O₃. Esta desactivación es menor que en el caso de los ensayos con muestras de suero fisiológico, pero es comprensible teniendo en cuenta la cantidad de materia orgánica presente en la muestra de salida de

depuradora. Finalmente, hay una parte de cola en ambas gráficas en las que la velocidad de desinfección se redujo considerablemente, esto puede ser debido a que las bacterias que quedan restantes presentan membranas celulares más resistentes al ozono (Lee et al, 2016) o a que la materia coloidal que se encuentre en la muestra puede actuar como escudo protector frente al ataque del ozono (Huber et al., 2005)(Zimmermann et al., 2011).

Con respecto al consumo de ozono, fijándonos en la figura 7b y comparando los valores con los ensayos realizados sobre muestras de suero fisiológico, se ve como el consumo de ozono es mayor, esto es debido a que en la muestra hay materia orgánica oxidable que hace que se nos consuma dicho ozono impidiendo que este actúe sobre nuestra bacteria de interés, el *Enterococcus sp.*

La Tabla 13 muestra los resultados del estudio de los parámetros físico-químicos antes y después del tratamiento.

Tabla 13. Parámetros físico-químicos antes y después del tratamiento.

Parámetro	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	
		PMS/O ₃	PS/O ₃
Conductividad (μS/cm)	1505	3079	2995
pH	8,6	7,79	7,95
DQO (mg/L)	16,5	3	3,5
COT (mg/L)	10,75	6,84	6,59

Se comprueba que se dan modificaciones en los parámetros físico-químicos estudiados. Por un lado, la oxidación de la materia orgánica presente en las muestras por parte de los oxidantes da como resultado una disminución notable tanto de la DQO como del COT. Por el otro lado, la conductividad se ve duplicada debida al aumento de iones sulfato en el medio. El pH por su parte prácticamente no se ve afectado por el tratamiento de desinfección.

5. Conclusiones

- La ozonización a escala de laboratorio tiene un poder desinfectante bacteriano en muestras de suero fisiológico fortificado de hasta 2,5 unidades logarítmicas en un tratamiento de 20 minutos.
- Para la bacteria *E.coli* se consigue una desinfección completa, no para los *Enterococcus sp.*
- Los resultados de desinfección se mejoran notablemente con la adición de oxidantes persulfato que actúen en combinación con el ozono, pasando de una desactivación bacteriana de 2,5 unidades logarítmicas del tratamiento con ozono en solitario a las 2,8 unidades para el caso de PMS en concentración de 0.5mM y a las 3,9 unidades para el caso de PS en concentración de 0.5mM.
- En comparación entre los dos oxidantes persulfato, con el PS se obtienen mejores resultados.
- La comparación entre ensayos a diferentes concentraciones de oxidantes persulfato indican que a mayor concentración de estos mejor será la desinfección.
- El uso de sustancias atraparoras de radicales (scavengers) demuestra como en el tratamiento combinado de PS y ozono el PS es la especie dominante en la desinfección. Por su parte, en el tratamiento de PMS con ozono, los scavengers son capaces de captar los radicales generados por ambas especies evitando de esta manera que se produzca la desactivación bacteriana.
- La desinfección de muestras de salida de EDAR es menor en comparación con las muestras de suero fisiológico debido a la materia orgánica presente.
- El tratamiento de desinfección tiene efectos directos en la materia orgánica presente en la muestra reflejando estos hechos en el estudio de la DQO y COT.
- El pH de las muestras tratadas no se ve prácticamente modificado por el tratamiento de desinfección, al contrario que la conductividad que en las condiciones de trabajo utilizadas se ve duplicada.

6. Referencias

- AENOR. (1994). *UNE-EN ISO 27888:1994*.
- Agricultura, O. de las N. U. para alimentacion y. (2018). *Progresos en el nivel de estrés hídrico*.
- Ahmad, M., Teel, A. L., Furman, O. S., Reed, J. I., & Watts, R. J. (2012). Oxidative and reductive pathways in iron-ethylenediaminetetraacetic acid-activated persulfate systems. *Journal of Environmental Engineering*, 138(4), 411–418. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000496](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000496)
- C., I. (2008). *Desactivación de enterococos en agua natural mediante fotocatalisis con dióxido de titanio y radiación solar*. Universidad de Zaragoza.
- Campos-pinilla, C., Cárdenas-guzmán, M., & Guerrero-cañizares, A. (2008). Performance of Faecal Contamination Indicators in Different Type of Waters From the Sabana of Bogotá (Colombia). *Universitas Stuttgart*, 103–108.
- Cho, M; Kim, J; Kim, J.K;Yoon, J; Kim, J. H. (2010). Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants. *Water Research*, 44, 3410–3418.
- Cruz González, N. de la. (2015). Estudio de la eliminación de contaminantes emergentes en aguas mediante Procesos de Oxidación Avanzados. *Repositorio Institucional: Diposit.Ub.Edu/Dspace*. Retrieved from <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/66864>
- Deniere, E; Van Hulle, S; Van Langenhove, H; Demeestere, K. (2018). Advanced oxidation of pharmaceuticals by the ozone-activated peroxymonosulfate process: the role of different oxidative species. *Journal of Hazardous Materials*, 360, 204–213.
- Domènech, X., Jardim, W. F., & Litter, M. I. (2004). Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. *Eliminación de Contaminantes Por Fotocatalisis Heterogénea*, (August 2016), 3–26.
- Dong, C. P. H. C., & Tang, Z. (1993). ADVANCED CHEMICAL OXIDATION: ITS PRESENT ROLE AND POTENTIAL FUTURE IN HAZARDOUS. Waste Treatment. *Waste Management*, 13, 361–377.
- Eaton A. D., Clesceri L. S., Rice E. W., G. A. E. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, Washington, United States, American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation*.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185–209. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00362-7)
- Glaze, W. H., Kang, J. W., & Chapin, D. H. (1987). The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone: Science & Engineering*, 9(4), 335–352. <https://doi.org/10.1080/01919518708552148>
- Huber, M. M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C. S., ... Von Gunten, U. (2005). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environmental Science and Technology*, 39(11), 4290–4299. <https://doi.org/10.1021/es048396s>
- J., R.-C. (2013). *Aplicación de Procesos Fenton y Pseudo-Fenton en la Regeneración de Aguas Residuales Urbanas*. Universidad de Zaragoza.

- Kuo CH., Zhong L., Zappi ME., H. A. (1999). Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *Can J Chem*, 77, 473–482. <https://doi.org/10.1002/jps.20253>
- Lanao Maldonado, M. (2012). *Investigación de la inactivación de Clostridium perfringens y Enterococcus sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación*. Universidad de Zaragoza.
- Lee, Y., Imminger, S., Czekalski, N., von Gunten, U., & Hammes, F. (2016). Inactivation efficiency of Escherichia coli and autochthonous bacteria during ozonation of municipal wastewater effluents quantified with flow cytometry and adenosine tri-phosphate analyses. *Water Research*, 101, 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.089>
- Levantesi, C; La Mantia, R; Masciopinto, C; Böckelmann, U; Ayuso-Gabella, M; Salgot, M. (2010). Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Science of The Total Environment*, 408, 4923–4930.
- Mercedes, N., Larrea-murrell, A; Rojas-badía, J.A.; Marcia, M. B., & Heydrich-pérez, B; Rojas-hernández Mayra, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, 44(3), 24–34.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2010). *Plan Nacional de Reutilización de Aguas. Version Preliminar del Plan*. 131. Retrieved from http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/participacion-publica/version_preliminar_pnra231210_tcm7-153069.pdf
- Montero Arratibel Tutor, A., & Bermejo Benito, P. (2017). *Facultad De Farmacia Universidad Complutense*.
- Mosteo R., Ormad M. P., Goni P., Rodríguez-Chueca J., Garcia A., C. A. (2013). Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities. *Water Science and Technology*, 68, 575–583.
- Olmedo Sanchez, M. T. (2008). Subproductos de la desinfección del agua por el empleo de compuestos de cloro . Efectos sobre la salud. *Hig. Sanid. Ambient.*, 342, 335–342.
- Pelayo Torices, D., & Rivero Martínez, M. J. (2018). *Procesos De Oxidación Avanzada: Avances Recientes Y Tendencias Futuras*. 1–74. Retrieved from <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14217/409513.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pietrobon Tarrán, E. (2012). Desinfección por Luz Ultravioleta. *Agua Latinoamericana*, 7. Retrieved from <http://ecured.cuwww.agualatinoamerica.com/docs/pdf/3-4-02inter.pdf>
- Rodríguez-Chueca J, Ormad Melero MP, Mosteo Abad R, Esteban Finol J, Ovelleiro Narvi3n J. (2015). Inactivation of Escherichia coli in fresh water with advanced oxidation processes based on the combination of O₃, H₂O₂ and TiO₂. Kinetic modeling. *Environ Sci Pollut Res*, 22, 10280–10290.
- Rodríguez-Chueca, J., Guerra-Rodríguez, S., Ruez, J. M., López-Muñoz, M. J., & Rodríguez, E. (2019). Assessment of different iron species as activators of S₂O₈²⁻ and HSO₅⁻ for inactivation of wild bacteria strains. *Applied Catalysis B: Environmental*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.02.003>

- Rojas, A. (2011). Conceptos y práctica de microbiología general. *Universidad Nacional de Colombia*, 1–161. <https://doi.org/10.1002/ijc.10666>
- Salud, O. M. de la. (2014). Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture: Measures for public health protection. *New Directions for Youth Development*, 2014(142), 5–8. <https://doi.org/10.1002/yd.20093>
- Sun, P.; Tyree, G; Huang, C. H. (2016). *Environmental science technology*.
- Valero, P; Mosteo, R; Ovelleiro J.L.; Ormad, M. P. (2017). Comparative study of conventional and advanced disinfection processes applied to urban wastewaters. *Universidad de Zaragoza*.
- Valero Lázaro, P. (2017). *Regeneración de aguas de salida de depuradora mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación*.
- Wang, J; Wang, S. (2018). Activation of persulfate (PS) and peroxymonosulfate (PMS) and application for the degradation of emerging contaminants. *Chemical Engineering Journal*, 334, 1502–1517.
- Wright, H., & Cairns, W. (1998). Desinfección de agua por medio de Luz Ultravioleta. *Trojan Technologies Inc.*, 1–28. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Desinfecci?n+de+agua+por+medio+de+luz+ultravioleta#0>
- Yang, Y., Guo, H., Zhang, Y., Deng, Q., & Zhang, J. (2016). Degradation of Bisphenol A Using Ozone/Persulfate Process: Kinetics and Mechanism. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(2). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2746-x>
- Zimmermann, S. G., Wittenwiler, M., Hollender, J., Krauss, M., Ort, C., Siegrist, H., & von Gunten, U. (2011). Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: Micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection. *Water Research*, 45(2), 605–617. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.080>